

Die zwei metabolischen Funktionen  
der Aconitase AcoA aus *Aspergillus nidulans*:

Aconitase-Aktivität im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  und  
Methylisocitrat-Dehydratase-Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biologin Claudia Maerker  
geboren am 26.10.1975 in Berlin

2007

Referent: Prof. Dr. Brakhage

1. Koreferent: Prof. Dr. Buckel

2. Koreferent: Prof. Dr. Auling

Tag der Promotion: 5.02.07

## KURZZUSAMMENFASSUNG

*Aspergillus nidulans*, ein filamentöser Pilz aus der Gruppe der Ascomyceten, ist in der Lage, Propionat als einzige Kohlenstoff-Quelle zu nutzen. Propionat wird über den Methylcitrat-Zyklus abgebaut, der neben dem Methylmalonyl-CoA-Weg einen weitverbreiteten Weg in Mikroorganismen darstellt. Dieser Abbauweg wurde bisher nur für Bakterien und Pilze beschrieben, nicht aber für Säuger. Diese Arbeit beschreibt die Charakterisierung der Methylisocitrat-Dehydratase (Midh) aus *A. nidulans*. Dieses Enzym katalysiert die reversible Reaktion von Methyl-*cis*-aconitat zu Methylisocitrat. Durch tryptischen Verdau und Peptid-Analyse des gereinigten Enzyms über MALDI-TOF konnte die Midh-Aktivität dem Genprodukt von *acoA* zugeordnet werden. *AcoA* wurde aufgrund von Sequenzähnlichkeiten als Aconitase annotiert, aber bisher weder isoliert noch charakterisiert. Die unabhängige Reinigung der Aconitase ergab ebenfalls das Genprodukt von *acoA*. Prinzipiell sind Aconitasen aus Säugern in der Lage, die Midh-Reaktion zu katalysieren. Hierbei muss der Co-Faktor in der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Form vorliegen. Durch Oxidation geht das 4. Fe leicht verloren, bei gleichzeitigem Verlust der Midh- und Aconitase-Aktivität. In *A. nidulans* hingegen verhielten sich beide Aktivitäten unterschiedlich: Im Rohextrakt überwog zunächst die Aconitase-Aktivität, im Verlauf einer aeroben Reinigung kehrte sich das Verhältnis zugunsten der Midh-Aktivität um. Durch Dialyse gegen verschiedene Eisenchelatoren konnte dieser Effekt verstärkt werden, wobei die Midh-Aktivität erhöht und die Aconitase-Aktivität verringert wurde. EPR- und Mössbauer-Spektroskopie zeigten, dass Proben mit angereicherter Aconitase nur den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  und den stabileren  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster enthielten. Nach Reaktivierung befanden sich ausschließlich  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster in der Probe, wohingegen nach Dialyse, welche die Midh-Aktivität erhöhte, nur  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster gemessen werden konnten. Nach Zugabe des Substrates Methyl-*cis*-aconitat war das  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Signal im EPR-Spektrum leicht verschoben, was darauf hinweist, dass das Enzym in dieser Clusterform Substrat binden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse wird postuliert, dass *AcoA* mit  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster hauptsächlich Aconitase- und geringe Midh-Aktivität aufweist, während der  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster ausschließlich Midh-Aktivität zeigt. Diese Ergebnisse sind neu, da sie denen von Säugern widersprechen, bei denen beide Aktivitäten strikt vom Vorliegen des Enzyms im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand abhängen. Als eine mögliche Erklärung für diese Doppelfunktion des Enzyms in pilzlichen Zellen wird die Verhinderung der Anreicherung toxischer Intermediate des Methylcitratzyklus postuliert.

Schlagworte: *Aspergillus nidulans*,

Methylcitratzyklus, Aconitase, Eisen-Schwefel-Cluster

## ABSTRACT

*Aspergillus nidulans* is a filamentous fungus, belonging to the Ascomycetes, capable of growing on propionate as the sole carbon source. Propionate is degraded *via* the methylcitrate cycle, which is, besides the methylmalonyl-CoA-pathway, widespread among microorganisms. However, this pathway is unique to bacteria and fungi but absent in mammals. This thesis describes the characterization of methylisocitrate dehydratase (Midh) from *A. nidulans*. Midh catalyzes the reversible reaction of methyl-*cis*-aconitate to methylisocitrate. The purified enzyme was analyzed by tryptic digestion and subsequent MALDI-TOF-analysis, revealing the Midh as the gene product of *acoA*. AcoA was postulated to be the citric acid cycle aconitase because of sequence homologies to other aconitases, but was not characterized yet. Independent purification of the citric acid cycle aconitase also identified the protein AcoA, implying a twofold function of this gene product. In general, aconitases from mammalian sources are able to catalyze the Midh reaction. In this case, Midh and aconitase activity depend on an iron-sulfur cluster in the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  state. The oxidative removal of the labile 4<sup>th</sup> iron coincides with the loss of both activities. This finding contradicts the results obtained from the aconitase of *Aspergillus nidulans*. Here, both activities behave differently during purification: In crude extracts, the aconitase activity prevailed, but specific activity decreased during purification, accompanied by an increase of Midh activity. The use of various chelating agents enhanced this effect, by increasing Midh and decreasing aconitase activity. Reactivation to the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -cluster restored aconitase but not Midh activity. EPR and Mössbauer spectroscopy showed that partially purified aconitase contains both, the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  and the more stable  $[3\text{Fe-4S}]^+$  cluster. After reactivation only the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -form was found, which is consistent with aconitase activity. In contrast, a dialysed sample contained only  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -cluster and high Midh activity. After addition of methyl-*cis*-aconitate, the  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -signal showed a slight shift in the EPR spectrum, indicating the substrate binding capacity of aconitase in the  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -state. Due to these results we assume that aconitase AcoA from *A. nidulans* possesses mainly aconitase activity in the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -state, whereas the  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -cluster is specific for Midh activity. These results are in contrast to those from mammalian aconitases, where both activities strictly depend on the presence of the enzyme in the  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -state. The separation of both activities between different cluster states in the fungal cell may act as a mechanism to efficiently remove toxic intermediates of the methylcitrate cycle.

keywords: *Aspergillus nidulans*, methylcitrate cycle, aconitase, iron-sulfur-cluster



---

**ABKÜRZUNGEN**

Ac	Acetat
AMM	Aspergillus Minimalmedium
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
As	Aminosäure
Bp	Basenpaare
Da	Dalton
Dig	Digoxygenin
DNA	desoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	electron paramagnetic resonance
FG	Feuchtgewicht
FPLC	fast protein liquid chromatography
Gluc	Glucose
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
kDa	kilo Dalton
kb	kilo Basen
KPP	Kaliumphosphatpuffer
Midh	Methylisocitrat-Dehydratase
MdhA	Methylcitrat-Dehydratase
min	Minute
Na	Natrium
OD <sub>578</sub>	Optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 578 nm
PCR	polymerase chain reaction
Prop	Propionat
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Tris	Tris-2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
ÜN	über Nacht

---

<b>KURZZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>II</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>IV</b>
<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1. <i>Aspergillus nidulans</i> .....	1
2. Propionat .....	2
2.1 Abbau über den Methylcitrat-Zyklus.....	2
2.2 Propionat als Konservierungsmittel.....	4
3. Die Reaktion von Methylcitrat zu Methylisocitrat .....	5
3.1 Die Methylisocitrat-Dehydratase aus <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	7
3.2 Die Midh aus <i>A. nidulans</i> .....	8
4. Die Aconitase .....	8
4.1. Cytosolische Aconitase/IRE-BP .....	13
4.2 Clustereinbau.....	14
5. Matrix-assisted-laser-desorption-time-of-flight (MALDI-TOF)-Analysen .....	14
6. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy .....	15
7. Mössbauer-Spektroskopie .....	17
8. Zielsetzung: .....	20
<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
1. Geräte und Chemikalien .....	21
2. Mikroorganismen.....	21
2.1 <i>E. coli</i> .....	21
2.2 <i>Aspergillus nidulans</i> .....	22
3. Oligonucleotide.....	23
4. Medien .....	23
4.1 Medien für <i>A. nidulans</i> .....	23
4.1.1 Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen.....	23

4.1.2 Medium mit <sup>57</sup> Fe .....	24
4.1.3 Agar .....	24
4.1.4 Kulturbedingungen .....	25
4.2 Medien für <i>E. coli</i> .....	25
4.2.1 LB-Medium .....	25
4.2.2 Glucosetestreagenz .....	26
<b>5. Biochemische Methoden .....</b>	<b>26</b>
5.1 Messung der Midh-Aktivität .....	26
5.1.1 Messung der Midh-Aktivität bei 340 nm .....	26
5.1.2 Messung der Midh-Aktivität bei 240 nm .....	27
5.2 Vorbereitung des Substrates Methylisocitrat: .....	28
5.3 Messung der Aconitase-Aktivität .....	28
5.3.1 Messung der Aconitase-Aktivität bei 340 nm .....	28
5.3.2 Messung der Aconitase-Aktivität bei 240 nm .....	29
5.4 Messung der Methylcitrat Dehydratase-Aktivität .....	29
5.5 Reinigung der Midh aus dem Stamm ΔSREA .....	30
5.6 Reinigung der Aconitase aus dem Stamm ΔSREA .....	32
5.7 Reinigung der Midh aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20 .....	33
5.8 Anreicherung der Midh .....	36
5.9 K <sub>m</sub> -Wert-Bestimmung .....	36
5.9.1 <i>cis</i> -Aconitat .....	36
5.9.2 Isocitrat .....	37
5.9.3 Citrat .....	37
5.9.4 Methyl- <i>cis</i> -aconitat .....	37
5.9.5 Bestimmung der Methyl- <i>cis</i> -aconitat-Konzentration .....	37
5.9.6 Methylisocitrat .....	38
5.9.7 Bestimmung der Methylisocitrat-Konzentration .....	38
5.10 Anreicherung der Aconitase aus Schweineherz ( <i>Sus scrofa domestica</i> ) .....	39
5.11 Bestimmung des Sulfidgehalts .....	39
5.11.1 Iodometrische Bestimmung des Sulfidstandards .....	41
5.12 Eisenbestimmung mit Feren .....	42
5.13 Reaktivierung der Aconitase .....	43
5.13.1 Reaktivierung mit <sup>57</sup> Fe .....	44
5.14 Umpufferung über Sephadex G-25 Säulen (NAP-Säule) .....	44
5.15 Dialyse gegen <i>o</i> -Phenenthrolin .....	44
5.16 Dialyse gegen EDTA .....	44
5.17 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	45
5.18 Proteinbestimmung nach Bradford .....	46
5.19 MALDI-TOF-Messung .....	46
5.19.1 Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF-Messung .....	46

---

5.20 Vorbereitung der Proben für die EPR-Spektroskopie .....	48
5.21 Vorbereitung der Proben für die Mössbauer-Spektroskopie .....	49
<b>6. Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>49</b>
6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	49
6.2 Digoxigenin-Markierung der Sonden über PCR .....	50
6.3 Restriktionsverdau .....	50
6.4 Herstellung von Agarosegelen .....	50
6.5 Southern Blot .....	51
6.5.1 Hybridisierung .....	51
6.5.2 Detektion mit CDP-Star .....	53
6.5.3 Detektion durch Membranfärbung .....	53
6.6 DNA-Sequenzierung .....	53
6.7 Klonierungen .....	53
6.7.1 Phosphatase .....	53
6.7.2 Ligation .....	54
6.7.3 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (Rubidium-Chlorid-Methode) .....	54
6.7.4 Transformation von <i>E. coli</i> .....	54
6.7.5 Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA .....	55
6.8 Transformation von <i>A. nidulans</i> .....	55
6.8.1 Klonierung von <i>acoA</i> .....	56
6.9 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>A. nidulans</i> .....	58
6.10 RNA-Isolierung aus <i>A. nidulans</i> .....	58
6.10.1 Reverse Transkription .....	59
<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>60</b>
<b>1. Vergleichende Enzymaktivitäten in <i>A. nidulans</i> Stämmen .....</b>	<b>60</b>
<b>2. Zeitabhängige Inaktivierung der Enzymaktivitäten .....</b>	<b>62</b>
<b>3. Reinigung der Methylisocitrat-Dehydratase (Midh) .....</b>	<b>63</b>
3.1 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Methylcitrat-Dehydratase .....	65
3.2 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Methylisocitrat-Dehydratase (Midh) .....	67
<b>4. Aconitase .....</b>	<b>69</b>
4.1 Reinigung der Aconitase .....	69
4.2 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Aconitase .....	71
<b>5. Ermittlung der mRNA-Sequenz sowie der Genomsequenz von <i>AcoA</i> .....</b>	<b>73</b>
<b>6. Überproduktion von <i>AcoA</i> .....</b>	<b>75</b>
6.1 Southern Blot .....	79

6.2 Reinigung der AcoA aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20 .....	80
6.2.1 MALDI-TOF-Messung von AcoA .....	82
6.3 Reaktivierung der gereinigten AcoA .....	83
<b>7. Vergleichende Messungen der Aconitase-Aktivität.....</b>	<b>84</b>
7.1 Aconitase-Aktivität aus Schweinherz.....	84
7.2 Reaktivierung der gereinigten AcoA für die EPR-Spektroskopie .....	86
7.3 Reaktivierung des Rohextraktes.....	87
7.4 Anreicherung der AcoA aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20.....	88
<b>8. Wirkung von Eisenchelatoren auf die Aktivitätsverteilung von AcoA .....</b>	<b>90</b>
8.1 Dialyse gegen Phenanthrolin.....	90
8.2 Dialyse gegen EDTA I (hohe EDTA-Konzentration) .....	92
8.3 Dialyse gegen EDTA II (niedrige Konzentration mit Fe-S-Bestimmung).....	93
<b>9. <math>K_m</math>-Wert-Bestimmung .....</b>	<b>95</b>
<b>10. EPR Spektroskopie.....</b>	<b>100</b>
10.1 Messung der gereinigten AcoA.....	100
10.2 Messung der gereinigten und reaktivierten AcoA .....	100
10.3 Messung der angereicherten AcoA mit Substrat .....	103
<b>11. Mössbauer Spektroskopie.....</b>	<b>104</b>
11.1 Messung der angereicherten AcoA.....	104
11.2 Messung der reaktivierten AcoA .....	107
11.3 Messung nach Dialyse gegen EDTA.....	111
<b>DISKUSSION.....</b>	<b>114</b>
<b>1. AcoA: ein Enzym mit zwei Aktivitäten.....</b>	<b>114</b>
<b>2. Die Aconitase .....</b>	<b>115</b>
<b>3. Der <math>[3Fe-4S]^+</math>-Zustand der Aconitase .....</b>	<b>115</b>
<b>4. Zwei Cluster-Zustände = zwei Aktivitäten .....</b>	<b>116</b>
<b>5. Cluster-Zustand innerhalb der Zelle .....</b>	<b>117</b>
<b>6. Bedeutung der Aktivitätstrennung für <i>A. nidulans</i> .....</b>	<b>118</b>
<b>7. Vergleich der pilzlichen Aconitasen zu den aus Säugern .....</b>	<b>119</b>
<b>8. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>125</b>

<b>LITERATUR.....</b>	<b>128</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>135</b>
<b>PUBLIKATIONSLISTE .....</b>	<b>144</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>145</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>146</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>147</b>

## EINLEITUNG

### 1. *Aspergillus nidulans*

*Aspergillus nidulans* ist ein filamentöser Pilz aus der Klasse der Ascomyceten. Die Gattung *Aspergillus* wurde erstmals von dem italienischen Priester P. A. Micheli 1729 beschrieben. Sie erhielt ihren Namen auf Grund der Ähnlichkeit des Konidiophors mit einem Weihwedel (Aspergill). Die Spezies *nidulans* („der Nistende“) beschreibt die Teleomorphe, also die sexuelle Fruktifikationsform. Die asexuelle Form wird als Anamorphe bezeichnet. Der Name für die Hauptfruchtform lautet *Emericella nidulans*. Der asexuelle Lebenszyklus von *A. nidulans* umfasst die Ausbildung eines Konidiophors und Bildung von Konidiosporen, die auf geeigneten Substraten erneut zu Mycel auswachsen können. Für den sexuellen Zyklus ist kein Kreuzungspartner notwendig, weswegen dieser Pilz als homothallisch bezeichnet wird. Der sexuelle Zyklus beginnt mit der Verschmelzung von Hyphen und der Bildung des Heterokaryon. Anschließend erfolgt die Ausbildung der Hyphen zu einer charakteristischen Struktur, dem Kleistothecium. Dieses sitzt in einem Netzwerk von Hüllezellen und enthält im Innern die Ascosporen, die aus meiotischer und mitotischer Teilung hervorgehen. Nach Auskeimung der Ascosporen entwickelt sich wie beim Auskeimen der asexuellen Konidien neues Mycel. *A. nidulans* wächst in verschiedenen Habitaten, in denen organisches Material zur Verfügung steht. Durch ihre geringe Größe und hydrophobe Oberfläche lassen sich die Konidiosporen leicht durch Wind verbreiten.

In der Industrie werden filamentöse Pilze für die Produktion von Naturstoffen wie Penicillin (*Penicillium chrysogenum*) oder Citronensäure (*Aspergillus niger*) eingesetzt. In der asiatischen Lebensmittelproduktion dient *Aspergillus oryzae* der Produktion von Sojasauce und Sake. Neben der industriellen Bedeutung können filamentöse Pilze auch Verursacher von Krankheiten sein. Ein prominenter Vertreter ist *Aspergillus fumigatus*, der sowohl Allergien auslösen als auch lebensbedrohliche systemische Infektionen verursachen kann. *Aspergillus flavus* hingegen, als Produzent von Aflatoxinen, bewirkt durch den Befall von Getreide und Nüssen hohe Ernteverluste. Durch die nahe

Verwandtschaft von *A. nidulans* mit den anderen hier genannten Vertretern wird er im Labor häufig als Modellorganismus eingesetzt (Yu and Keller, 2005), (Hynes, 1994), (Krüger *et al.*, 2005), (Brakhage *et al.*, 1999).

## 2. Propionat

### 2.1 Abbau über den Methylcitrat-Zyklus

Der Abbau von Propionat erfolgt bei *A. nidulans* über den Methylcitrat-Zyklus (siehe Abb. 1). Dieser Weg wurde erstmals bei *Yarrowia lipolytica*, einer obligat aeroben Hefe, nach Wachstum auf ungeradzahligen Fettsäuren beschrieben (Tabuchi and Hara, 1974) (Tabuchi *et al.*, 1974). Dieser Abbauweg konnte später auch in Bakterien (*Pseudomonas aeruginosa* (Watson *et al.*, 1983), *Salmonella enterica* (Hammelman *et al.*, 1996) *Escherichia coli* (Textor *et al.*, 1997) *Corynebacterium glutamicum* (Claes *et al.*, 2002) und filamentösen Pilzen (*A. nidulans* und *A. fumigatus*) (Brock *et al.*, 2000) (Maerker *et al.*, 2005) nachgewiesen werden.

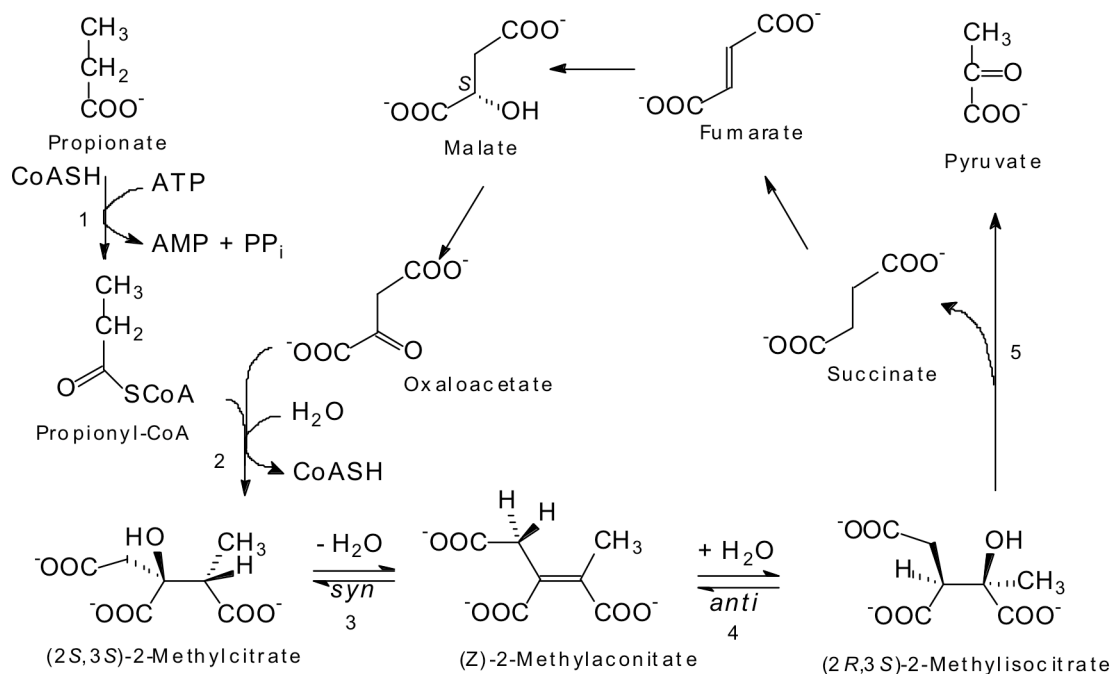


Abb. 1: Der Methylcitratzyklus, 1. Propionyl-CoA-Synthetase, 2. Methylcitrat-Synthase, 3. Methylcitrat-Dehydratase (MdhA), 4. Methylisocitrat-Dehydratase (Midh), 5. Methylisocitrat-Lyase. Nach (Brock *et al.*, 2000).



Dabei wird Propionat zu Propionyl-CoA über die Propionyl-CoA-Synthetase aktiviert, oder es stammt direkt vom Abbau ungeradzahliger Fettsäuren oder der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Methionin.

Die Methylcitratsynthase katalysiert eine Claisen-Kondensation von Propionyl-CoA und Oxalacetat zu Methylcitrat (Uchiyama and Tabuchi, 1976) (Textor *et al.*, 1997) (Brock *et al.*, 2000) (Maerker *et al.*, 2005). Durch die Wirkung der Methylcitrat-Dehydratase wird ein Wassermolekül abgespalten (Tabuchi *et al.*, 1981) (Aoki and Tabuchi, 1981) (Brock *et al.*, 2002). Die Methylcitrat-Dehydratase aus *E. coli* (PrpD) weist keine Sequenzidentitäten zu anderen bekannten Dehydratasen auf. Das könnte an der ungewöhnlichen Stereochemie der Reaktion liegen: das Proton und die Hydroxylgruppe werden von der gleichen Seite des Moleküls abstrahiert (in *syn*). In allen bekannten Eliminierungen von Wasser aus Malat-Derivaten erfolgt die Entfernung hingegen in *trans*. Anschließend erfolgt die Wasseranlagerung durch die Wirkung der Methylisocitrat-Dehydratase, die Gegenstand dieser Arbeit ist. Das Produkt Methylisocitrat wird in Succinat und Pyruvat gespalten. (Tabuchi *et al.*, 1974) (Tabuchi and Uchiyama, 1975) (Brock *et al.*, 2002) (Brock, 2005). Succinat wird zur weiteren Oxidation in den Citratzyklus eingeschleust.

In *E. coli* wird Propionat ebenfalls über den Methylcitratzyklus abgebaut (Textor *et al.*, 1997) (Brock *et al.*, 2002). Die Gene der am Propionatabbau beteiligten Enzyme sind in *E. coli* im sogenannten *prp*-Operon organisiert. Dem Operon vorgelagert liegt in umgekehrter Transkriptionsrichtung ein Regulator (PrpR), gefolgt von den Genen die für folgende Enzyme kodieren: Methylisocitrat-Lyase (PrpB), Methylcitrat-Synthase (PrpC), Methylcitrat-Dehydratase (PrpD) und Propionyl-CoA-Synthetase (PrpE). Zwischen den Genen *prpB* und *prpC* befindet sich ein repetitives, extragenisches palindromisches Element (REPE) mit einer Länge von 440 Nucleotiden. Über die Funktion dieser Elemente ist wenig bekannt, obwohl sie schon für *E. coli* und *Salmonella typhimurium* beschrieben wurden (Bachelier *et al.*, 1994). Wahrscheinlich haben sie regulatorische Funktionen. Dieses Element fehlt in *S. typhimurium*. *E. coli*-Zellen, die erstmals auf Propionat angezogen wurden besitzen eine lag-Phase, die in „erfahrenen“ Zellen nicht mehr nachzuweisen ist. Dem REP-Element könnte diese lag-Phase zugeordnet werden, da eine Untersuchung an „erfahrenen“

*E. coli*-Zellen gezeigt hat, dass das REP-Element hier fehlt (persönliche Mitteilung von V. Wendisch).

Im Operon fehlt ein Gen, dessen Produkt für die Rehydratisierung von Methyl-*cis*-aconitat verantwortlich ist. Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Reaktion von der Aconitase des Citratzyklus übernommen wird (Maerker, 2001) (Brock *et al.*, 2002). Hierauf wird später im Detail eingegangen.

In einem anderen gut untersuchten Stoffwechselweg wird Propionat über eine  $\alpha$ -Carboxylierung von Propionyl-CoA in (*S*)-Methylmalonyl-CoA und dann in (*R*)-Methylmalonyl-CoA umgewandelt. In einer Coenzym-B<sub>12</sub>-abhängigen Umlagerung entsteht Succinyl-CoA. Dieser Weg dient beim Menschen dem Abbau von Propionyl-CoA, während in umgekehrter Richtung in Propionibakterien über diesen Weg Propionat gebildet wird (Stryer, 1995). Gendefekte in dem sogenannten Methylmalonyl-CoA-Weg führen beim Menschen zu schweren Erkrankungen (Propionic Acidemia und Methylmalonic Acidemia) (Deodato *et al.*, 2006).

## 2.2 Propionat als Konservierungsmittel

Propionat dient als Konservierungsmittel in der Lebensmittel- und Futtermittelindustrie. Die Zusatzstoffe E 280 bis E 283 stehen für die freie Säure, Na-, K- und Ca-Propionat. Der Zusatz von Propionat zu Futtermais beträgt bis zu 2 % der Trockenmasse. Durch die Zugabe hoher Propionatkonzentrationen konnte gezeigt werden, dass nicht nur das Wachstum filamentöser Pilze gehemmt wird, sondern sie auch nicht mehr in der Lage sind Sekundärmetabolite, wie Polyketide zu bilden (Tong and Draughon, 1985). Zu den Polyketiden zählen z.B. die Aflatoxine, die zu den stärksten mutagenen Substanzen gehören, die man kennt. Andererseits sind viele filamentöse Pilze in der Lage auf Propionat als einziger C-Quelle zu wachsen. Es wird vermutet, dass bei gleichzeitigem Wachstum auf Propionat und Glucose die Intermediate des Methylcitratzyklus einen hemmenden Effekt auf den Glucose-Stoffwechsel haben. Besonders Propionyl-CoA und Methylisocitrat scheinen toxisch zu wirken. Propionyl-CoA hemmt die Pyruvat-Dehydrogenase, die Succinyl-CoA-Synthetase und die ATP-Citrat-Lyase (Brock and Buckel, 2004). Methylisocitrat wirkt inhibierend auf die NADP-abhängige Isocitrat-DH ( $K_i = 1,5 \mu\text{M}$ ) (Brock, 2005).

Außerdem wird vermutet, dass die Menge an Acetyl-CoA reduziert werden könnte, da freies CoA unter Bildung von Propionyl-CoA abgefangen wird. Die Polyketidsynthese, die für die Konidienfarbe verantwortlich ist, und ebenso die Sterigmatocystinsynthese, die zur Bildung der sexuellen Kleistothecien beiträgt, werden bei Anreicherung von Propionyl-CoA gehemmt (Brock *et al.*, 2000) (Zhang *et al.*, 2004). Propionat kann also einerseits als alleinige C-Quelle verstoffwechselt werden, wirkt aber andererseits, besonders zusammen mit Glucose, hemmend auf verschiedene zelluläre Prozesse.

### **3. Die Reaktion von Methylcitrat zu Methylisocitrat**

Die Reaktion von Methylcitrat zu Methyl-*cis*-aconitat erfolgt über eine ungewöhnliche Wasser-Eliminierung in *syn*. Bisher waren *syn*-Eliminierungen nur von Derivaten mit aciden H-Atomen bekannt, wie  $\beta$ -Hydroxyacyl-CoA oder  $\beta$ -Hydroxyketonen. Ein wichtiger Unterschied zur Reaktion der Aconitase (Citrat  $\rightarrow$  *cis*-Aconitat) besteht darin, dass die Aconitase das Proton vom „pro-R-Arm“ des Citrats entfernt, während die Methylcitrat-Dehydratase das Proton vom Methylgruppen-tragenden Arm entfernt, der dem „Pro-S-Arm“ des Citrats entspricht (siehe Abb. 2). Das dabei entstehende Produkt hat die Konformation (Z)-2-Methylnaconitat. Die anschließende Addition von Wasser erfolgt in *anti* durch die Wirkung der Methylisocitrat-Dehydratase (Midh) oder der Aconitase.

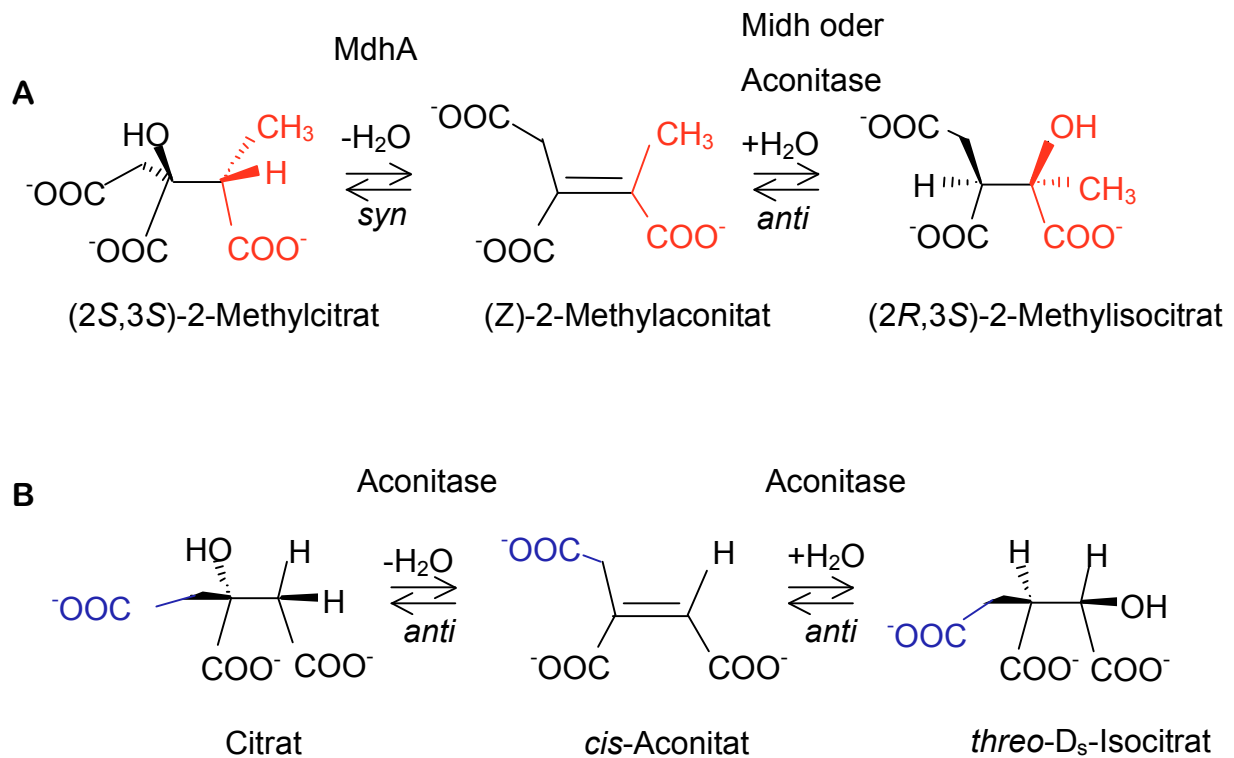


Abb. 2 A: Reaktion der Methylcitrat-Dehydratase (MdhA) und Methylisocitrat-Dehydratase (Midh). Die zweite Teilreaktion kann auch von der Aconitase katalysiert werden. B: Reaktion der Aconitase. Rot: Rest, der vom Propionyl-CoA stammt. Blau: Rest, der vom Acetyl-CoA stammt.

Obwohl Propionyl-CoA in Säugern nicht über den Methylcitratzyklus sondern den Methylmalonyl-CoA-Weg abgebaut wird, sprechen experimentelle Befunde dafür, dass die mitochondriale Aconitase aus dem Herzmuskel von *Sus scrofa domestica* (Hausschwein) in der Lage ist, die reversible Reaktion von Methyl-*cis*-Aconitat zu Methylisocitrat zu katalysieren (Lauble and Stout, 1995). Die Bildung von Methylcitrat konnte dabei allerdings nicht beobachtet werden. Die Aconitase kann Substrat auf zwei verschiedene Arten binden, dem Citrat-Modus und dem Isocitrat-Modus. Daher kommt für Methylcitrat nur der Citrat-Modus in Frage. Allerdings weist ein bestimmter Asparaginsäure-Rest (Asp-165) in der mitochondrialen Rinderherzaconitase eine ungünstige Orientierung auf, sodass es auf Grund eines sterischen Konfliktes mit der Methylgruppe nicht zu einer Bindung von Methylcitrat kommen kann (Lauble and Stout, 1995).

Im Rahmen der eigenen Diplomarbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Midh-Reaktion in *E. coli* ebenfalls von der Haupt-Aconitase AcnB katalysiert

wird (Maerker, 2001), diese Reaktion wird also, zumindest in Bakterien tatsächlich genutzt.

### 3.1 Die Methylisocitrat-Dehydratase aus *Yarrowia lipolytica*

Die Hefe *Yarrowia lipolytica* gehört zur Klasse der Saccharomyceten. Ihre hohe Lipaseaktivität ermöglicht ein Wachstum auf n-Alkanen. Eine bestimmte Mutante von *Y. lipolytica* produzierte nach Kultivierung auf ungeradzahligem Fettsäuren besonders viel 2-Methylisocitrat. Untersuchungen an diesem Stamm ergaben, dass dieser Mutante das Gen, welches für die Methylisocitrat-Lyase kodiert, fehlte (Miyakoshi *et al.*, 1987). Der Vergleich mit dem Wildtypstamm ermöglichte die Aufklärung der am Abbau beteiligten Enzyme. Im Zusammenhang mit der Methylisocitrat-Dehydratase-Reaktion wurden zwei Enzyme isoliert, die diese Reaktion katalysieren konnten: die Aconitase aus dem Citratzyklus und ein anderes Enzym, das als 2-Methylisocitrat-Dehydratase (Midh) oder (2*S*,3*R*)-3-Hydroxybutan-1,2,3-tricarboxylat-Hydrolyase (E.C. 4.2.1.99) bezeichnet wurde (Aoki *et al.*, 1995). Dieses Enzym besaß keinen Co-Faktor und zeigte trotz Zugabe des Eisenchelators *o*-Phenanthrolin zum Rohextrakt keine Verminderung der Aktivität. Beide Aktivitäten konnten auf einer DEAE-Sephadex A-50-Säule teilweise voneinander getrennt werden (Aoki *et al.*, 1995). Ein deutlicher Unterschied konnte bei den  $K_m$ -Werten beider Enzyme für Methylisocitrat als Substrat gemessen werden: 120  $\mu$ M bei der Aconitase und 18  $\mu$ M bei der Midh. Andererseits zeigten beide Enzyme in anderen Parametern eine hohe Übereinstimmung: so besaß die Aconitase einen Isoelektrischen Punkt (*pI*) von pH 4,2 während die Midh einen *pI* von pH 4,4 zeigte. Durch Gel-Chromatographie über Toyopearl HW-55S wurde die Größe der Aconitase mit 68 kDa und die der Midh mit 69 kDa bestimmt. Aus diesen sehr ähnlichen Parametern könnte man die Hypothese ableiten, dass es sich bei Aconitase und Midh um das gleiche, eventuell modifizierte, Enzym handelt. Da jedoch bisher zu keinem der am Propionatabbau beteiligten Enzyme aus *Y. lipolytica* eine Protein- bzw. Gensequenz veröffentlicht wurde, bleibt diese Frage vorerst unbeantwortet.

### 3.2 Die Midh aus *A. nidulans*

Im Rahmen der Doktorarbeit gelang es M. Brock (Brock, 2001) die Midh aus *A. nidulans* anzureichern. Die Midh inaktivierte sich an Luft mit einer Halbwertszeit von  $< 8$  h und zeigte im SDS-Gel eine Bande in der Höhe von 80 kDa. Die Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff lässt auf einen Fe-S-haltigen Co-Faktor schließen, wie ihn auch die Aconitase besitzt. Die Aconitase aus *A. nidulans* wurde bisher noch nicht gereinigt oder charakterisiert. Allerdings wurde bereits eine Teilsequenz der cDNA veröffentlicht, die aufgrund ihrer Ähnlichkeit zur Aconitase aus *A. terreus* als AcoA bezeichnet wurde (Oberegger *et al.*, 2002). Die postulierte molekulare Masse von AcoA beträgt 82 kDa, d.h., dass es sich bei der angereicherten Midh um AcoA handeln könnte.

## 4. Die Aconitase

Schon 1937 zeigte Carl Martius dass der Abbau von Citrat über *cis*-Aconitat zu Isocitrat verläuft. Er nannte das Enzymsystem zunächst „Citricodehydrase“, wobei er davon ausging, dass es sich mindestens um zwei Enzyme handelt: einer Dehydratase und einer Hydratase (Martius and Knoop, 1937) (Martius, 1937) (Martius, 1938). Später erkannte man, dass diese Reaktion nur von einem, monomeren Enzym katalysiert wird, der Aconitase (Citrat(Isocitrat)Hydrolyase EC4.2.1.3). Die Aconitase ist ein Enzym des Citratzyklus und des Glyoxylatzyklus, in beiden Wegen wird die gleiche Reaktion katalysiert.

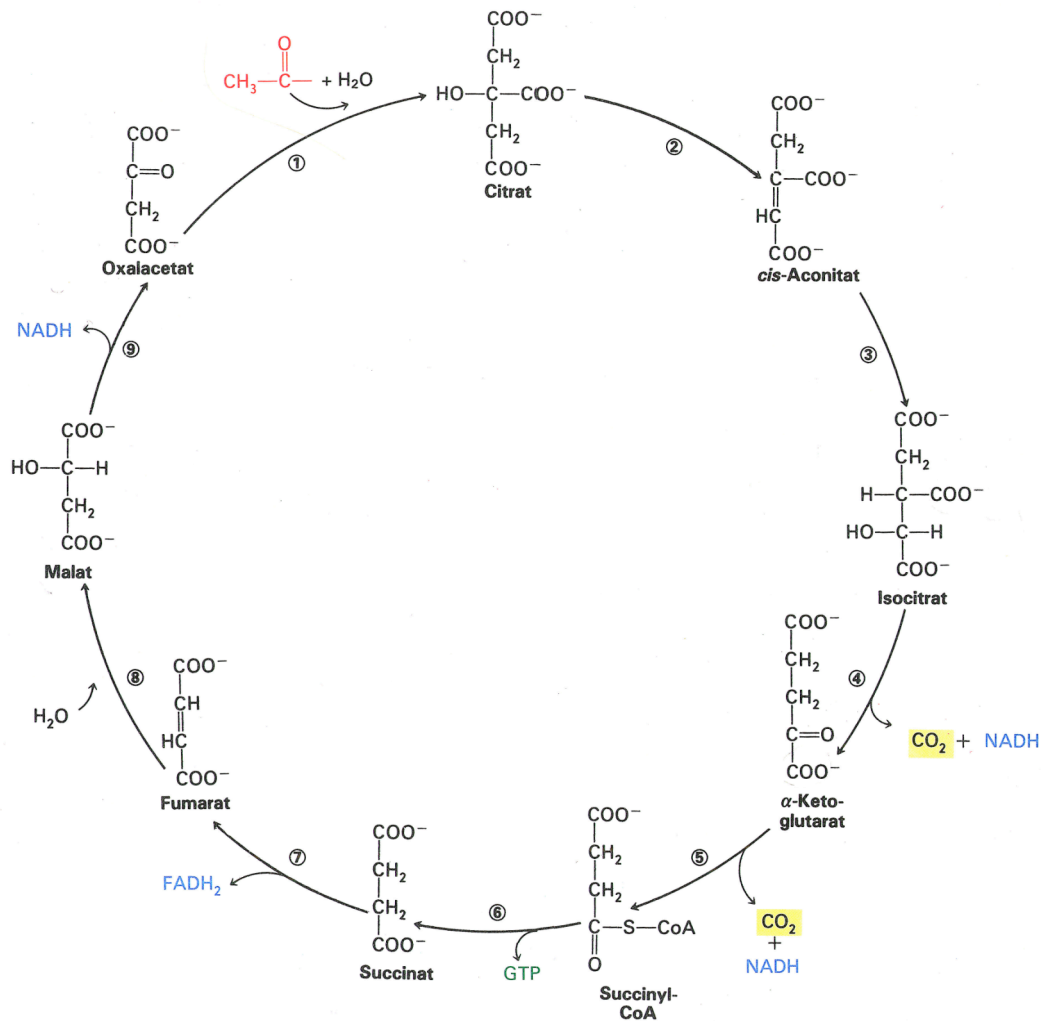


Abb. 3: Der Citratzyklus. 1. Citrat-Synthase, 2. Aconitase, 3. Aconitase, 4. Isocitrat-Dehydrogenase, 5. α-Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex, 6. Succinyl-CoA-Synthetase, 7. Succinat-Dehydrogenase, 8. Fumarase, 9. Malat-Dehydrogenase (Stryer, 1995).

Durch den Citratzyklus wird das aus dem Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex stammende Acetyl-CoA zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Die dabei entstehenden Reduktionsäquivalente in Form von NADH und  $\text{FADH}_2$  werden in die Atmungskette eingeschleust. Außerdem liefert der Citratzyklus wichtige Synthesevorstufen, wie z.B. α-Ketoglutarat für die Synthese von Glutamat.

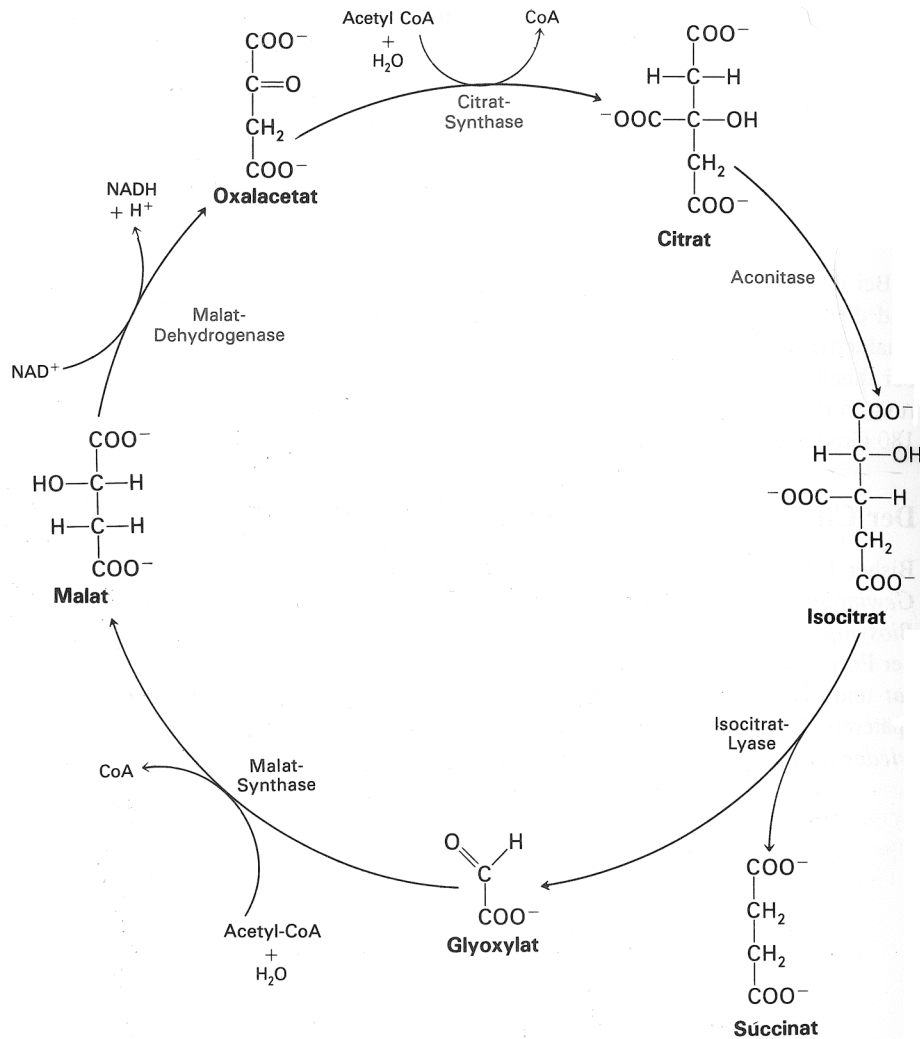


Abb. 4: der Glyoxylatzyklus (Stryer, 1995).

Der Glyoxylatzyklus ist auf Pflanzen, Bakterien und Pilze beschränkt. Er ermöglicht das Wachstum auf Acetat, Fettsäuren und Ethanol und liefert als anaplerotische Reaktion wichtige Synthesestufen. Der Glyoxylatzyklus ähnelt dem Citratzyklus und einige Enzyme werden in beiden Wegen genutzt. Die Reaktionen des Citratzyklus erfolgen in den Mitochondrien, während der Glyoxylatzyklus in speziellen Organellen stattfindet: den Glyoxysomen. Im Unterschied zum Citratzyklus wird hier das eingebrachte Acetyl-CoA jedoch nicht zu CO<sub>2</sub> oxidiert sondern als Glyoxylat über die Isocitratlyase freigesetzt. In einer weiteren Reaktion kondensiert Glyoxylat mit einem zweiten Molekül Acetyl-CoA zu Malat, welches dann zu Oxalacetat oxidiert wird.

Die Aconitase, die also beiden Zyklen gemein ist, besitzt einen cubanen [4Fe-4S]-Cluster. Der Cluster enthält vier Fe- und vier anorganische S-Atome in Form eines [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Clusters. Drei der vier Fe-Atome werden durch Cystein-



Liganden komplexiert. Das vierte Eisen ( $\text{Fe}_a$ ) dient als Substratbindestelle und wird durch ein Hydroxyd-Ion komplexiert. Durch Einwirkung verschiedener Oxidationsmittel, wie Sauerstoff oder Superoxid geht das 4. Eisen verloren und es bildet sich ein cuboidaler  $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Cluster mit spin-gekoppelten Paramagneten ( $\text{Fe(III)}$ ). Durch den eisenhaltigen Cluster eignet sich die Aconitase für spektroskopische Untersuchungen wie EPR- oder Mössbauer-Spektroskopie (siehe unten). Die bisher untersuchten Aconitasen zeigten keine Aktivität im  $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Zustand.

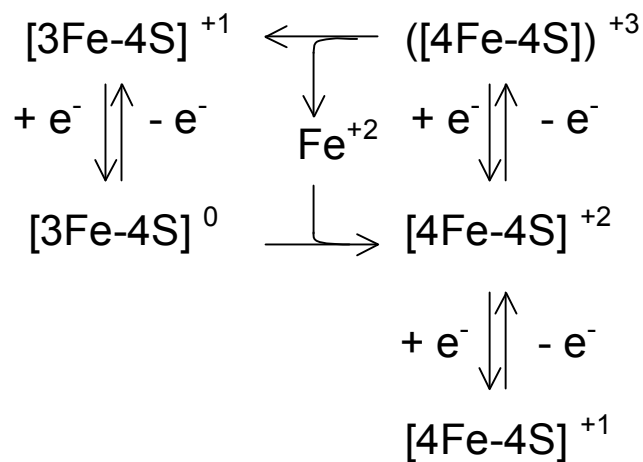


Abb. 5: Die unterschiedlichen Clusterzustände der Aconitase aus Schweineherz (Beinert and Kennedy, 1989).

Die unterschiedlichen Clusterzustände sind in Abb. 5 dargestellt. Der inaktive  $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Zustand lässt sich durch Zugabe von  $\text{Fe(II)}$  und Reduktionsmitteln wieder in den  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand überführen. Durch Photoreduktion lässt sich der  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand in den  $[\text{4Fe-4S}]^+$ -Zustand umwandeln. Dieser Zustand besitzt 30 % der Ausgangsaktivität (Emptage *et al.*, 1983a). Durch Reduktion des  $[\text{3Fe-4S}]^+$ -Zustandes mit Cystein bei gleichzeitiger Zugabe von EDTA lässt sich der  $[\text{3Fe-4S}]^0$ -Zustand herstellen, der aber keine physiologische Bedeutung zu haben scheint, und ebenfalls inaktiv ist. Lediglich der  $[\text{3Fe-4S}]^+$  und der  $[\text{4Fe-4S}]^+$ -Cluster verfügen über einen paramagnetischen Spin und lassen sich EPR-spektroskopisch untersuchen. In Tabelle 1 sind der jeweilige Gesamtspin des Clusters und die Aconitaseaktivität zusammengefasst.

Tab. 1: Oxidations- und Spinzustände der Aconitase aus Schweineherz, nach (Beinert and Kennedy, 1989).

Cluster	Oxidationszustände des Eisens	Spin im Grundzustand	Aktivität
$([4\text{Fe-4S}]^{3+})$	3Fe(III), 1Fe(II)	$S = \frac{1}{2}$	instabil
$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	2Fe(III), 2 Fe(II)	$S=0$ (diamagnetisch)	aktive Aconitase
$[4\text{Fe-4S}]^{1+}$	1 Fe(III), 3 Fe(II)	$S= \frac{1}{2}$	30 % Aktivität
$[3\text{Fe-4S}]^{1+}$	3Fe (III)	$S = \frac{1}{2}$	inaktiv
$[3\text{Fe-4S}]^0$	2Fe (III) 1Fe (II)	$S = 2$ (EPR-silent)	instabil, inaktiv

Die Aconitase bindet ihre Substrate auf zwei verschiedene Arten: Citrat bindet mit seiner  $\beta$ -Carboxyl- und Hydroxylgruppe an  $\text{Fe}_a$  während Isocitrat über die  $\alpha$ -Carboxyl- und Hydroxylgruppe an  $\text{Fe}_a$  bindet. Nach der Abstraktion des Wassermoleküls vom Citrat dreht sich *cis*-Aconitat um  $180^\circ$  (flip) relativ zur Aconitase und das Wasser, welches vorher abstrahiert wurde, wird wieder angelagert (siehe Abb. 6). *cis*-Aconitat kann also in 2 verschiedenen Konformationen gebunden werden: in der Citrat-Form oder der Isocitrat-Form. Durch Röntgenstrukturanalysen konnten weitere beteiligte Reste identifiziert werden: Arg-580 bindet die  $\gamma$ -Carboxylgruppe, und dient als Anker bei der Drehung des Substrats um  $180^\circ$ . Ser-642 abstrahiert das Proton während der Reaktion. His-101 scheint sowohl an der Katalyse als auch Substratbindung beteiligt zu sein. Das labile  $\text{Fe}_a$  fungiert während der Katalyse als Lewis-Säure, welche die Hydroxylgruppe des Substrats aktiviert. Die anderen Fe-Atome des Cluster ( $\text{Fe}_b$ ) scheinen nicht in die Reaktion involviert zu sein (Emptage *et al.*, 1983b). Die Aconitase stellt eine Besonderheit unter den Fe-S-Enzymen dar, da sie keinen Elektronentransfer katalysiert, sondern eine Wasserumlagerung.

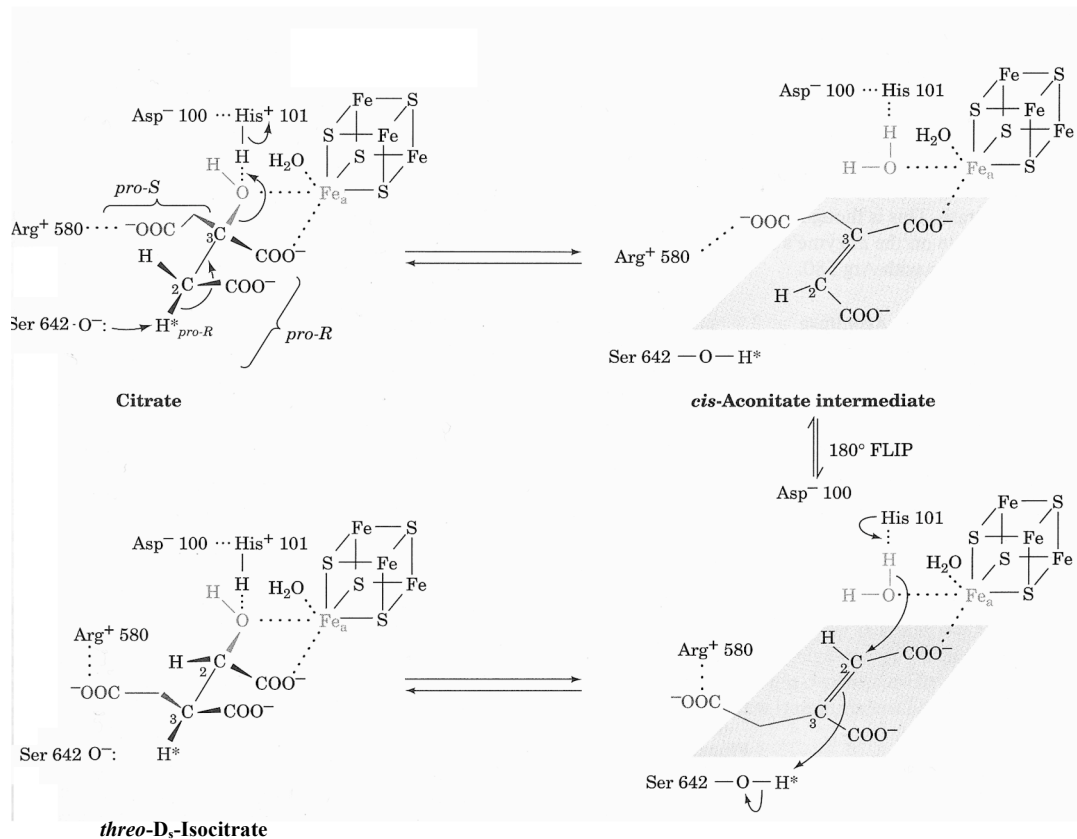


Abb. 6: Die Aconitasereaktion (Voet and Voet, 1995).

#### 4.1. Cytosolische Aconitase/IRE-BP

Eine Isoform der mitochondrialen Aconitase existiert in Säugern in Form der cytosolischen Aconitase. Dieses Protein wird auch als IRP-1 (iron regulatory protein-1) oder als IRE-BP (iron-responsive element binding protein) bezeichnet. In Säugern hängt die Menge an intrazellulärem Eisen hauptsächlich von drei Proteinen ab: dem Transferrin-Rezeptor, dem Transferrin und dem Ferritin. Der Transferrin-Rezeptor transportiert Eisen-beladenes Transferrin in die Zelle, welches mit Hilfe des Ferritins intern gespeichert wird. In den Transkripten der Gene des Transferrin Rezeptors und des Ferritins befinden sich sogenannte iron-responsive elements (IREs), die bestimmte Sekundärstrukturen ausbilden (stem-loop-structures). Die Ferritin-mRNA besitzt ein IRE im 5'-Bereich und in der Transferrin-Rezeptor-mRNA befinden sich 5 IRE im 3'-Bereich (Beinert *et al.*, 1997). Durch Eisenmangel verliert IRP-1 den Cluster, wird dadurch aktiviert und bindet mit hoher Affinität an die IREs. Dadurch wird die Translation von Ferritin blockiert, d.h. weniger Eisen liegt in der Speicherform vor. Durch

Bindung von IRP-1 an die Transferrin Rezeptor mRNA wird diese vor dem Abbau durch Nucleasen geschützt. Dadurch wird Eisen verstärkt in die Zelle transportiert. Intaktes, Fe-S-haltiges IRP-1 zeigt Aconitase-Aktivität (Philpott *et al.*, 1994). Vermutlich dient IRP-1 ebenfalls als Sensor für reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygene species, ROS) (Mueller, 2005). IRPs finden sich in allen höheren Lebewesen, wie Mollusken, Insekten und Wirbeltieren. Die Existenz von speziellen IRPs in Pilzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden. In *E. coli* hat die Aconitase AcnB ebenfalls eine Doppelfunktion: als Regulator und als katalytisches Enzym (Williams *et al.*, 2002).

#### **4.2 Clustereinbau**

Obwohl der Einbau des Fe-S-Cluster in der Aconitase unter reduzierenden Bedingungen spontan geschieht, gibt es mehrere Untersuchungen zum Einbau des Clusters “*in vivo*“. Die Synthese von Fe-S-Cluster vollzieht sich in den Mitochondrien über die sogenannte Fe/S-Protein-Biosynthesemaschinerie (Iron Sulfur Cluster (ISC) assembly machinery). In *S. cerevisiae* sind an diesem Prozess ca. 10 Hilfsenzyme beteiligt (Lill and Mühlenhoff, 2005). Die Fe/S-Cluster werden in den Mitochondrien synthetisiert und in mitochondriale Fe/S-haltige Enzyme eingebaut. Cytosolische und nucleare Fe/S-Enzyme werden über eine mitochondriale Export-Maschinerie, die ebenfalls zur ISC gehört, im Cytosol mit dem Fe/S-Cluster beladen. Die ISC aus *S. cerevisiae* ähnelt der ISC aus Bakterien, und es wird vermutet, dass beide Systeme den gleichen Ursprung haben (Mühlenhoff and Lill, 2000). Beim Menschen rührt die neurodegenerative Erbkrankheit Friedreich’s Ataxie, die zu motorischen Ausfällen und Herzversagen führt, von einem Defekt eines Proteins der Fe/S Bioynthesemaschinerie her.

### **5. Matrix-assisted-laser-desorption-time-of-flight (MALDI-TOF)-Analysen**

Allgemein werden Massenspektrometer zur Bestimmung der molekularen Masse einer Substanz eingesetzt (peptide mass fingerprinting). Dabei wird die zu untersuchende Substanz ionisiert und nach ihrem Masse/Ladungs-Verhältnis im feldfreien Raum aufgetrennt. Die Ionen treffen auf einen Detektor, der die

Signale speichert und auswertet. Bei der sogenannten Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) werden die Proben in eine Matrix eingebettet (z.B.  $\alpha$ -cyano-Hydroxy-Zimtsäure oder Sinapinsäure), welche die Laserenergie, die für die Ionisierung und Trennung der Ionen notwendig ist, gleichmäßig an die Probe weiterleitet. Dadurch wird verhindert, dass die Probe durch den direkten Beschuß des Lasers beschädigt wird. Dazu ist es notwendig, dass die Matrix die Wellenlänge des Lasers absorbiert, um diese Energie gleichmäßig an die Probe weiterzuleiten. Das Verhältnis von Probe:Matrix sollte 1:5000 betragen.

In Kombination mit der Matrix Assisted Laser Desorption Ionization wird normalerweise ein Time-of-Flight (TOF) Massenspektrometer verwendet. Dabei wird die Probe ionisiert und die unterschiedlich großen Fragmente werden getrennt. Durch ein starkes elektrisches Feld werden die einzelnen Teilchen beschleunigt, um danach im feldfreien und luftleeren Raum nach ihrer Masse/Ladung aufgetrennt zu werden. Die Zeit zwischen Ionisierung und Auftreffen auf den Detektor wird gemessen. Zur Kalibrierung werden Peptide mit bekannter Größe eingesetzt.

Um ein unbekanntes Protein per MALDI-TOF zu untersuchen, kann man entweder das gesamte Protein ionisieren, was sich aber bei Größen ab 9000 Da als schwierig erweist, oder man zerlegt das Protein in definierte kleinere Peptide. Eine bewährte Methode ist der Verdau mit Trypsin, einer Serin-Protease aus dem Dünndarm. Trypsin schneidet spezifisch an der Carboxylseite von Lysin und Arginin in einem Protein. Durch das Vorhandensein von Prolin an der Carboxylseite wird die Bindung vor einem Verdau geschützt. Dadurch entsteht ein individuelles Muster der einzelnen Peptide eines Proteins, das sich durch Vergleich mit entsprechenden Datenbanken einem bestimmten Protein zuordnen lässt.

## **6. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy**

Bei der EPR-Spektroskopie wird die Wechselwirkung elektromagnetischer Strahlung mit den ungepaarten Elektronen eines Atoms oder Moleküls im Magnetfeld gemessen. Sie wird auch als Elektronenspinresonanz (ESR) bezeichnet. Der Übergang erfolgt unter den Resonanzabsorptionsbedingungen:

$$\Delta E = h \cdot \nu$$

$h$  = Planck'sches Wirkungsquantum

$\nu$  = Frequenz der elektromagnetischen Strahlung

und

$$h \cdot \nu = g_e \cdot \mu \cdot B$$

$g_e = 2,0023$  für ein freies Elektron

$\mu$  = Magnetisches Moment

$B$  = Magnetfeld

Zwei Elektronen, die dasselbe Orbital besetzen weisen einen gegensätzlichen Spin auf, sodass der Gesamtspin null ergibt. Für die EPR-Spektroskopie kommen folglich nur Systeme in Frage, die einen Paramagneten, also ungepaarte Elektronen enthalten. Diese kommen z.B. bei den Übergangsmetallen oder bei Radikalen vor. Ein ungepaartes Elektron verhält sich wie ein rotierender Kreisel, und da sich bewegte Ladungen mit einem Magnetfeld umgeben, führt dies zu einem lokalen Magnetfeld. Da ein ungepaartes Elektron nicht völlig isoliert vorliegt, entstehen Wechselwirkungen der magnetischen Spinmomente mit dem vorhandenen magnetischen Feld (z.B. verursacht durch den Kern). Dies führt zu einer Änderung von  $g_e$ , der dann als g-Wert des Radikals oder Komplexes bezeichnet wird.

$$\Delta E = g \cdot \mu \cdot B$$

$g$  = g-Wert eines Radikals oder Komplexes

Dieser g-Wert ist charakteristisch für bestimmte Verbindungen. Zum Beispiel beträgt der g-Wert der Aconitase aus Schweineherz im  $[3\text{Fe-4S}]^{+2}$ -Zustand 2,01 (Ruzicka and Beinert, 1978). Je nachdem, wie symmetrisch die Umgebung des Clusters aufgebaut ist, können mehrere g-Werte gemessen werden. Ist die Umgebung in alle drei Raumrichtungen gleich, dann erwartet man ein isotropes

Signal  $g_{(\text{iso})}$ , welches in allen drei Raumrichtungen gleich stark ist. Bei axialer Symmetrie sind zwei Raumrichtungen (x- und y-Achse) identisch und man kann zwei g-Werte bestimmen: einen für die Richtung z:  $g(z)$  und einen für die identischen Richtungen x und y ( $g(y) = g(x)$ ).

Die Strahlung, die man bei der EPR-Spektroskopie verwendet, befindet sich im Bereich der Mikrowellen (9-36 GHz). Es wird meist die 1. Ableitung des Absorptionssignals dargestellt. Die am häufigsten benutzte Frequenz beträgt 9 GHz (X-band) und stammt aus der marinen Radar-Technologie. Man verwendet tiefe Temperaturen (bei Messung der Aconitase mit Hilfe flüssigen Heliums), um die Relaxationsprozesse zu minimieren, die zu einer Verkürzung der Lebenszeit der angeregten Zustände und damit zu breiteren Linien führen. Es werden üblicherweise Magnetstärken zwischen 0,3 und 1,5 T verwendet. Auch in Abwesenheit eines äußeren Magnetfeldes kommt es manchmal zu einer Aufspaltung in mehrere Linien. Man bezeichnet dies als Feinstruktur; sie ist auf die Anwesenheit interner Magnetfelder zurückzuführen (zero-field-splitting). Die *Hyperfeinstruktur* beruht auf Wechselwirkungen mit dem Spin des Atomkerns (Protonen), der ebenfalls ein Magnetfeld produziert. Unter *Superhyperfeinstruktur* versteht man die Wechselwirkung mit den Spins der Kerne benachbarter Atome.

Die Aconitase eignet sich gut für EPR-spektroskopische Untersuchungen, da einige Cluster-Formen ungepaarte Elektronenzustände aufweisen. Allerdings ist die Aconitase im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand, der enzymatisch aktiven Form, diamagnetisch und damit für die EPR-Spektroskopie nicht geeignet.

## 7. Mössbauer-Spektroskopie

Bei der Mössbauer-Spektroskopie werden die Kerne mittels  $\gamma$ -Strahlen angeregt. Daher wird sie auch als „nuclear gamma resonance“ Spektroskopie bezeichnet. Diese Methode basiert auf dem Phänomen der rückstossfreien Kernresonanzabsorption für deren Entdeckung Rudolf Mössbauer 1961 den Nobelpreis in Physik (zusammen mit Robert Hofstadter) erhielt. Dabei gibt ein angeregter Kern Energie in Form von  $\gamma$ -Quanten ab, die von einem anderen Kern aufgenommen werden. Ein Teil der Energie verbleibt als Rückstoßenergie beim emittierenden Kern, wodurch sich der Betrag der abgegebenen Energie

vermindert. Man kann diese Rückstoßenergie minimieren, indem man das Atom in ein Kristallgitter einbettet oder die Temperatur stark absenkt. Die Rückstoßenergie verteilt sich dann in Form von Schwingungen über das gesamte Gitter und das Atom erscheint quasi verankert. Für die Mössbauer-Spektroskopie müssen spezielle Isotope verwendet werden; neben  $^{57}\text{Fe}$  können das auch  $^{127}\text{I}$ ,  $^{99}\text{Ru}$  und  $^{197}\text{Au}$  sein.

Das Mössbauer-Isotop  $^{57}\text{Fe}$  ist ein bewährtes Isotop zur Untersuchung biologischer System, da es folgende Eigenschaften besitzt: Langlebige angeregte Kernzustände, hohe rückstoßfreie Kernresonanz und hohe Auflösung in einem engen Resonanzbereich. Durch Mössbauer-Spektroskopie erhält man Aussagen über die Bindung mit anderen Atomen, den Redoxzustand und den Spinzustand des Eisens. Sie hat den Vorteil, dass auch EPR-stumme Signale detektiert werden können. Allerdings kommt  $^{57}\text{Fe}$  in der Natur nur zu 2,2 % vor, weshalb es in biologischen Proben angereichert werden muss, z.B. durch Wachstum des Organismus auf  $^{57}\text{Fe}$ -haltigem Medium. Die Aconitase kann z.B. auch mit  $^{57}\text{Fe}$  reaktiviert werden.

Bei der Messung wird  $^{57}\text{Co}$  als Quelle der  $\gamma$ -Strahlung verwendet.  $^{57}\text{Co}$  zerfällt mit einer Halbwertszeit von 270 Tagen in angeregte  $^{57}\text{Fe}^*$ -Atome. Diese gehen in den Grundzustand über und emittieren dabei  $\gamma$ -Strahlen. Die  $\gamma$ -Quanten werden unter Resonanzbedingungen vom  $^{57}\text{Fe}$  der Probe aufgenommen. Während der Messung bewegt sich die Quelle mit einer geringen Geschwindigkeit relativ zur Probe. Durch den Dopplereffekt kann dadurch die Energie der  $\gamma$ -Strahlen variiert werden.

Die Energie ist definiert als

$$E = E_{\gamma} (1+v/c)$$

$v$  = Geschwindigkeit der Quelle relativ zum Absorber

$c$  = Lichtgeschwindigkeit

$E_{\gamma}$  = Energie der  $\gamma$ -Strahlung

In einem Mössbauer-Spektrum wird die relative Transmission gegen die Geschwindigkeit aufgetragen.



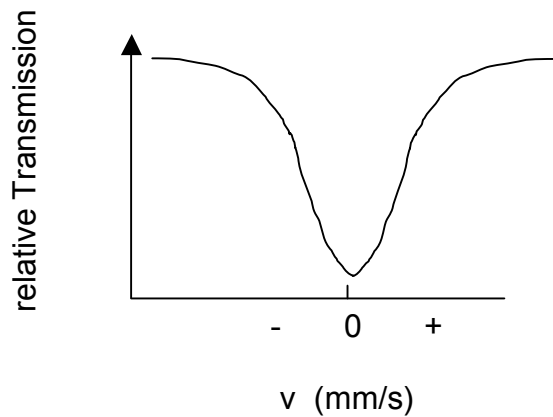


Abb. 7: Mössbauer-Spektrum.

In Abb. 7 ist ein einfaches Mössbauerspektrum dargestellt. Die relative Transmission ist gegen die Geschwindigkeit der Strahlenquelle aufgetragen. Bei einer bestimmten Geschwindigkeit tritt Resonanz auf und die relative Transmission verkleinert sich.

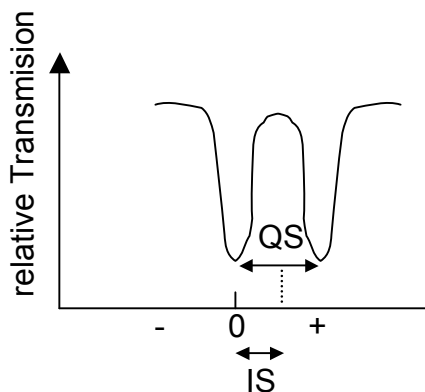


Abb. 8: Mössbauer Spektrum mit Isomer Shift (IS) und Quadrupol Splitting (QS).

Ein Mössbauer Spektrum wird durch 2 Parameter charakterisiert: Isomer Shift (IS) und Quadrupol Splitting (QS) (Isomerenverschiebung und Quadrupolaufspaltung). Der Isomer Shift bezeichnet die Lage des Spektrums auf der Geschwindigkeitsachse im Vergleich zu einem Standard. Er hängt von der Elektronendichte um den Nucleus ab. Die Auftrennung eines Signals in zwei Subspektren (oder eines Dubletts) wird als Quadrupole Splitting bezeichnet. Dieser Wert hängt von der Asymmetrie der Elektronenwolke um den Nucleus ab. Diese beiden Werte sind charakteristisch für unterschiedliche Verbindungen. Durch Anwesenheit eines Magnetfeldes (lokales oder extern angelegtes) kann es zu einer zusätzlichen Aufspaltung kommen. Dadurch werden Informationen über

die Struktur des Kerns erhalten. Neben der EPR-Spektroskopie eignet sich die Mössbauer-Spektroskopie zur Untersuchung der Aconitase besonders gut, da auch der diamagnetische  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand detektiert werden kann.

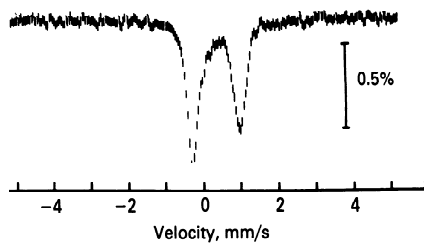


Abb. 9 Mössbauer-Absorptionsspektrum der Aconitase aus Rinderherz im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand (Kent *et al.*, 1982).

In der Abbildung 9 ist das Mössbauer-Absorptionsspektrum der Aconitase aus Rinderherz wiedergegeben. Die Aconitase wurde mit  $^{56}\text{Fe}$  reaktiviert. Die restlichen Fe-Atome des Clusters enthielten  $^{57}\text{Fe}$  in natürlich vorkommender Konzentration (2,2 %). Die Parameter des Dubletts lauten  $\Delta E_Q = 1,30$  mm/s und  $\delta = 0,45$  mm/s und sind charakteristisch für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster (Kent *et al.*, 1982).

## 8. Zielsetzung:

In der vorliegenden Arbeit soll das Enzym charakterisiert werden, welches für die Methylisocitrat-Dehydratase-Aktivität im Methylcitratzyklus von *A. nidulans* verantwortlich ist. Es soll geklärt werden, ob diese Reaktion von zwei Enzymen katalysiert werden kann (Aconitase und Midh) oder ob nur ein Enzym existiert (Aconitase). Falls es ein spezielles Enzym gibt, dann soll dieses isoliert, charakterisiert und das entsprechende Gen identifiziert werden.

## MATERIAL UND METHODEN

### 1. Geräte und Chemikalien

Es wurden folgende Geräte und Zentrifugen verwendet:

Photometer Ultraspec 3300 pro (Amersham Bioscience)

Electrophoresis Power supply EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)

Eppendorf Zentrifuge 5804R mit Ausschwenkrotor, kühlbar

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge (DuPont)

mit SS34 Rotor 4,25 inches

Zur Proteinreinigung mit Hilfe einer FPLC-Anlage von Pharmacia-Biotech (jetzt GE Healthcare, München) wurden folgende Säulenmaterialien benutzt: Q-Sepharose, Phenyl-Sepharose, ResourceQ (Pharmacia) und Reactive Red 120-Agarose (Sigma-Aldrich).

Alle verwendeten Chemikalien hatten, soweit nicht anders angegeben, die Reinheitsstufe „p.a.“ und reinst, und wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich und Fluka (Taufkirchen), Roth (Karlsruhe), BIOMOL (Hamburg), Promega (Mannheim), Applichem (Darmstadt). Die verwendeten Oligonucleotide stammten von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) und die Restriktionsenzyme von der New England Biolabs (Frankfurt a. M.). Nucleotide, Polymerasen und DNA Ladder wurden von der Firma Boline (Luckenwalde) bezogen.

Das  $^{57}\text{Fe}$  wurde von der Firma Chemotrade (Düsseldorf) bezogen. Die EPR-Röhrchen (4 mm EPR tubes CFQ 250 mm) stammten von der Firma RotoTec (Spintec, Remshalden). Die Gummi-Stopfen (7 mm) mit umstülpbaren Rand wurden von der Firma Fisher Scientific GmbH (Schwerte) bezogen.

### 2. Mikroorganismen

#### 2.1 *E. coli*

Zur Transformation wurden Zellen des Stammes XL1-Blue MRF' (Stratagene) verwendet.

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte über das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen). Dabei befindet sich am linearisierten Vektor jeweils ein T-Überhang. Die Taq-Polymerase fügt am 3'-Ende eines PCR-Produktes einen A-Überhang ein. Über diese Überhänge können PCR-Produkt und Vektor miteinander ligieren. Der Vektor besitzt zusätzlich eine Topoisomerase, die die Verknüpfung durchführt und eine weitere Ligase überflüssig macht.

Tab. 2: *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
ANI 60C1_746 Nr.1-4	Cosmidbank von <i>A. nidulans</i> Amp <sup>R</sup>	(Borges-Walmsley <i>et al.</i> , 1995)
ANI 60C1_746 Klon 49	Cosmid mit <i>acoA</i> -Gen aus <i>A. nidulans</i>	diese Arbeit
AcnATG2-RNAup	<i>acoA</i> -Fragment, cDNA in pCR2.1	diese Arbeit
AcoA SwaI/StuI	<i>komplettes acoA</i> -Gen (incl. 1,22 kb upstream, 486 Bp downstream) in pCR2.1	diese Arbeit
AcoA-ArgB	enthält AcoA SwaI/StuI und <i>argB</i> -Gen pCR2.1	diese Arbeit

## 2.2 *Aspergillus nidulans*

Tab. 3: *A. nidulans*-Stämme

Name	Genotyp	Referenz
WG355	<i>argB2; bgA0; biA1</i>	(Brakhage and Turner, 1992)
ΔSREA	wie WG355, aber <i>ΔsreA::argB</i> <sup>+</sup>	(Haas <i>et al.</i> , 1999)
WGTRAN ( <i>wt</i> )	wie WG355, aber <i>argB2::pTran, argB</i> <sup>+</sup>	(Haas <i>et al.</i> , 2003)
AcoA-ArgB Nr. 2-5, 8,10,19-21	WG355 transformiert mit AcoA-ArgB	diese Arbeit
SMI45	<i>yA2, pabaA1; wA3; veA1</i>	(Brock <i>et al.</i> , 2000)

### 3. Oligonucleotide

Tab. 4: verwendete Oligonucleotide

Name	Sequenz 5'-3'
M13 Forward	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
AcnATG2	CAGGCCCTAAGTCCCGTC
AcnATG_RNAdown	GAACACTa*AGCAGCTAACATGG
AcnMitte_RNAup	GTCACGCTCAATGGTAGC
Aconi1N_f	AAGTCTATCTTCACTGTTACTC
Aconi1N_r	GAGGAGCTGAACACGGTCA
AcnMitte_down	GTCCTTGCATTGGACAGTG
AcnStop_up	CCATTAGCAGCTCTAGTACTG
Acn_Nein	CGAGATCAACAAGGAGGTATAC

\* in der Genomsequenz ist an dieser Stelle statt A ein T

### 4. Medien

#### 4.1 Medien für *A. nidulans*

##### 4.1.1 Minimalmedium mit verschiedenen C-Quellen

Für 1 l Medium wurden 50 ml Salzstammlösung und 1 ml Spurenelementlösung gemischt, auf 1 l mit H<sub>2</sub>O dest. aufgefüllt und der pH-Wert mit 10 M NaOH auf 6,5 eingestellt.

Dem Medium wurden eine der folgenden C-Quellen zugesetzt (Endkonzentration in Klammern):

Glucose (50 mM)

Acetat (100 mM)

Propionat/Glucose (100 mM/10 mM)

Acetat/Propionat (50 mM/50 mM)

##### Salzstammlösung 20 ×:

120 g Na-Nitrat

10,4 g KCl

10,4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

30,4 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 1 l mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

Spurenelementelösung (Hutner's trace elements) 1000 ×:

22 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

11 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$

(5 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

1,6 g  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1,6 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1,1 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

50 g EDTA

5 g  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Mit KOH auf pH 6,5-6,8 einstellen

ad 1 l mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$

Tab. 5: Medienzusätze

Zusatz	Stammlösung	Menge pro 1 l Medium
Biotin	0,1 % w/v	1 ml
Arginin	500 mM	10 ml

Biotin und Arginin werden in Wasser aufgelöst und sterilfiltriert.

#### 4.1.2 Medium mit $^{57}\text{Fe}$

Die Herstellung von  $^{57}\text{Fe}$ -haltigem Medium erfolgt wie die Herstellung des Minimalmediums mit einer der C-Quellen. Die Spurenelementelösung enthielt kein Eisen. Das  $^{57}\text{Fe}$  wurde in einer Endkonzentration von 18  $\mu\text{M}$  dem Medium nach Autoklavieren zugesetzt. Das metallische  $^{57}\text{Fe}$  war zuvor 2 Tage in 8 M HCl bei 60 °C aufgelöst worden (1,6 mg  $^{57}\text{Fe}$  in 170  $\mu\text{l}$  HCl = 0,165 Molare Stammlösung).

#### 4.1.3 Agar

Für Festmedien wurde dem Medium Agar mit 2 % Endkonzentration zugesetzt.

#### 4.1.4 Kulturbedingungen

Zur Gewinnung von Konidiensuspensionen wurden 30 µl Konidiensuspension auf Agarplatten mit Minimalmedium ausplattiert und 2 Tage bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden mit dest. H<sub>2</sub>O überschichtet und die Konidien mit Hilfe einer Impföse resuspendiert. Die Konidien wurden entweder bei 4°C als Suspension oder als Glycerinstock (800 µl Konidiensuspension, 200 µl Glycerin) bei -80°C gelagert.

Zur Produktion von Mycel wurden 500 ml Minimalmedium mit ca.  $2 \cdot 10^6$  Konidien beimpft. Bei Wachstum auf Glucose wurden die Kulturen nach 12-18 h geerntet. Bei Wachstum auf Acetat und Propionat wurden die Kulturen nach 40-48 h geerntet. Die Mycelien wurden durch Miracloth-Gaze filtriert und zwischen Papierhandtüchern trockengepresst. Anschließend wurden sie in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

## 4.2 Medien für *E. coli*

### 4.2.1 LB-Medium

10 g Trypticase-Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl mit NaOH auf pH 7 eingestellt.

Tab. 6: Zusätze für die Medien.

Zusatz	Stammlösung
Tetracyclin	15 mg/ml in 70 % Ethanol
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
X-Gal	70 mg/ml in DMF
IPTG	1 M in H <sub>2</sub> O

Ampicillin, Kanamycin und IPTG wurden sterilfiltriert. Die Zusätze wurden dem LB-Medium in einer Verdünnung von 1:1000 nach dem Autoklavieren zugegeben.

#### 4.2.2 Glucosetestreagenz

Um zu testen, ob die Glucose im Medium verbraucht war, wurde das Glucosetestreagenz eingesetzt.

##### Glucosetestreagenz:

130 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,0

POD, Peroxidase aus Merrettich, 400 U

GOD, Glucose Oxidase aus *A. niger*, 800 U

2,2'-Azinobis(3-ethylbenzo-6-thiazolinsulfonsäure), 25 mg

ad 50 ml mit dest. H<sub>2</sub>O

Von einer Kultur wurden 1,5 ml abgenommen, 2 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand mit 0,5 ml Glucosetestreagenz versetzt. Blieb das Testreagenz farblos war die Glucose bereits verbraucht.

## 5. Biochemische Methoden

### 5.1 Messung der Midh-Aktivität

#### 5.1.1 Messung der Midh-Aktivität bei 340 nm

Die Extinktionsänderung wird als Konzentrationsänderung mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt:

$$\Delta E = \varepsilon \cdot \Delta c \cdot d$$

$\Delta E$  = Extinktionsänderung

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

$\Delta c$  = Konzentrationsänderung in mM

$d$  = Schichtdicke in cm

Die Aktivität wird als Konzentrationsänderung pro Zeit beschrieben

$$A = \Delta c / \Delta t$$

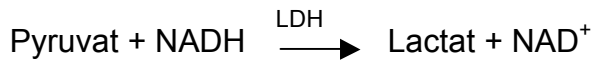
$A$  = Aktivität in U

$\Delta c$  = Konzentrationsänderung

$\Delta t$  = Zeit



Die Einheit U (Unit) ist definiert als Stoffumsatz in  $\mu\text{mol}$  pro min.



PrpB = Methylisocitrat Lyase aus *E. coli*

LDH = Lactat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel

Der Standard-Assay enthielt folgende Komponenten:

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,2 mM NADH

2 mM Methyl-*cis*-aconitat

2 mM  $\text{MgCl}_2$

0,3 mM DTT

2  $\mu\text{l}$  LDH, ca. 1 U

6  $\mu\text{l}$  PrpB, ca. 0,2 U

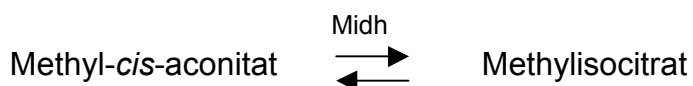
Probe 0,01-0,04 U

Die Komponenten wurden gemischt und die Reaktion durch Zugabe der Midh gestartet. Die Reaktion wurde bei 340 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient für NADH beträgt  $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ . Test verändert nach (Cornforth *et al.*, 1970).

Problem:

NADH-Oxidasen, besonders im Rohextrakt nach Wachstum auf Glucose können den Test stören.

### 5.1.2 Messung der Midh-Aktivität bei 240 nm



ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,25 mM Methyl-*cis*-aconitat

Probe 0,01-0,04 U

oder

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

2 mM Methylisocitrat (racemisches Gemisch)

Probe 0,01-0,04 U

Die Messung erfolgte nach Zugabe der Mith bei 240 nm. Der Extinktionskoeffizient für Methyl-*cis*-aconitat beträgt  $\epsilon = 4,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Aoki *et al.*, 1995).

Problem: Da Proteine auch bei 240 nm absorbieren ist die maximal einsetzbare Probenmenge limitiert.

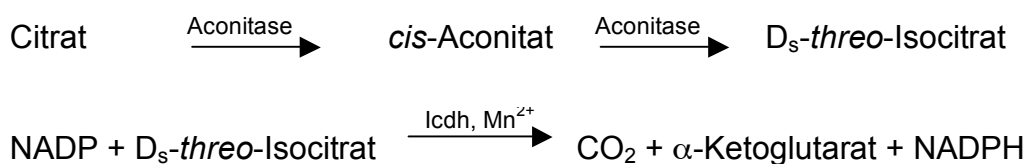
## 5.2 Vorbereitung des Substrates Methylisocitrat:

Das Substrat Methylisocitrat muss zunächst vorbereitet werden. Dazu wurden 20 mg (2*S*-3*R*-; 2*R*-3*S*-)Methylisocitrat-Lacton in 250  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Lösung wurden 250  $\mu\text{l}$  KOH (1M) zugesetzt und 15 min. bei 95° erhitzt. Der Lactonring öffnet sich unter alkalischen Bedingungen. Durch die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  KPP pH 7,0 (1 M) wurde die Lösung neutralisiert. Die entstandene Lösung enthielt ca. 50 mM je Isomer.

## 5.3 Messung der Aconitase-Aktivität

### 5.3.1 Messung der Aconitase-Aktivität bei 340 nm

Verändert nach (Rose and O'Connell, 1967)



Icdh = Isocitrat Dehydrogenase aus Schweineherz

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

2 mM NADP

2 mM *cis*-Aconitat \*

2 mM MnCl<sub>2</sub>

0,3 mM DTT

2 µl Icdh (1 U)

Probe 0,01-0,04 U

\*Alternativ wurden 2 mM Citrat eingesetzt.

Die Isocitrat Dehydrogenase aus Schweineherz (500 U, 6,3 U/mg solid, Aconitase-frei, Sigma) lag in lyophilisierter Form vor. Es wurden Portionen zu je 2,5 mg eingefroren und diese vor der Messung aufgetaut und mit 30 µl Puffer versetzt (50 mM Tris-HCl, pH 7,5). Die Lösung war max. 1 Tag haltbar.

Die Reaktion wird durch Zugabe der Aconitase-Probe gestartet und bei 340 nm gemessen. Der Extinktionskoeffizient für NADPH beträgt  $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

### 5.3.2 Messung der Aconitase-Aktivität bei 240 nm

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,25 mM *cis*-Aconitat

0,01-0,04 U Probe

Die Reaktion wird durch Zugabe von Aconitase gestartet und bei 240 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{240}$  beträgt  $4,1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Test nach (Aoki *et al.*, 1995).

### 5.4 Messung der Methylcitrat Dehydratase-Aktivität



McdH = Methylcitrat Dehydratase

ad 1 ml:

50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0

2,5 mM Methylcitrat (aus enzymatischer Synthese)

Probe 0,01-0,04 U

Die Reaktion wird durch Zugabe von McdH gestartet und bei 240 nm verfolgt. Der Extinktionskoeffizient  $\epsilon_{240}$  beträgt  $4,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Test nach (Tabuchi *et al.*, 1981).

### 5.5 Reinigung der Midh aus dem Stamm $\Delta$ SREA

Der Stamm  $\Delta$ SREA wurde auf Propionat/Glucose-Medium (100 mM/10 mM) angezogen. Ca. 12 g Mycel wurden in flüssigem Stickstoff gemörstert und in 50 mM KPP pH 7,1 aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension bei  $27\,000 \times g$  bei  $4^\circ \text{C}$  für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur 40 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt (243 g/l) und 30 min auf Eis gerührt. Nach Zentrifugation ( $10\,000 \times g$ ,  $4^\circ \text{C}$ , 10 min) wurde der Überstand abgenommen und bis zu einer 80 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt (285 g/l). Nach erneuter Zentrifugation ( $10\,000 \times g$ ,  $4^\circ \text{C}$ , 10 min) befand sich die Midh im Präzipitat. Dieses wurde in 50 mM KPP, pH 7,1 aufgenommen und über Chromatographie über eine Phenylsepharose-Säule gereinigt.

#### Programm Phenylsepharose (30 ml Bettvolumen):

Puffer A: 50 mM KPP, pH 7,1

Puffer B: 50 mM KPP, pH 7,1; 1 M Ammoniumsulfat

Probenauftragung

0 - 30 ml: Spülen mit 100 % Puffer B (= 1 M Ammoniumsulfat)

30 - 260 ml: Gradient bis 0 % Puffer B

230 - 260 ml: 0 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min

Schreibervorschub: 0,1 cm/ml

Fraktionsgröße: 4,5 ml

Die Midh eluierte zwischen 80 und 70 % Puffer B.

Die aktiven Fraktionen wurden eingengt und über Millipore Filtereinheiten (MWO 30 kD) in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 umgepuffert. Anschließend wurde die Enzymlösung über Q-Sepharose (Anionentauscher-Material) aufgetrennt.

Programm Q-Sepharose (25 ml Bettvolumen):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 mM NaCl

Probenauftrag

0 - 30 ml: Spülen mit Puffer A

30 - 260 ml: Gradient bis 100 % Puffer B

260 - 290 ml: 100 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min

Schreibervorschub: 0,1 cm/ml

Fraktionsgröße: 4,5 ml

Die Midh eluierte zwischen 20 und 30 % Puffer B.

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und über Millipore Filtereinheiten (MWO 30 kD) auf 800 µl eingengt. Anschließend wurde die Enzymlösung mit 50 mM Tris-HCl pH 8,0 auf 1 ml aufgefüllt und chromatographisch über eine ResourceQ-Säule aufgetrennt.

Programm ResourceQ (1 ml Bettvolumen):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M NaCl

Probenauftragung über Probenschleife (1 ml)

0 - 5 ml: Spülen mit Puffer A

5 - 35 ml: Gradient bis 30 % Puffer B

35 - 45 ml: 100 % Puffer B

45 - 50 ml: 100 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 2 ml/min

Schreibervorschub: 0,5 cm/ml

Fraktionsgröße: 1,5 ml

Die aktiven Fraktionen wurden über Millipore Filtereinheiten (MWO 30 kD) in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert. Abschließend wurde eine Chromatographie über Reactive Red 120 Säulenmaterial (immobilisiert an crossed-linked 4 % beaded Agarose, type 3000, Sigma-Aldrich) durchgeführt.

Programm Reactive Red (5 ml Bettvolumen):

Puffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M NaCl

Probenauftragung

0 - 5 ml: Spülen mit Puffer A

5 - 30 ml: Gradient bis 100 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 1,5 ml/min

Schreibervorschub: 0,5 cm/ml

Fraktionsgröße: 1,5 ml

Die Midh eluierte nach Spülen mit Puffer B. Die aktiven Fraktionen wurden auf 250 µl eingengt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

## **5.6 Reinigung der Aconitase aus dem Stamm $\Delta$ SREA**

Zur Reinigung der Aconitase wurde der Stamm  $\Delta$ SREA auf 100 mM Acetat kultiviert. Nach Ernte wurden ca. 9 g Mycel durch Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgeschlossen und in 50 mM KPP pH 7,0 mit 1 mM Citrat (Tri-Na-Citrat) aufgenommen. Die Ammoniumsulfatfällung und die Chromatographie über die Phenylsepharose-Säule erfolgte wie unter 5.5 Reinigung der Midh beschrieben. Anschließend wurden die aktiven Fraktionen eingengt und in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 1 mM Citrat umgepuffert. Die Enzymprobe wurde chromatographisch über ResourceQ-Material aufgetrennt:

Programm ResourceQ (1 ml Bettvolumen):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM Citrat

Puffer B: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 0,5 M NaCl; 1 mM Citrat

Probenauftragung

0 - 5 ml: Spülen mit Puffer A

5 - 40 ml: Gradient bis 30 % Puffer B

40 - 50 ml: Gradient bis 100 % Puffer B

50 - 55 ml: Spülen mit Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 2 ml/min

Schreibervorschub: 0,5 cm/ml

Fraktionsgröße: 1,5 ml

Die aktiven Fraktionen wurden eingengt und in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 umgepuffert.

Die abschließende Chromatographie über Reactive Red erfolgte wie unter 5.5 Reinigung der Midh beschrieben. Die aktiven Enzymfraktionen wurden auf 200 µl eingengt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **5.7 Reinigung der Midh aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20**

Für die Reinigung wurden 9 g des Stammes AcoA-ArgB 20 (Acetat-gewachsen) gemörsert und in 50 ml 50 mM KPP pH 7,2 aufgenommen. Die Suspension wurde 20 min bei 15 000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 40 % (243 g/l) zugesetzt, für 30 min auf Eis gerührt und anschließend zentrifugiert (10 000 rpm, 12 min).

Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 80 % (285 g/l) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (10 000 rpm, 12 min) befand sich die Midh im Präzipitat. Dieses wurde in 7-10 ml KPP aufgenommen und über eine Phenylsepharose-Säule aufgetrennt.

Programm Phenylsepharose (30 ml Bettvolumen):

Puffer A: 50 mM KPP, pH 7,2

Puffer B: 50 mM KPP, pH 7,2; 1 M Ammoniumsulfat

Probenauftragung

0 - 40 ml: Spülen 100 % Puffer B (= 1 M Ammoniumsulfat)

40 - 50 ml: Gradient bis 70 % Puffer B

50 - 110 ml: Gradient bis 57 % Puffer B

110 - 120 ml: 57 % Puffer B

120 - 170 ml: Gradient bis 45 % Puffer B

170 - 180 ml: 45 % Puffer B

180 - 200 ml: Gradient bis 0 % Puffer B

200 - 230 ml: 0 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min

Schreibervorschub: 0,1 cm/ml

Fraktionsgröße: 4,5 ml

Die Midh eluierte typischerweise zwischen 0,57 und 0,45 % Puffer B.

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt und über Millipore Filtereinheiten (MWO 30 kD) umgepuffert. Dazu wurden die Proben auf 1 ml ankonzentriert und auf 8 ml mit 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0 aufgefüllt. Anschließend wurden sie erneut auf 1 ml ankonzentriert und auf ca. 4 ml mit Puffer aufgefüllt. Daraufhin erfolgte die Auftrennung über Q-Sepharose in einer Anionentauscher-Chromatographie.

Programm Q-Sepharose (Bettvolumen 25 ml):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl

Probenauftragung

0 - 20 ml: Spülen mit Puffer A

20 - 40 ml: Gradient bis 20 % Puffer B

40 - 140 ml: Gradient bis 40 % Puffer B

140 - 160 ml: bis 100 % Puffer B

160 - 180 ml: Puffer B



Flussgeschwindigkeit: 3 ml/min

Schreibervorschub: 0,1 cm/ml

Fraktionsgröße: 4,5 ml

Die Midh eluierte typischerweise zwischen 20 und 30 % Puffer B (= 0,1 - 0,15 M NaCl)

Die aktiven Fraktionen wurden gesammelt, eingengt und in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert. Die Probe wurde auf 1 ml aufgefüllt und anschließend über eine ResourceQ-Säule aufgetrennt.

Programm ResourcesQ (Bettvolumen 1 ml):

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,5 M NaCl

Probenauftrag über Probenschleife (1 ml)

0 - 5 ml: spülen mit Puffer A

5 - 40 ml: bis 20 % Puffer B

40 - 50 ml: bis 100 % Puffer B

50 - 60 ml: 100 % Puffer B

Flussgeschwindigkeit: 2 ml/min

Schreibervorschub: 0,5 cm/ml

Fraktionsgröße: 1,5 ml

Die Midh eluierte typischerweise zwischen 8 und 15 % Puffer B (= 0,04 - 0,075 M NaCl)

Die aktiven Fraktionen wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert und auf 600 µl eingengt.

Anschließend erfolgte die Auftrennung über Reactive Red 120 Säulenmaterial (immobilisiert an cross-linked 4 % beaded agarose type 3000, Sigma-Aldrich)

Programm Reactive Red (5 ml):

Puffer A: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7,5

Puffer C: 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 0,5 mM NaCl

0 - 5 ml: Spülen mit Puffer A

5 - 15 ml: Spülen mit Puffer B (Elution der Methylcitrat Dehydratase)

15 - 25 ml: Spülen mit Puffer C (Elution der Midh)

Flussgeschwindigkeit: 1,5 ml/min,

Schreibervorschub: 0,5 cm/ml

Fraktionsgröße: 1,5 ml

Die Midh eluierte beim Spülen mit Puffer C.

Die aktiven Fraktionen wurden eingengt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte ebenfalls in flüssigem Stickstoff.

### **5.8 Anreicherung der Midh**

Die Anreicherung stellt eine verkürzte Reinigung dar. Nach der Auftrennung über Phenylsepharose besaß AcoA noch überwiegend Aconitaseaktivität.

Die Mycelien wurden wie unter 5.7 beschrieben aufgeschlossen und eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Die Enzymfraktion wurde auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen und mit dem gleichen Programm wie dort beschrieben aufgereinigt.

Anschließend wurden die Proben in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 umgepuffert (über Millipore-Filtereinheiten) und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **5.9 $K_m$ -Wert-Bestimmung**

Für die  $K_m$ -Wert-Bestimmung wurde angereicherte, bzw. reaktivierte AcoA verwendet, bei der das Verhältnis Midh-/Aconitaseaktivität ca. 1:1 betrug.

#### **5.9.1 *cis*-Aconitat**

Das Substrat *cis*-Aconitat (*cis*-Acotinsäure, Sigma) wurde in einem Maßkolben eingewogen (10 mM) und mit Wasser aufgefüllt. Nach serieller Verdünnung wurden konstante Volumina von 20  $\mu$ l unterschiedlicher Konzentrationen zum Testansatz zugegeben. Die Substratkonzentration im Test betrug zwischen 0,01-0,2 mM und die Aktivitäten wurden im direkten Test bei 240 nm gemessen.

Im Assay befanden sich ca. 0,03 U AcoA (gemessen bei 240 nm mit *cis*-Aconitat unter  $V_{max}$ -Bedingungen).

### 5.9.2 Isocitrat

Das Substrat DL-Isocitrat (10 mM) wurde in einem Maßkolben eingewogen und mit Wasser aufgefüllt.

Es wurden je 200 µl Substrat verschiedener Konzentrationen (0,025 - 0,5 mM Endkonzentration des D-Isomers) zum Testansatz gegeben. Die Aktivitäten wurden im direkten Test gemessen.

Im Assay befanden sich ca. 0,03 U AcoA (gemessen bei 240 nm mit *cis*-Aconitat). Da nur das D-Isomer umgesetzt wird, beträgt die effektive Substratkonzentration nur 50 % der eingewogenen Konzentration.

### 5.9.3 Citrat

Tri-Natriumcitrat wurde in einem Maßkolben eingewogen (10 mM) und mit Wasser aufgefüllt.

Pro Test wurden 50 µl Substrat unterschiedlicher Konzentrationen (0,075 - 0,5 mM Endkonzentration) zugegeben. Die Aktivitäten wurden im direkten Test bei 240 nm gemessen.

Im Assay befanden sich ca. 0,03 U AcoA (gemessen bei 240 nm mit *cis*-Aconitat).

### 5.9.4 Methyl-cis-aconitat

Methyl-*cis*-aconitat wurde in Wasser verdünnt und die Konzentration wurde enzymatisch in einem gekoppelten Test mit Mdh und Isocitrat Dehydrogenase bestimmt.

Pro Test wurden 20 µl Substrat unterschiedlicher Konzentrationen (0,02 - 0,1 mM Endkonzentration) zugegeben. Die Aktivitäten wurden im direkten Test gemessen.

Im Assay befanden sich ca. 0,03 U AcoA (gemessen bei 240 nm mit *cis*-Aconitat).

### 5.9.5 Bestimmung der Methyl-cis-aconitat-Konzentration

Der Ansatz enthielt folgende Komponenten:

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,2 mM NADH

2 mM MgCl<sub>2</sub>

0,3 mM DTT

2  $\mu$ l LDH, ca. 0,2 U

6  $\mu$ l PrpB, ca. 0,2 U

AcoA, ca. 0,5 U

Die Extinktion bei 340 nm wurde notiert und dann die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. 10  $\mu$ l einer ca. 4 mM Stammlösung Methyl-*cis*-aconitat wurden als Substrat zugegeben.

Sobald die Reaktion beendet war, wurde die Differenz der Anfangs- von der Endextinktion gebildet und die Konzentration berechnet.  $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

#### *5.9.6 Methylisocitrat*

Methylisocitrat wurde wie unter 5.2 beschrieben vorbereitet. Die Konzentration wurde enzymatisch über PrpB und LDH bestimmt (siehe 5.8.7).

Es wurden jeweils 50  $\mu$ l Substrat unterschiedlicher Konzentrationen (0,02 - 0,13 mM Endkonzentration) zugegeben. Die Aktivitäten wurden im direkten Test gemessen.

Im Assay befanden sich ca. 0,03 U AcoA (gemessen bei 240 nm mit *cis*-Aconitat).

#### *5.9.7 Bestimmung der Methylisocitrat-Konzentration*

Der Ansatz enthielt folgende Komponenten:

ad 1 ml:

50 mM Tris-HCl pH 7,5

0,2 mM NADH

2 mM MgCl<sub>2</sub>

0,3 mM DTT

2  $\mu$ l LDH, ca. 0,2 U

6  $\mu$ l PrpB, ca. 0,2 U

Die Extinktion bei 340 nm wurde notiert und die Reaktion durch Zugabe von Substrat gestartet. Als Substrat dienten 10  $\mu$ l der 1:10 Verdünnung (ca. 2,5 mM (2*R*, 3*S*)-2-Methylisocitrat) der Stammlösung. Sobald die Reaktion beendet war, wurde die Differenz der Anfangs- von der Endextinktion gebildet und die Konzentration berechnet.

$\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 5.10 Anreicherung der Aconitase aus Schweineherz (*Sus scrofa domestica*)

Ein Schweineherz wurde im dreifachen Volumen Citratpuffer pH 5,8 (4 mM) in einem Mixer (Ultraturax) zerkleinert und 20 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde bei 5°C mit 90 % Aceton versetzt, bis der Überstand 45 % (v/v) Aceton enthielt. Diese Lösung wurde 20 min bei 5°C inkubiert und anschließend 20 min zentrifugiert (4°C, 16 000 × g). Das Sediment wurde lyophilisiert und eingefroren. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden 0,2 g in 1 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,5 aufgenommen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert.

### 5.11 Bestimmung des Sulfidgehalts

Prinzip:

Das Protein wird über ein alkalisches Medium denaturiert. Sulfid präzipitiert zusammen mit  $Zn(OH)_2$  als  $ZnS$ . Nach Ansäuerung bildet sich  $H_2S$ , welches unter oxidierenden Bedingungen ( $FeCl_3$ ) mit 2 Molekülen DMPD-2HCl (N,N'-dimethyl-*p*-phenylen-diamin-dihydrochlorid) zu Methylenblau kondensiert (Fogo and Popowski, 1949).

Lösungen:

Zinkacetat, 1 % w/v, frisch hergestellt aus 10 %iger Stammlösung

NaOH, 7 % w/v

DMPD 2 HCl, (N,N'-dimethyl-*p*-phenylen-diamin-dihydrochlorid), 0,1 % w/v in 5 M HCl

$FeCl_3$ , 10 mM in 1 M HCl

Sulfidstandard, 2 mM

Der Sulfidstandard wurde aus  $Na_2S \cdot 9H_2O$  hergestellt. Dazu wurde ein ausreichend großer (5-15 g) Kristall mit Wasser abgespült und in Papier getrocknet. Die Masse des Kristalls wurde bestimmt und der Kristall zerkleinert. Anschließend wurde er möglichst vollständig in 1 l 10 mM NaOH-Lösung überführt, die vorher durch Stickstoff 10-15 min anaerobisiert worden war. Aus der (errechneten) Konzentration dieser Stammlösung wurde eine Verdünnung

von  $\approx 2$  mM hergestellt. Die Konzentration dieser Verdünnung wurde iodometrisch bestimmt (s.u.).

Problem:

Manchmal kommt es zu einer schwächeren Reaktion, wenn Sulfidstandard zu den Enzymproben gegeben wird. Das liegt an Proteinpräzipitaten oder an Schwermetallen, die die Ausbildung an Methylenblau behindern. Daher werden, neben den Proben zur Bestimmung der Sulfidkonzentration, auch Proben vorbereitet, denen 10 und 20  $\mu\text{l}$  Standard zugesetzt werden, um einen Korrekturfaktor zu erhalten. Nach Ansäuerung bildet sich  $\text{H}_2\text{S}$ , welches sehr flüchtig ist, daher sollte zügig pipettiert werden. Durch längere Inkubation mit der alkalischen Zink-Lösung kann es zur Bildung von Sulfid aus Cysteinen kommen. Sulfid wird an Sauerstoff oxidiert, wodurch das Gewicht beim Einwiegen verfälscht wird.

Messung:

Es wurden folgende Proben vorbereitet:

- 3 verschiedene Volumina einer Proteinprobe
- 2 Blindwerte
- 2 Proteinproben mit jeweils 10 bzw. 20  $\mu\text{l}$  Sulfidstandard

Die unterschiedlichen Ansätze wurden auf jeweils 200  $\mu\text{l}$  mit  $\text{H}_2\text{O}$  dest. aufgefüllt.

Anschließend wurden nacheinander jeweils 600  $\mu\text{l}$  Zinkacetat und 50  $\mu\text{l}$  NaOH zugesetzt und durch Umschwenken gemischt. Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 10 s bei 1000 rpm in der Mikrozentrifuge.

Die nächsten Schritte werden nacheinander je Cup ausgeführt, um den Verlust an Sulfid zu minimieren.

Zuerst wurden 150  $\mu\text{l}$  DMPD-HCl-Lösung zugegeben, wobei vorsichtig über pipettieren gemischt wurde. Anschließend wurden sofort 150  $\mu\text{l}$   $\text{FeCl}_3$ -Lösung zugegeben, das Cup geschlossen und für 20 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (5000 rpm, 5 min in der Mikrozentrifuge) wurde die Extinktion bei 670 nm gemessen.

### 5.11.1 Iodometrische Bestimmung des Sulfidstandards

Da die gravimetrische Konzentrationsbestimmung von Sulfid wegen des hygroskopischen Charakters zu ungenau ist, wurde die Konzentration iodometrisch bestimmt.

#### Lösungen:

Natriumthiosulfat, ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ), 45 mM in Wasser

KI-Lösung, 300 mM KI gelöst in Wasser

Iod, ( $\text{I}_2$ ) (sublimiert), 40 mM gelöst in 300 mM KI-(Kaliumiodid)-Lösung

Stärkeindikator, 0,35 g auf 70 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , aufkochen, unter Rühren abkühlen lassen, unlöslichen Bestandteile abzentrifugieren

Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 2N

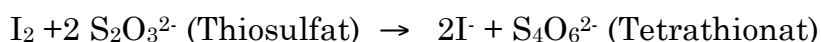
Sulfidstandard, ( $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ) ca. 2 mM (siehe 5.11)

#### Messung:

##### 1. Titration

Eine Bürette (25 ml) wurde mit Natriumthiosulfatlösung gefüllt. In einem 100 ml Erlenmeyerkolben wurden 25 ml  $\text{H}_2\text{O}$  mit 5 ml Iod-Lösung und 1 ml Schwefelsäure gemischt. Der Erlenmeyerkolben wurde auf ein weißes Blatt Papier auf einem Magnetrührer unter die Bürette gestellt. Unter Rühren wurde die Natriumthiosulfatlösung titriert, bis die Lösung fast farblos erscheint (nach ca. 8,5 ml). Anschließend wurden 0,5 ml Stärkeindikator zugegeben und weiter titriert, bis die Lösung farblos ist. Das verbrauchte Volumen an Natriumthiosulfat wurde abgelesen. Die Titration wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Die Reaktion hat folgende Stöchiometrie:

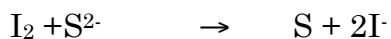


##### 2. Titration

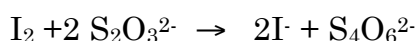
Zur Bestimmung des Sulfidstandards wurden in einem 100 ml Erlenmeyerkolben 60 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 ml Iodlösung und 25 ml Sulfidstandard gemischt. Die Titration mit

Natriumthiosulfat erfolgte wie oben beschrieben (ca. 4 ml wurden benötigt). Die Messung wurde zweimal durchgeführt.

Der erste Teil der Reaktion hat folgende Stöchiometrie:



Das restliche Iod wird mit dem Thiosulfat gegentitriert



Es werden also 2 Teile Thiosulfat pro 1 Teil Iod benötigt aber nur 1 Iod pro Sulfid verbraucht.

Zunächst berechnet man den Verbrauch an Thiosulfat in mmol (1. Titration), diesen Wert teilt man durch 2 und erhält den Wert für das vorhandene Iod. Bei der Mischung des Standards mit Iod (2. Titration) wird ein Teil des Iods zu Iodid reduziert. Das restliche Iod wird mit Thiosulfat gegentitriert. Man errechnet die Differenz der Volumina der ersten zur zweiten Titration und erhält den Wert an Iod, der durch das Sulfid verbraucht wurde.

Da die Stöchiometrie Iod zu Sulfid 1:1 ist, entspricht die restliche Menge an Iod direkt der zugesetzten Menge an Sulfid. Da man das zugegebene Volumen an Sulfid kennt, lässt sich die Konzentration direkt berechnen (Vogel, 1961).

## 5.12 Eisenbestimmung mit Feren

Prinzip:

Bei der Eisenbestimmung nach Lovenberg wird das gebundene Eisen durch verdünnte Salzsäure freigesetzt. Die überschüssige Säure wird durch Ammoniumacetat neutralisiert. Durch Ascorbinsäure wird das  $\text{Fe}^{3+}$  zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert, welches mit dem Eisenchelator (Feren) einen blauen Komplex bildet (Lovenberg *et al.*, 1963).

### Lösungen:

HCl, 1 % w/v

Ammoniumacetat, 7,5 % w/v

SDS, 2,5 % w/v

Ascorbinsäure, 4 % w/v (frisch ansetzen)



Feren, (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(5-sulfo-2-furyl)-1,2,4-triazin, di-Na-Salz·3 H<sub>2</sub>O, 1,5 % w/v

Eisen-Standard, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Mohrsches Salz), 0,008 % w/v (frisch angesetzt) (= 0,204 mM)

Messung:

Es wurden folgende Proben vorbereitet:

3 verschiedene Volumina einer Proteinprobe

2 Blindwerte

10, 25, 50 und 100 µl des Eisenstandards (2-20 nm Fe)

Die Proben wurden auf jeweils 100 µl mit H<sub>2</sub>O dest. aufgefüllt. Anschließend wurden 100 µl der 1 %igen Salzsäure zugegeben und durch Schütteln gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden auf 80°C für 10 min erhitzt. Nach Abkühlung wurden nacheinander folgende Lösungen zugegeben und nach jedem Schritt gemischt:

500 µl Ammoniumacetat

100 µl Ascorbinsäure

100 µl SDS

100 µl Feren

Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (5000 rpm, 5 min in der Mikrozentrifuge) und die Absorption bei 593 nm gemessen.

### **5.13 Reaktivierung der Aconitase**

98,3 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (Mohrsches Salz) und 136 mg Cystein-Hydrochlorid·H<sub>2</sub>O wurden zu 45 ml dest. H<sub>2</sub>O gegeben und durch Begasung mit Stickstoff anerobisiert. Im Abstand von 5 min wurden 500 µl 1N NaOH zugegeben, bis sich die Lösung bernsteinfarben verfärbte. Über pH-Stäbchen wurde der pH-Wert kontrolliert. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde die Lösung auf 50 ml mit anerobem Wasser aufgefüllt und weitere 10 min mit Stickstoff begast.

Zur Reaktivierung wurde die Probe mit der Reaktivierungslösung 1:1 gemischt und 20-40 min unter Stickstoffatmosphäre inkubiert (Fansler and Lowenstein,

1969). Zur Messung wurden Volumina von 2-20  $\mu\text{l}$  entnommen und direkt in den Testansatz pipettiert. Bei größeren Volumina stört die Verfärbung des Reaktivierungsmix unter Sauerstoffeinwirkung die Aktivitätsbestimmung, sodass eine Entsalzung über Sephadex-Säulen erforderlich war (siehe 5.14 Umpufferung über NAP-Säulen).

Der Reaktivierungsmix ist max. einen Tag haltbar.

#### *5.13.1 Reaktivierung mit $^{57}\text{Fe}$*

Um die Aconitase mit  $^{57}\text{Fe}$  für die Mössbauer Spektroskopie zu reaktivieren, wurde das  $^{57}\text{Fe}$ -Eisenblech mit einer Zange zerteilt und 2,1 mg in 180  $\mu\text{l}$  25 %iger HCl für 2 Tage bei 60 °C inkubiert. Zu 500  $\mu\text{l}$  dest.  $\text{H}_2\text{O}$  wurden 25  $\mu\text{l}$  der  $^{57}\text{Fe}$ -Lösung und 16,3 mg Cystein-Hydrochlorid gegeben. Die Lösung wurde anerobisiert, mit 10  $\mu\text{l}$  Ammoniak (25 %) versetzt und mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt. Die Reaktivierung erfolgte wie mit dem Reaktivierungsmix (siehe 5.13).

#### **5.14 Umpufferung über Sephadex G-25 Säulen (NAP-Säule)**

Um Enzymproben umzupuffern wurden Sephadex G-25 Säulen (Amersham Bioscience) verwendet. Dazu wurde die Säule mit 8 ml Puffer gespült. Die Probe wurde auf 1 ml eingengt und auf die Säule aufgetragen. Zur Elution wurden 1,5 ml Puffer auf die Säule gegeben und das Eluat aufgefangen. Die Säule wurde mit 8 ml Puffer regeneriert.

#### **5.15 Dialyse gegen *o*-Phenanthrolin**

Zur Dialyse gegen *o*-Phenanthrolin (1,10-Phenanthroliniumchlorid Monohydrat, Riedel-de Haën, Seelze) wurde eine Enzymprobe nach Anreicherung in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 über Sephadex-Säulen umgepuffert (siehe 5.14) und gegen 250 ml Tris-HCl, pH 7,5 mit 1 mM *o*-Phenanthrolin dialysiert. Als Dialysegefäße wurden Roti-Elutionsgefäße (Roth, MWCO: 3500) verwendet. Die Dialyse erfolgte über einen Zeitraum von 12 h.

#### **5.16 Dialyse gegen EDTA**

Für die Dialyse gegen EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure, Sigma-Aldrich) wurde eine angereicherte Enzymprobe von 100-300  $\mu\text{l}$  (30 - 50 mg/ml) gegen

500 ml Tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 mit 2 mM EDTA für ca. 12 h dialysiert. Alternativ wurde die Probe gegen 500 ml Tris-HCl, 200 mM, pH 7,5 mit 4  $\mu$ M EDTA dialysiert.

### 5.17 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zur Überprüfung der Reinigung von Proteinen aus Rohextrakten wurden die einzelnen Fraktionen auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mit Coomassie-Brilliantblau R350 gefärbt. Die Proben (1-20  $\mu$ g) wurden mit 20  $\mu$ l SDS-Probenpuffer versetzt und aufgeköcht. Die Herstellung der Gele erfolgte nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970).

Tab. 7: Zusammensetzung der SDS-Gele (für jeweils ein Gel).

Komponente	Trenngel 15 % (10%)	Sammelgel 15 % (10%)
1 M Tris HCl pH 8,8	1,5 ml	-
1 M Tris HCl pH 6,8	-	0,47 ml
H <sub>2</sub> O	1,35 ml (2,25 ml)	2,9 ml
10 % SDS	85 $\mu$ l	40 $\mu$ l
Acrylamid/Bisacrylamid (40%/2%) (Biorad)	2,75 ml (1,83)	0,61 ml
5 % Temed	85 $\mu$ l	40 $\mu$ l
10 % Ammonium- Peroxydisulfat	115 $\mu$ l	77 $\mu$ l

Die Werte in Klammern gelten für ein 10 %iges Trenngel.

#### 10 × Elektrodenpuffer:

250 mM Tris-HCl pH 8,3

1,92 M Glycin

1 % SDS

#### SDS-Probenpuffer:

125 mM Tris/HCl pH 6,8

4 % SDS (w/v)

10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,25 % Bromphenolblau (w/v)

Der Puffer wurde vor Verwendung 1:10 in dest. H<sub>2</sub>O verdünnt.

Färbelösung:

0,1 % Coomassie-Brillantblau R350

7 % (v/v) Essigsäure

14 % (v/v) Methanol

Entfärber:

7,1 % (v/v) Essigsäure

5 % (v/v) Ethanol

Einstellung des Power Supply:

120 mV für Einlaufen in das Sammelgel

240 mV für die Auftrennung im Trenngel

bei max. 50 mA

### **5.18 Proteinbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Enzymproben und zwei Blindwerte auf 100 µl mit dest. H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 900 µl Bradford Reagenz (Sigma) versetzt. Als Standard wurde BSA Standard (1 mg/ml in 0,15 NaCl, 0,05 % NaN<sub>3</sub>, Sigma) verwendet, der auf 0,1 mg/ml verdünnt wurde. Im Test wurden 10, 20, 30 und 40 µl dieser Verdünnung eingesetzt und ebenfalls auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach Zugabe des Bradford Reagenz wurden die Proben gemischt und 10-30 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Durch die Berechnung der Steigung der Eichgeraden kann über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration der Proteinproben bestimmt werden.

### **5.19 MALDI-TOF-Messung**

#### *5.19.1 Vorbereitung der Proben für die MALDI-TOF-Messung*

Für die Bestimmung der Peptidmassen über MALDI-TOF wurden die Proben über ein 10 %iges Gel aufgetrennt (siehe 5.17). Alle benötigten Lösungen wurden mit Rotipuran H<sub>2</sub>O (Roth) angesetzt. Das Gel wurde in der Färbelösung gefärbt und anschließend entfärbt. Zur Entfernung des Entfärbers wurde das Gel für 10 min in Rotipuran H<sub>2</sub>O geschwenkt. Mit einem sauberen Skalpell wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und in 2-3 Stücke geteilt. Die Stücke wurden

in ein Eppendorf-Cup gegeben, welches vorher mit 50 % Acetonitril / 0,1 % TFA gespült worden war. Dann wurden die Gelstücke 2 × 45 min bei 37°C in 200 µl 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> / 50% Acetonitril entfärbt. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Anschließend wurden die Gelstücke 5 min bei Raumtemperatur in 100 µl Acetonitril gegeben. Sie wurden dabei etwas kleiner und leicht trüb. Die Stücke wurden in der Speedvac getrocknet (10-15 min).

Trypsin Gold (Promega) wurde in einer Konzentration von 1 µg / µl in 50 mM Essigsäure aufgenommen und 1:50 in 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> / 10 % ACN verdünnt. 30 µl dieser Lösung wurden zu den Gelstücken gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Gelstücke nahmen dabei wieder ihre ursprüngliche Größe und Farbe an. Es wurden zusätzlich 50 µl 40 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> / 10 % ACN zugegeben und der Ansatz bei 37°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 µl Rotipuran H<sub>2</sub>O zu dem Ansatz gegeben und 10 min schüttelnd inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und aufgehoben. Die Gelstücke wurden 2 × 1 h bei Raumtemperatur mit 50 % / ACN / 5 % TFA extrahiert (ab und zu gevortext). Die gesammelten Extrakte wurden in der Speedvac getrocknet.

Vor Messung in dem MALDI-TOF-Spektrometer wurden die Proben über ZipTips (Millipore) entsalzt. Dazu wurden die ZipTips mit 10 µl 100 % ACN gewaschen. Anschließend wurden sie mit 10 µl 0,1 % TFA äquilibriert (2-3 ×). Die Proben wurden in 10 µl 0,1 % TFA aufgenommen und 4-5 × ein- und auspipettiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen. Zum Entfernen von Kontaminationen wurden die ZipTips 2-3 × mit 10 µl 0,1 % TFA gewaschen. Die Proben wurden in 2 µl 5 % Ammoniumhydroxid / 30 % Methanol eluiert und direkt auf die Slides aufgetragen. Als Matrix diente α-Cyano-Hydroxy-Zimtsäure in einem Verhältnis Probe : Matrix von 1 : 5000.

Die Messung der Midh und der Methylcitrat Dehydratase erfolgte am Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover an einem MALDI-II Kratos Analytical (V5.2.4, Shimadzu, Duisburg). Dort wurden folgende Standards eingesetzt:

Cys-Gln-Asp-Ser (505 Da)

Bradykinin Fragment 1-7 (756,40 Da)

Bradykinin Fragment 2-9 (904,0 Da)

Insulin (B-Kette oxidiert, bovine) (3493,65 Da)

Arg-Insulin (human rec. in *E. coli*) (5963 Da)

Ubiquitin (bovine) (8565 Da)

(alle Sigma)

Die Proben wurden im linear high mass mode gemessen.

Die Messung der Aconitase erfolgte am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover an einem MALDI III Kratos (V1.2.2, Shimadzu, Duisburg).

Zur Eichung wurden folgende Peptide eingesetzt:

Gly-Leu (188,23 Da)

Leu-Gly-Gly (245,28 Da)

Gly-Gly-Gly (189,17 Da)

Phe-Gly-Gly-Phe (426,5 Da)

Phe-Gly-Phe-Gly (426,5 Da)

Gly-Gly-Phe (279,3 Da)

Insulin (5734 Da)

Die Proben wurden im linear high mass mode gemessen.

## 5.20 Vorbereitung der Proben für die EPR-Spektroskopie

Die angereicherten oder gereinigten Enzymproben wurden auf eine Proteinkonzentration von 0,75-1,0 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 eingestellt. Das Substrat Methyl-*cis*-aconitat wurde vor Zugabe mit 1 M NaOH neutralisiert und in einer Endkonzentration von 5-7,5 mM zugegeben. Falls die Proben reaktiviert worden waren, wurden sie über Sepadex G-25 Säulen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 umgepuffert (siehe 5.13). Die Proben wurden ohne Luftblasen in EPR-Röhrchen (4 mm EPR tubes CFQ 250 mm, Rototec) gefüllt und mit Gummistopfen (7 mm, Fisher Scientific, Schwerte) verschlossen. Anschließend wurden die Proben langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung darin gelagert.

Die Spektren wurden am MPI für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr an einem Bruker ElexSys E500 SuperX mit DM9509 Resonator bei  $9,635 \pm 0,001$  GHz aufgenommen. Das Spektrometer enthielt einen EPR-910 Oxford Instruments Helium Durchfluss-Cryostat.

## 5.21 Vorbereitung der Proben für die Mössbauer-Spektroskopie

Für die Mössbauer-Spektroskopie wurden die Proben nach Anreicherung auf eine Proteinkonzentration von 40 - 50 mg/ml eingengt und in die Mössbauer-Töpfe gefüllt. Reaktivierte Probe wurde zuvor über Sephadex G-25 Säulen umgepuffert. Die Töpfe wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, in Aluminium-Folie eingewickelt und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Messungen erfolgten ebenfalls am MPI für Bioanorganische Chemie in Mülheim.

## 6. Molekularbiologische Methoden

### 6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die PCR-Ansätze enthielten folgende Komponenten:

50 µl Gesamtvolumen:

2 µl forward primer (20 pmol)

2 µl reverse primer (20 pmol)

4 µl Template DNA (10-300 ng)

5 µl Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> (Endkonzentration 2 mM)

5 µl dNTP's (je 0,2 µmol dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

1,5 µl Taq-Polymerase (1 U)

30,5 µl H<sub>2</sub>O

Die Schmelztemperatur der Oligonucleotide wird nach der folgenden Formel abgeschätzt:

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 2(A+T) + 4(G+C) \text{ (Bei Oligonucleotiden } < 30 \text{ Basen)}$$

PCR-Programm

1. 5 min 95°C
2. 35 s 95°C
3. 30 s Schmelztemperatur - 3°C
4. 1 min/1 kb 72°C
5. 12 min 72°C

Zwischen Schritt 2 und 4 werden 30 Zyklen programmiert.

Die Analyse der Reaktion erfolgte über Agarosegelelektrophorese. Als Größenstandard wurden HyperLadder von der Firma Bioline verwendet.

## 6.2 Digoxigenin-Markierung der Sonden über PCR

Die Sonden gegen AcoA wurden über PCR mit DIG-11-dUTP (DIG DNA labeling Mix, Roche) markiert. Neben den PCR-Komponenten wurden zusätzlich 2 µl des Markierungsgemisches zugegeben. Als Template diente Plasmid- oder Cosmid-DNA. Anschließend wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und nach Beendigung des Laufs ausgeschnitten. Eine Kontrolle der Markierung erfolgte über einen parallelen PCR-Ansatz ohne markierte Nucleotide. Über den Einbau von Digoxigenin in die Sonde sollte ein Größenunterschied zwischen markierter und unmarkierter DNA sichtbar werden. Die Sonden wurden mit Hilfe des Qiaquick gel extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers eluiert. Für die Koloniehybridisierung (siehe Durchmusterung einer Genbank) wurde Sonde I (Primer: AcnMitte\_down und AcnStop\_up, Größe: 1,2 kb) und für den Southern Blot Sonde II (Primer: Aconi1N\_f und Aconi1N\_r, Größe 457 Bp) verwendet.

## 6.3 Restriktionsverdau

Plasmid-, bzw. genomische DNA wurde mit spezifischen Restriktionsenzymen und den vom Hersteller empfohlenen Puffern für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Genomische DNA wurde über Nacht bei 37°C geschnitten, um einen vollständigen Verdau zu gewährleisten.

## 6.4 Herstellung von Agarosegelen

Zur Überprüfung der Größen von restriktionsgeschnittener DNA wurden 0,8-2 %ige Agarosegele hergestellt. Die Agarose wird eingewogen, mit 1 × TBE Puffer versetzt und in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 40°C wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Diese Lösung wurde in vorbereitete Kammern gegossen. Die DNA-Proben wurden 5:1 in Auftragspuffer verdünnt und aufgetragen. Als Standard wurden unterschiedliche Größenmarker der Firma Bioline verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 120 V durchgeführt.



**50 × TBE Puffer**

242 g Tris (Base)

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 1 l mit H<sub>2</sub>O dest.**Ladepuffer:**

0,25 % Orange G

0,25 % Bromphenolblau

0,25 % Xylencyanol FF

40 % Saccharose

**6.5 Southern Blot**

Die DNA wurde mit dem entsprechenden Restriktionsenzym geschnitten und in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt. Nachdem das Gel fotografiert worden war, wurde es 2 × 10 min in 0,25 M HCl inkubiert, um die DNA teilweise zu depurinisieren. Anschließend wurde es kurz in Wasser und dann 2 × 10 min in 0,5 M NaOH 1,5 M NaCl inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Danach wurde das Gel in 0,5 M Tris HCl pH 7,5 mit 1,5 M NaCl äquilibriert. Das Gel wurde über Nacht auf eine Membran (Hybond N+) über die Kappilarmethode geblottet. Als Transferlösung diente 10 × SSC. Anschließend wurde die DNA auf dem UV-Schirm für 10 s Sekunden bestrahlt, um die DNA mit der Membran zu vernetzen (cross-linking).

**20 × SSC:**100,5 g Na<sub>3</sub>-Citrat

175,3 g NaCl

pH auf 7,0 mit 10 N NaOH einstellen

***6.5.1 Hybridisierung***

Die benötigten Lösungen stammten aus dem Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche). Der Blot wurde 1 h bei 64°C mit Hybridisierungslösung ohne Sonde äquilibriert und abgesättigt. Die Sonde wurde bei 96°C für 5 min denaturiert, ehe sie sofort zu Hybridisierungslösung gegeben

wurde. Die Hybridisierung erfolgt bei 64°C über Nacht. Anschließend wurde der Blot nacheinander mit folgenden Lösungen gewaschen:

2 × 5 min (2 × SSC, 0,1 % SDS) bei RT

2 × 15 min (0,1 × SSC, 0,1 % SDS) bei 64°C

2 min Waschpuffer

30 min Blocking-Lösung bei RT

30 min Blocking-Lösung mit Antikörper bei RT

2 × 15 min Waschpuffer

1 × 3 min Detektionspuffer

Hybridisierungslösung:

Der Inhalt einer Flasche DIG Easy Hyb granules (Roche) wurde mit 64 ml sterilem H<sub>2</sub>O dest. versetzt und bei 37°C gelöst.

1 × Blocking-Lösung:

10 × Blocking-Lösung wird 1:10 in Maleinsäure-Puffer verdünnt.

Maleinsäure-Puffer:

0,1 M Maleinsäure

0,15 M NaCl

mit NaOH auf pH 7,5 einstellen

Waschpuffer:

Maleinsäure-Puffer, 0,3 % (v/v) Tween 20

Blocking-Lösung mit Antikörper:

Der Antikörper (anti-Digoxigenin-Antikörper, Fab-Fragment) wird 1:2 000 in der Blocking-Lösung verdünnt.

Detektionspuffer:

0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl pH 9,5

### *6.5.2 Detektion mit CDP-Star*

Die Membran wurde nach Waschen in Detektionspuffer mit 20 Tropfen CDP-Star, ready-to-use (Roche) benetzt und 2-5 min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung entfernt und die Membran eingeschweißt, auf einen Röntgenfilm aufgelegt und für 5 min belichtet. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Röntgenfilms mit Hilfe von Entwickler- und Fixierlösungen (Agfa).

### *6.5.3 Detektion durch Membranfärbung*

Alternativ wurde die Membran nach der Chemilumineszenz-Detektion direkt angefärbt. Hierzu wurde die Membran mit Maleinsäurepuffer gewaschen und in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran zusammen mit 20 ml Detektionspuffer und 90 µl NBT-Lösung und 70 µl BCIP-Lösung eingeschweißt. Die Membran wurde bis Färbung der Banden im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Blot in H<sub>2</sub>O dest. gewaschen und die Reaktion mit verdünnter Essigsäure (0,2 mM) gestoppt.

NBT-Lösung: 7,5 mg NBT (Nitroblautetrazolimchlorid) in 100 µl 70 % DMF

BCIP-Lösung: 5 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat) in 100 µl 100 % DMF

## **6.6 DNA-Sequenzierung**

Zur Sequenzierung werden Plasmide nach dem Prinzip der enzymatischen Kettenabbruchmethode sequenziert. Es wurde der Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit verwendet und die Proben wurden mit Hilfe des automatischen Sequenzers „ABI-310“ (Applied Biosystems, UK) analysiert.

## **6.7 Klonierungen**

### *6.7.1 Phosphatase*

Um eine Rückligation des Plasmids zu verhindern, wurden zusammen mit dem Restriktionsenzym 1 µl CIP (calf intestinal alkaline phosphatase) zugesetzt. Der Restriktionsansatz wurde nach 1-2 h siehe (6.3) auf ein Agarosegel aufgetragen und anschließend die Restriktionsfragmente aus dem Gel eluiert.

### 6.7.2 Ligation

Die Ligation doppelsträngiger DNA erfolgte in einem Ansatz von 10 µl mit 1 U T4-Ligase (NEB). Die Reaktion wurde über Nacht bei 14-16°C inkubiert.

### 6.7.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (Rubidium-Chlorid-Methode)

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden diese in 3 ml über Nacht in LB-Medium angezogen. Davon wurden 2 ml in 100 ml vorgewärmtes LB-Medium gegeben und bei 37°C schüttelnd inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden die Kulturen für 5 min auf Eis inkubiert, in sterile Zentrifugationsgefäße überführt und 5 min bei 4000 × g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 30 ml Eis-gekühltem TFB I resuspendiert. Die Suspension wurde für 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4000 × g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 4 ml TFB II resuspendiert, zu Portionen à 200 µl abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### TFB I:

100 mM RbCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin,  
pH = 5,8

Zur Einstellung des pH-Wertes wurden 27,8 mM Kaliumacetat und 2,2 mM Essigsäure benötigt.

#### TFB II:

10 mM MOPS, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin;

Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf 6,8 eingestellt.

### 6.7.4 Transformation von *E. coli*

Die chemisch kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA wurden sie 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie für 90 s auf 42°C erhitzt und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium wurden die Zellen 30 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden sie auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Für ein Blau-Weiß-

Screening enthielten die Platten zusätzlich X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid) und IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid) (für die Konzentration siehe Material und Methoden 4.2)

#### *6.7.5 Isolierung von Cosmid- und Plasmid-DNA*

Zur Isolierung von Cosmid- oder Plasmid-DNA wurden 5 ml LB-Medium mit *E. coli*-Zellen von einer Platte mit einem Zahnstocher oder aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht schüttelnd inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des PeqLab E.Z.N.A. Plasmid MiniprepKit II nach Anleitung des Herstellers isoliert. Für größere Mengen an Plasmid-DNA wurde das MidiPrep Kit (Sigma-Aldrich) verwendet.

#### **6.8 Transformation von *A. nidulans***

Für die Transformation wurden 200 ml Glucose Minimalmedium mit Konidien des Stammes WG355 inokuliert und über Nacht bei 37° schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Mycel über Miracloth-Gaze abfiltriert und mit 0,6 M KCl gewaschen. Nach dem Spülen mit osmotischem Medium wurde das Mycel in 10 ml Glucanex-Lösung aufgenommen, für 2-3 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 30°C für 1,5-3 h leicht schüttelnd inkubiert. Die Protoplastenbildung wurde mikroskopisch kontrolliert. Bei fortgeschrittener Protoplastierung wurde der Ansatz über Miracloth-Gaze abfiltriert und der Filter mit 10 ml Waschlösung gespült. Die Protoplasten befanden sich im Durchfluß. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 7000 rpm, SS34-Rotor) wurde der Überstand verworfen und die Protoplasten wurden in 20 ml Waschlösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Pellet in 10 ml Resuspendierlösung aufgenommen und die Anzahl der Protoplasten in einer Zählkammer (z.B. Thoma) bestimmt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Protoplasten so verdünnt, dass sich ca.  $1-5 \cdot 10^7$  Protoplasten in 1 ml Resuspensionslösung befanden. Die DNA (5  $\mu$ g in 5-10  $\mu$ l) wurde in einem Cup vorgelegt und mit 50 - 100  $\mu$ l Protoplasten-Suspension versetzt. Als Negativkontrolle wurden 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O in einem Cup mit Protoplasten versetzt. Nach Zugabe von 13 - 25  $\mu$ l PEG-Lösung wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von weiteren 0,5 ml PEG-Lösung wurde der Ansatz

5 min auf Eis belassen. Nach Zugabe von 1 ml Resuspendierlösung wurden je 500 µl des Ansatzes mit 8 ml Topagar gemischt und auf Transformationsplatten verteilt. Als Positivkontrolle wurden 600 µl Ansatz mit 100 µl Arginin (500 mM) versetzt und mit 8 ml Topagar vermischt. Die Negativkontrolle wurde ebenfalls mit 8 ml Topagar versetzt und auf eine Platte verteilt. Nach 3-5 Tagen Inkubation bei 37°C wurden die ersten Transformanten sichtbar, diese wurden mehrmals auf frischen Platten ausgestrichen.

Osmotisches Medium:

0,6 M KCl, 10 mM Na-Phosphat-Puffer pH 5,8

Glucanex-Lösung:

400 mg Glucanex in 10 ml osmotischem Medium gelöst, sterilfiltriert

Waschlösung:

0,6 M KCl, 0,1 M Tris-HCl pH 7,0

Resuspensionslösung:

0,6 M KCl, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,5

PEG-Lösung:

PEG 8000 (25 %), 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,5

Transformationsplatten und Topagar:

Minimalmedium mit Glucose und Agar und 0,6 M KCl  
ca. 100 ml des Agars werden bei 60°C aufbewahrt (Topagar)

*6.8.1 Klonierung von acoA*

Die zu untersuchende Cosmid-Bank ANI 60C1\_746 (Borges-Walmsley *et al.*, 1995) war in 4 Pools aufgeteilt. Von den 4 Pools wurden die Cosmide isoliert und mittels PCR (Primer: AcnMitte\_down; AcnStop\_up) gegen das *acoA*-Gen wurde ein positiver Pool ausgewählt. Von diesem Pool wurden die *E. coli*-Zellen in einer

Dichte von ca. 1000 Kolonien pro Platte (LB-Agar, 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden auf frischen Platten vereinzelt und erneut bei 37°C über Nacht inkubiert. Durch Auflegen von Nylonmembranen (Hybond+) auf die Platten wurden die Kolonien auf die Membranen übertragen. Anschließend wurden die Membranen auf getränktem Filterpapier (mit 0,5 M NaOH) für 5 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren und die DNA zu denaturieren. Anschließend wurden die Membranen für jeweils 5 min auf Filterpapier mit 0,5 M Tris HCl pH 7,0 und abschließend auf Filterpapier mit 0,5 M Tris HCl pH 7,0; 1,5 M NaCl inkubiert. Nach Fixierung der DNA durch UV-Licht wurden die Membranen mit der Sonde hybridisiert und die Signale detektiert (siehe 6.5). Die DIG-markierte Sonde bestand aus einem 1,2 kb (siehe 6.2) großen Fragment des *acoA*-Genes (Primer: AcnMitte\_down und AcnStop\_up).

Das Cosmid aus Klon ANI 60C1\_746 Nr. 49, welches ein deutliches Signal zeigte wurde isoliert. Das Cosmid wurde mit den Restriktionsenzymen *StuI* und *SwaI* geschnitten und die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt. Die *acoA*-enthaltende Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick gel-extraction Kit II (Qiagen) eluiert. Als Vektor wurde zirkulärer pCR 2.1-Vektor verwendet. Dieser Vektor wurde mit *EcoRV* geschnitten und mit CIP (calf intestinal phosphatase) dephosphoriliert. Der geschnittene Vektor wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, ausgeschnitten und eluiert. Vektor und Insert wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit Hilfe von T4-Ligase (Biolone) ligiert. Das entstandene Ligations-Produkt wurde in MRF<sup>+</sup> XL1-Blue *E. coli*-Zellen eingebracht, was den Stamm AcoA SwaI/StuI ergab.

Zur Klonierung des *argB*-Gens wurde das Gen mit *NotI* aus dem Vektor pΔmcsA (Brock *et al.*, 2000) ausgeschnitten. Der Restriktionsansatz wurde auf ein Gel aufgetragen, die *argB*-enthaltende Bande ausgeschnitten und eluiert. Anschließend wurden das *argB*-Gen und der *NotI*-geschnittene und dephosphorilierte Vektor (AcoA SwaI/StuI pCR 2.1) über Nacht mit T4-Ligase ligiert. Das entstandene Konstrukt wurde in MRF<sup>+</sup> XLI-Blue *E. coli* eingebracht und ergab den Stamm AcoA-ArgB. Mit dessen Plasmid wurde *A. nidulans* WG355 transformiert (siehe 6.8) und ergab die Stämme AcoA-ArgB Nr. 1-20.

### **6.9 Isolierung von Gesamt-DNA aus *A. nidulans***

Ein 2 ml-Cup wurde zu 1/3 mit gemörsertem Mycel befüllt (ca. 100 mg Mycel). Dazu wurden 1 ml Lysispuffer gegeben und 1 h bei 68°C inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden in einer Mikrozentrifuge bei 13 000 rpm für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Cup überführt und mit 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, pH 7,5-8,0; Roth) versetzt. Der Ansatz wurde gevortext und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde erneut mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen und mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt. Der Ansatz wurde 10-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die ausgefallene DNA 15 min bei 13 000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde getrocknet und in 100 µl Elutionspuffer gelöst (1 h 60°C). Zu dem gelösten Pellet wurde RNase A (20 µg/ml) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 15 min) wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und in der Speedvac getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl Elutionspuffer bei 60°C gelöst.

#### Lysispuffer:

50 mM Tris HCl pH 7,0

50 mM EDTA

3 % SDS (w/v)

1 % 2-Mercaptoethanol

#### Elutionspuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,5

### **6.10 RNA-Isolierung aus *A. nidulans***

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Plant mini Kit isoliert. Dazu wurden 0,1 g frisches Mycel des Stammes SMI45 verwendet. Die Kultur war für 40 h auf Minimalmedium mit Acetat/Propionat (50 mM/50 mM) angezogen worden. Die Aufreinigung erfolgte nach Anleitung des Herstellers, einschließlich einer optionalen DNase-Behandlung.



Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt:

$\Delta E_{260} = 1$  entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$

#### *6.10.1 Reverse Transkription*

Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des RobusTI RT-PCR Kits (Finnzyme). Die Reaktion erfolgte nach Anweisung des Herstellers, wobei ca. 0,5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA eingesetzt wurden. Als spezifische Primer wurden AcnATG2 und AcnMitte\_RNAup verwendet. Das amplifizierte PCR Produkt wurde in den pCR 2.1 Vector kloniert und in MRF' XLI-Blue *E. coli*-Zellen transformiert.

## ERGEBNISSE

### 1. Vergleichende Enzymaktivitäten in *A. nidulans* Stämmen

Da die Methylisocitrat-Dehydratase-Aktivität eventuell auf die Aktivität einer Aconitase zurückzuführen ist, und Aconitasen einen Eisen-Schwefel-Co-Faktor enthalten, wurde für die folgenden Versuche ein Stamm ausgewählt der über eine erhöhte Eisenspeicherkapazität verfügt. Der Stamm  $\Delta$ SREA trägt eine Deletion im *sreA*-Gen, welches für einen GATA-ähnlichen Repressor kodiert, der die Siderophorsynthese und Aufnahme reguliert. Zellen dieses Stammes zeigten eine Erhöhung des Transkriptlevels der vermeintlichen Aconitase AcoA um 50 % nach Wachstum auf Glucose (Oberegger *et al.*, 2002).

Zur Messung der Aconitase-Aktivität wurde ein mit Isocitrat-Dehydrogenase gekoppelter Test (Rose and O'Connell, 1967) verwendet, in dem entweder Citrat oder *cis*-Aconitat als Substrat eingesetzt wurden. Citrat wird durch die Wirkung der Aconitase zu Isocitrat über *cis*-Aconitat isomerisiert. Anschließend wird Isocitrat durch die Katalyse der Isocitrat-Dehydrogenase unter Abspaltung von CO<sub>2</sub> und Reduktion von NADP in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgewandelt. Die Zunahme an NADPH kann photometrisch bei 340 nm gemessen werden (siehe Abb. 10).

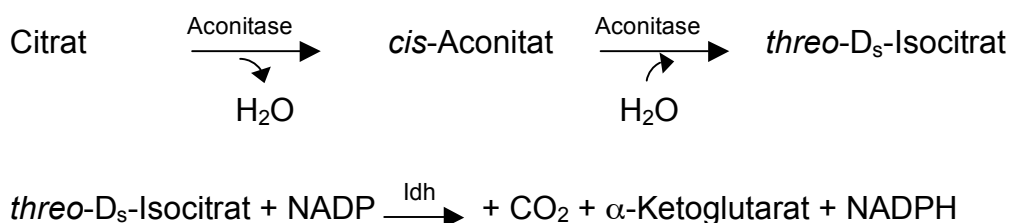


Abb. 10: gekoppelter Test zur Bestimmung der Aconitase-Aktivität; Idh = Isocitrat Dehydrogenase aus Schwein.

Zur Messung der Midh-Aktivität wurde im Rahmen dieser Arbeit ein NADH-gekoppelter Test entwickelt (siehe Material und Methoden 5.1.1). Als Substrat wurde Methyl-*cis*-aconitat eingesetzt, welches durch Wirkung der Midh zu Methylisocitrat hydratisiert wird. Durch Zugabe von Methylisocitratlyase (PrpB) aus *E. coli* (Brock *et al.*, 2001) wird Methylisocitrat in Pyruvat und Succinat

gespalten. Anschließend erfolgt eine Reduzierung des Pyruvat zu Lactat über die Lactat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel. Hierbei wird die Abnahme an NADH bei 340 nm photometrisch verfolgt (siehe Abb. 11).

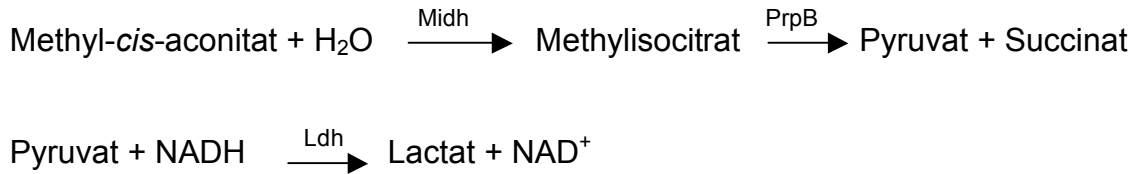


Abb. 11: gekoppelter Test zur Bestimmung der Midh-Aktivität; PrpB = Methylisocitrat Lyase; Ldh = Lactat Dehydrogenase.

Zur Messung der Aktivitäten wurden der Wildtyp WG TRAN und der Stamm  $\Delta$ SREA auf Propionat/Glucose-Medium (100 mM/10 mM) angezogen und die Aktivitäten bestimmt. Die Glucose diente dazu, die Auskeimung der Sporen zu beschleunigen. Nach 12 h war die Glucose verbraucht (Test mit Glucosetestreagenz) und Propionat diente als alleinige C-Quelle. Die Mycelien wurden nach 54 h geerntet, aufgeschlossen und die Aconitase- sowie die Midh-Aktivitäten im Rohextrakt bestimmt.

Tabelle 8: Vergleich der Aktivitäten des Wildtyps und  $\Delta$ SREA-Stammes nach Wachstum auf 100 mM Propionat/10 mM Glucose-Medium.

Aktivität	Wildtyp WG TRAN (U/mg)	$\Delta$ SREA (U/mg)
Aconitase	0,19	0,43
Midh-Aktivität	0,11	0,32
Ratio		
Midh/Aconitase	1: 1,7	1: 1,3

In Tabelle 8 sind die Aconitase- und Midh-Aktivitäten des Stammes  $\Delta$ SREA und des Wildtyps wiedergegeben. Die Aconitase-Aktivität im Rohextrakt des Stammes  $\Delta$ SREA ist doppelt so hoch verglichen mit dem Wildtyp. Die Midh-Aktivität ist ebenfalls erhöht. Daher könnte es sich bei der Midh um die

Aconitase handeln oder um ein eisenhaltiges Enzym, welches ebenfalls durch SREA reguliert wird.

## 2. Zeitabhängige Inaktivierung der Enzymaktivitäten

Da sowohl die Midh- als auch die Aconitase-Aktivität im Stamm  $\Delta$ SREA gegenüber dem Wildtyp erhöht waren, sollte getestet werden, wie sich die Aktivitäten über einen bestimmten Zeitraum bei aerober Inkubation entwickeln. Eine unterschiedliche Entwicklung würde für zwei verschiedene Enzyme sprechen, während eine gemeinsame Abnahme auf ein einzelnes Enzym schließen lässt.

Die Aconitase-Aktivität wurde mit Citrat im gekoppelten Test bestimmt. Die Midh-Aktivität wurde im gekoppelten Test mit Methyl-*cis*-aconitat gemessen. Beide Messungen erfolgten in 50 mM Tris-HCl pH 7,5. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abb. 12 wiedergegeben.

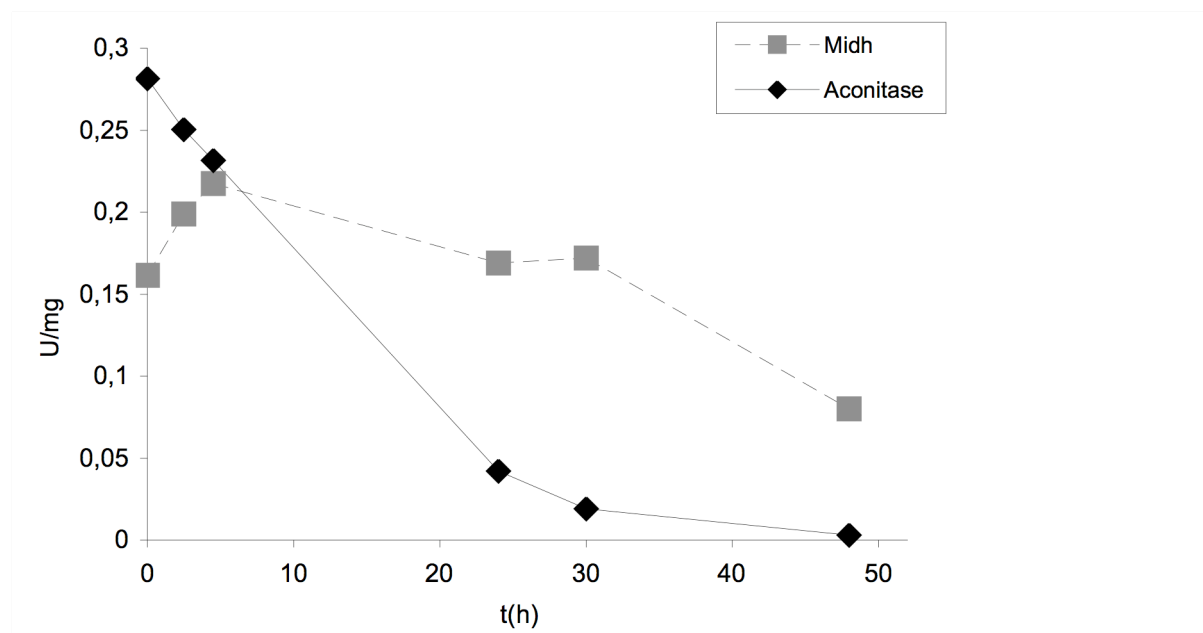


Abb. 12: Aconitase- und Midh-Aktivität im Rohextrakt des Stammes  $\Delta$ SREA nach Wachstum auf Propionat.

Die Abb. 12 zeigt die über einen Zeitraum von 48 h gemessenen Aktivitäten. Zum Zeitpunkt  $t_0$  beträgt die Aconitase-Aktivität das 1,7-fache der Midh-Aktivität. Die Midh-Aktivität steigt leicht an und nimmt dann ab. Bei der Aconitase-Aktivität zeigt sich demgegenüber eine stetige Abnahme ab dem Zeitpunkt  $t_0$ . Nach 48 Stunden beträgt die Midh-Aktivität das 27-fache der Aconitase-

Aktivität. Dieser Versuch zeigt eine unabhängige Entwicklung beider Aktivitäten über einen Zeitraum von 48 h, obwohl beide Aktivitäten empfindlich gegenüber Sauerstoff sind. Dies spricht zunächst dafür, dass die Aktivitäten von unterschiedlichen Enzymen stammen.

### 3. Reinigung der Methylisocitrat-Dehydratase (Midh)

Für die Reinigung wurden 8 g Mycel des Stammes  $\Delta$ SREA aufgeschlossen. Die Zellen waren für 48 h auf 100 mM Propionat /10 mM Glucose angezogen worden. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte bei 240 nm mit Methylisocitrat als Substrat in 50 mM KPP pH 7,0. Die Midh katalysiert dabei die Rückreaktion zu Methyl-*cis*-aconitat, dessen Zunahme auf Grund der Doppelbindung photometrisch bei 240 nm gemessen werden kann.



Abb. 13: Rückreaktion der Midh mit Methylisocitrat als Substrat

Tab. 9: Reinigungstabelle der Midh.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Rohextrakt	18,35	339,76	0,054*	100	1
80 % Pellet	18,20	138,42	0,131	99	2,4
Phenyl-Sepharose	8,40	10,02	0,838	46	15,5
Q-Sepharose	6,09	3,0	2,03	33	37,6
Resource Q	1,01	0,69	1,46	5	27,0
Reactive Red 120	0,42	0,02	21	2	389

\*Aufgrund des Testsystems fallen die Aktivitäten niedriger aus, als beim letzten Versuch.

In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Reinigung dargestellt. Im Rohextrakt betrug die spezifische Aktivität 0,052 U/mg. Am Ende der Reinigung betrug sie 21 U/mg, das entspricht einer 389-fachen Anreicherung.

Parallel zur Midh konnte die Methylcitrat-Dehydratase (MdhA) gereinigt werden, deren Aktivität beim letzten Schritt der Reinigung (Chromatographie über Reactive Red) von der Midh-Aktivität getrennt werden konnte (siehe

Abb. 14). Die Methylcitrat-Dehydratase ist ebenfalls ein Enzym des Methylcitratzyklus und katalysiert die reversible Reaktion zwischen Methylcitrat und Methyl-*cis*-aconitat, zeigte jedoch keine Aktivität mit Methylisocitrat als Substrat. Die Methylcitrat-Dehydratase aus *E. coli* besitzt keine weiteren Co-Faktoren (Brock *et al.*, 2002), ebenso die Methylcitrat-Dehydratase aus *A. nidulans* (M. Brock, persönliche Mitteilung).

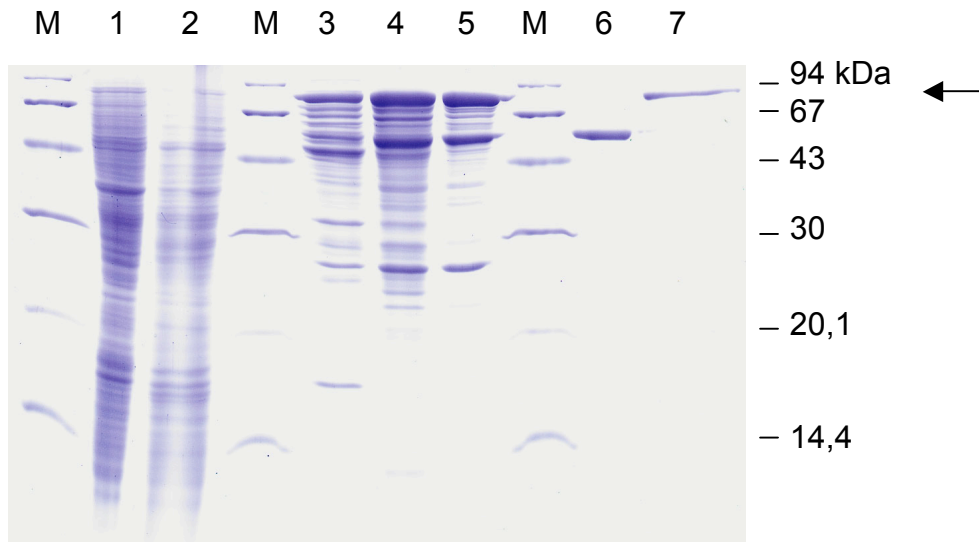


Abbildung 14: Reinigung der Midh aus *A. nidulans*  $\Delta$ SREA. Spuren: 1. Rohextrakt (45  $\mu$ g), 2. 80 % Pellet (48  $\mu$ g), M: Marker, 3. Phenyl-Sepharose (11  $\mu$ g), 4. Q-Sepharose (19  $\mu$ g), 5. Resource Q (9  $\mu$ g), 6. + 7.: Fraktionen der Reactive Red. 6. Methylcitrat-Dehydratase (1,6  $\mu$ g), 7. Midh (1,5  $\mu$ g). Der Pfeil markiert die gereinigte Midh.

Die isolierte Midh zeigte im SDS-Gel eine einzelne Bande zwischen 80 und 90 kDa. Eine Bestimmung der Aktivitäten zeigte, dass das gereinigte Protein sowohl Aconitase- als auch Midh-Aktivität besaß, allerdings überwog die Midh- gegenüber der Aconitase-Aktivität im gekoppelten Test (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Die verschiedenen Aktivitäten der gereinigten Midh.

Substrat	340 nm	240 nm
	gekoppelter Test (U/mg)	direkter Test (U/mg)
<i>cis</i> -Aconitat	<b>5,8</b>	14,8*
Methyl- <i>cis</i> -aconitat	<b>33,6</b>	11,0**
Citrat	2,4	n. g.
Methylisocitrat	-	21,0

n.g. = nicht gemessen; \* *cis*-Aconitat kann im 240 nm Test in Citrat und Isocitrat umgesetzt werden; \*\*Methyl-*cis*-aconitat kann nur in Methylisocitrat umgesetzt werden.

Der direkte Test hat den Vorteil, dass die Enzymaktivität durch Zu- oder Abnahme der Doppelbindung bei 240 nm gemessen wird. Allerdings kann dabei nicht unterschieden werden, in welche Richtung die Reaktion verläuft. Z.B. kann *cis*-Aconitat zu Isocitrat oder Citrat umgesetzt werden. Bei Aconitase aus Säugerherz (Schaf) liegt das Gleichgewicht stark auf der Seite des Citrats (Citrat 90,9 %, *cis*-Aconitat 2,9 % und Isocitrat 6,2 % bei pH 7,4 und 25°C (Krebs, 1953). Der gekoppelte Test hat den Vorteil, dass die Reaktion in eine bestimmte Richtung gezogen wird. Am besten vergleichbar sind jeweils die gekoppelten Tests mit *cis*-Aconitat und Methyl-*cis*-aconitat als Substrat. Aus diesem Vergleich erhält man eine 5,8-fach erhöhte Aktivität der Hydratisierung von Methyl-*cis*-aconitat im Vergleich zu *cis*-Aconitat

### 3.1 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Methylcitrat-Dehydratase

Die parallel zur Midh gereinigte Methylcitrat-Dehydratase wurde tryptisch verdaut. Da hierbei die Proteinsequenz bekannt war, konnte die Zuverlässigkeit der Methode bestimmt werden.

Tab. 11: Peptidmassen der Methylcitrat-Dehydratase (MdhA) nach Verdau mit Trypsin.

Gemessen mass/charge in Dalton	Erwartete Peptidmassen für MdhA	Differenz in $\pm$ Da	Peptidsequenz
1223,7	1223,3	0,4	HLQAHFDQAR oder FTLDYHDPSK
1595,0	1594,9	0,1	LLGPV VDGTV VPNGTR
1843,8	1843,2	0,6	TVLSAPV WGFYDVLFK
1860,6	1861,0	0,4	QTADAITQAW VDGQSLR
1979,8	1979,3	0,5	FQRPYGSYVMENVLFK
2057,0	2056,4*	0,6	ECTKLLGPV VDGTV VPNGTR
2076,4	2076,3*	0,1	AELEAYEVDKYVDLYVR
2324,6	2323,5	1,1	LTANDYADGSEAATSPLLEDLR

\*= 1 missed cleavage; Coverage = 23,4 % (118 von 504 AS) Spektrum im Anhang.

In Tab. 11 sind die gemessenen Peptidmassen der Methylcitrat-Dehydratase wiedergegeben. Die theoretischen Peptidmassen wurden durch das Programm PeptideMass von ExPASy errechnet. Bei der Messung konnten 118 Aminosäuren von insgesamt 504 in Form von Peptidmassen identifiziert werden, das entspricht einer Abdeckung (Coverage) von 23,4 %. Für die Masse von 1223,7 Da kämen theoretisch zwei verschiedene Peptide in Frage, für die Berechnung der Abdeckung wurde jedoch nur ein Peptid berücksichtigt. In manchen Fällen werden Schnittstellen ignoriert (missed cleavage), das Peptid wird dann dementsprechend größer.



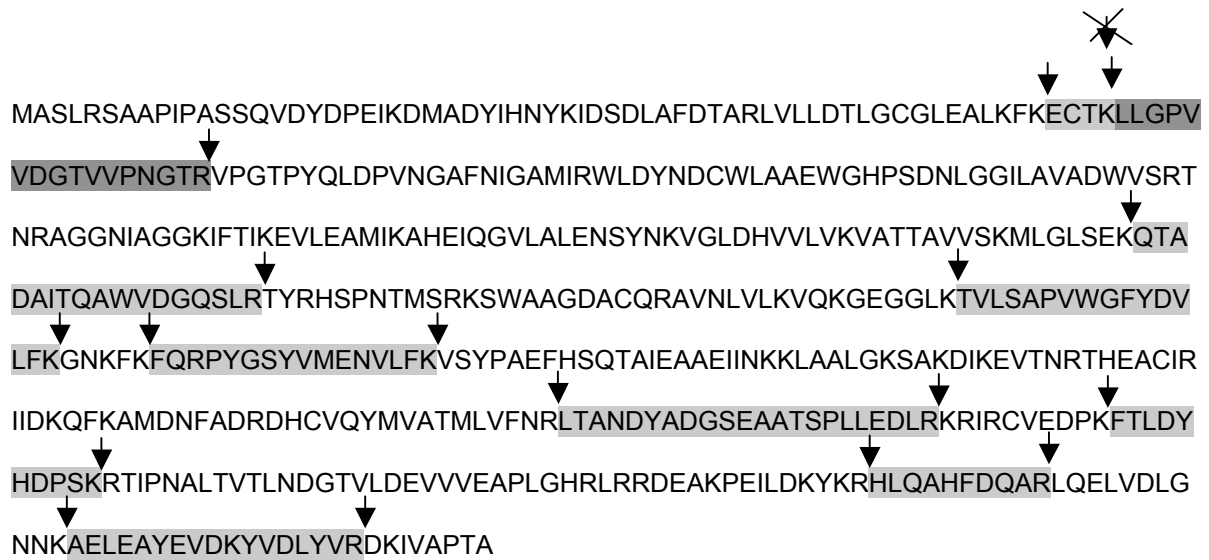


Abb. 15: Aminosäuresequenz der Methylcitrat-Dehydratase mit den gemessenen Peptiden nach Trypsinverdau; ▼ : Schnittstelle für Trypsin; ✗ : ignorierte Schnittstelle; hellgrau: gemessene Peptide; dunkelgrau: Überschneidungen durch ignorierte Schnittstellen.

### 3.2 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Methylisocitrat-Dehydratase (Midh)

Die Midh wurde ebenfalls tryptisch verdaut und die Massen am Institut für Reproduktionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover bestimmt.

Tab. 12: Peptidmassen der Midh nach Verdau mit Trypsin.

Gemessen mass/charge in Dalton	Erwartete Peptidmassen für ACOA	Differenz in $\pm$ Da	Peptidsequenz
1435,2	1435,6	0,4	SIFTVTPGSEQIR
1473,5	1473,7	0,2	LQLLAGFQPWDGK
1553,6	1553,7	0,1	NVFTGEYGAVPATAR
1726,4	1725,9	0,5	W V VIGDW NYGEGSSR
1811,0	1809,9*	1,1	GYDPGRDTYQAPPTDR
2451,6	2451,6*	0	DTYQAPPTDRSSVDVAVSPSSDR
2499,3	2496,7	2,6	GHLDNISNNMLIGAVNAENGEANK

\*= 1 missed cleavage; Coverage = 13,0 % (99 AA von 759); Spektrum im Anhang.

Die gemessenen Peptide konnten eindeutig dem AcoA-Protein zugeordnet werden. Dabei betrug die Abdeckung 13 % (99 von 759 Aminosäuren). Dieser Wert liegt zwar unter der Abdeckung der Methylcitrat-Dehydratase (23,4 %), bei sehr großen Proteinen fällt die Gesamt-Wiederfindungsrate jedoch allgemein geringer aus. Im Genom von *A. nidulans* konnten drei weitere Gene mit Homologien zu AcoA gefunden werden (Sequenzen siehe Anhang). Zwischen den gemessenen Peptidmassen einerseits und den theoretischen Peptidmassen dieser drei Proteine andererseits bestanden keine oder nur geringe Übereinstimmungen, so dass diese hier nicht näher diskutiert werden. Generell hängt die Qualität der Messwerte von den verwendeten Eichpeptiden ab, bei sehr guter Eichung sind Abweichungen von 0,1 Da möglich, die jedoch mit diesem Gerät nicht erreicht werden konnten.

MATVADLDKKVEMCNLEKGNINYKKMSENLDVRRRLTRPLTYAEKILYSHLDDPQNQDIERGKSYL  
 KLRPDRVACQDATAQMAILQFMSAGMPSVATPTTVHCDHLIEAQLGGEKDLARANEINKEVYDFLASS  
 TAKYNIGFWKPGSGIIHQILENYAFPGLMIGTDSHTPNAGGLAIAAIGVGGADAVDMAGLPWELKA  
 PKVIGVRLTGEMSGWTAPKDILKVAGLLTVKGGTGAIIHYHGPVNSLSATGMATICNMGAEIGATTSL  
 FPFNDRMYDYLKATKRQQIGDFARSYAKDLREDEGAEYDQLIEINLSELEPHINGPFTPDLATPISQFK  
 EAVKANGWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMSRAASIAQDALDHGLKAKSIFTVTPGSEQIRATIERDGQLK  
 TLEEFGGVILANACGPCIGQWDRKDVKKGTPNSIVSSYNRNFTGRNDANPATHAFVTSPDLVVALSIA  
 GTLNFNPLTDTLKDKDGKEFKLKAPTGDGLPSRGYDPGRD**TYQAPPTDRSSVDVAVSPSSDRLQLLA**  
**GFQPWDGKDATGIPILIKCQGKTTT**DHISMAGPWLKYR**GHLDNISNNMLIGAVNAENGEANKIKNVFT**  
**GEYGAVPATARDYKARGVKWVVIGDWN**YEGESSREHAAL**EPHRLGGLAIITRSFARIHETNLKKQGM**  
 LPLTFSDPADYDRIPDATVDLLCTELAVDKPMTLRVHPKDGASFDVKSHTFNESQIEWFKDGSALN  
 TMARKSGN

Abb. 16: Aminosäuresequenz von AcoA mit den gemessenen Peptiden nach Trypsinverdau;  
 ▼: Schnittstelle für Trypsin; ✕: ignorierte Schnittstelle; hellgrau: gemessene Peptide;  
 dunkelgrau: Überschneidungen durch ignorierte Schnittstellen.

## 4. Aconitase

### 4.1 Reinigung der Aconitase

In einem weiteren Experiment sollte das Enzym mit überwiegender Aconitaseaktivität gereinigt werden. Im Rohextrakt wurde immer eine höhere Aconitase-Aktivität gemessen, die gereinigte Midh zeigte dagegen nur eine geringe Aconitase-Aktivität (siehe 3.). Daher wurde vermutet, dass es sich bei der Midh und der Aconitase um zwei verschiedene Enzyme handelt und ein weiteres Enzym existiert, welches überwiegend Aconitase-Aktivität besitzt. Die Aconitase wurde aus 9 g Acetat-gewachsenen Mycel des Stammes  $\Delta$ SREA gereinigt. Die Enzymmessung erfolgte bei 240 nm mit Citrat als Substrat in 50 mM Tris HCl pH 7,5. Die Puffer für die Reinigung enthielten 1 mM Citrat, da dies zu einer Stabilisierung des Enzyms beiträgt (Rose and O'Connell, 1967).

Tab. 13: Reinigungstabelle der Aconitase.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung
Rohextrakt	41,8	315	0,13	100	1
80 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20,6	86,1	0,24	49	1,8
Phenyl-Sepharose	5,4	4,8	1,13	13	8,7
Resource Q	2,6	2,5	1,1	6,2	8,5
Reactive Red 120	1,5	1,0	1,5	3,6	11,5

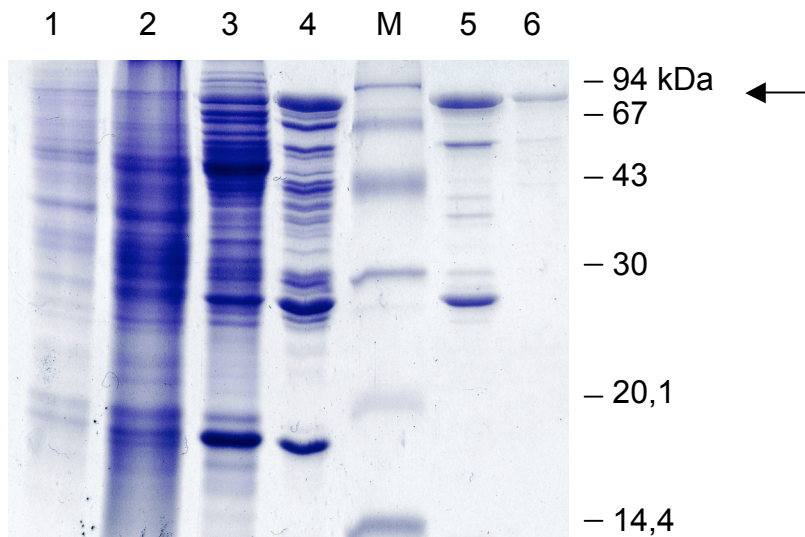


Abb. 17: Reinigung der Aconitase aus *A. nidulans*  $\Delta$ SREA. Spuren: 1. Rohextrakt, 2. 40-80 % Ammoniumsulfatfällung, 3. Phenyl-Sepharose, 4. Resource Q, 5. Reactive Red: gereinigte Aconitase, 6. gereinigte Midh aus vorheriger Reinigung zum Vergleich. Der Pfeil markiert die Bande der Aconitase/Midh. M = Marker.

Nach der Reinigung der Aconitase konnten im SDS-Gel neben einer deutlichen Bande bei ca. 80 kDa einige kontaminierende Banden sichtbar gemacht werden, die über diese Reinigungsprozedur nicht abgetrennt werden konnten. Wahrscheinlich sind diese darauf zurückzuführen, dass nur ein Anionenaustauscher eingesetzt wurde. Interessanterweise liegt die gereinigte

Aconitase auf der Höhe der gereinigten Midh (Spur 6). Die gereinigte Aconitase zeigte ebenfalls Midh-Aktivität (siehe Tab. 14).

Tab. 14: Aktivitäten der gereinigten Aconitase.

Substrat	340 nm (U/mg)	240 nm (U/mg)
Citrat	0,93	1,52
<i>cis</i> -Aconitat	1,86	n. g.
Methylisocitrat	-	1,48

n.g. = nicht gemessen

#### 4.2 MALDI-TOF-Messung der gereinigten Aconitase

Die Bande bei 80 kDa wurde ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Es fällt hierbei auf, dass Aconitase und Midh im SDS-Gel die gleiche Masse aufwiesen. Außerdem zeigte das hier gereinigte Enzym deutliche Midh-Aktivität. Daher könnte es sich um das gleiche Enzym mit unterschiedlicher Modifikation handeln. Dies wurde über MALDI-TOF-Analysen überprüft. Die Peptidmassen wurden erneut mit denen der vermeintlichen Aconitase AcoA verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Peptid-Massen der Aconitase nach Verdau mit Trypsin.

Gemessen mass/charge in Dalton	Erwartete Peptidmassen für AcoA	Differenz in ± Da	Peptidsequenz
1434,5	1435,6	1,1	SIFTVTPGSEQIR
1471,9	1473,7	2,2	LQLLAGFQPWDGK
1552,6	1553,7	1,1	NVFTGEYGAVPATAR
2453,8	2451,6*	2,2	DTYQAPPTDRSSVDVAVSPSSDR
2496,6	2496,7	0,1	GHLDNISNNMLIGAVNAENGEA NK

\*= 1 missed cleavage; Coverage = 11,6 %; maximale Abweichung 2,2 Dalton, Spektren siehe Anhang.

Es zeigte sich, dass ein Großteil der entstandenen Peptide bereits bei der Midh gemessen werden konnten. Die Abdeckung betrug 11,6 % für AcoA, und ist damit etwas geringer als bei der Messung der Midh (13 %). Durch die Verwendung anderer Eichpeptide und eines anderen MALDI-TOF-Gerätes konnte jedoch nicht die gleiche Meßgenauigkeit erzielt werden.

MATVADLDKKVEMCNLEKGNINYKKMSENLDVRRRLTRPLTYAEKILYSHLDDPQNQDIERGKSYL  
 KLRPDRVACQDATAQMAILQFMSAGMPSVATPTTVHCDHLIEAQLGGEKDLARANEINKEVYDFLASS  
 TAKYNIGFWKPGSGIIHQILENYAFPGLMIGTDSHTPNAGGLAIAAIGVGGADAVDVMAGLPWELKA  
 PKVIGVRLTGEMSGWTAPKDILKVAGLLTVKGGTGAIIHYHGPVNSLSATGMATICNMGAEIGATTSL  
 FPFNDRMYDYLKATKRQQIGDFARSYAKDLREDEGAEYDQLIEINLSELEPHINGPFTPDLATPISQFK  
 EAVKANGWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMSRAASIAQDALDHGLKAKSIFTVTPGSEQIRATIERDGQLK  
 TLEEFGGVILANACGPCIGQWDRKDVKKGTPNSIVSSYNRNFTGRNDANPATHAFVTSPDLVVALSIA  
 GTLNFNPLTDTLKDKDGKEFKLKAPTGDGLPSRGYDPGRDITYQAPPTDRSSVDVAVSPSSDRLQLLA  
 GFQPWDGKDATGIPILIKCQGKTTTDDHISMAGPWLKYRGHLDNISNNMLIGAVNAENGEANKIKNVFT  
 GEYGAVPATARDYKARGVKWVWIGDWNYGEGSSREHAALEPRHLGGLAIITRSFARIHETNLKKQGM  
 LPLTFSDPADYDRIPDATVDLLCTELAVDKPMTLRVHPKDGASFDVKLSHTFNESQIEWFKDGSALN  
 TMARKSGN

Abb. 18: Aminosäuresequenz von AcoA mit den gemessenen Peptiden nach Trypsin-Verdau;  
 ▼ : Schnittstelle für Trypsin; hellgrau: gemessene Peptide.

Die Abbildung 18 zeigt die postulierte Proteinsequenz von AcoA. Die grau unterlegten Sequenzen zeigen die per MALDI-TOF gemessenen Peptide. Daher kann gefolgert werden, dass es sich sowohl bei der Midh als auch bei der gereinigten Aconitase um das Protein AcoA handelt.

## 5. Ermittlung der mRNA-Sequenz sowie der Genomsequenz von AcoA

Die Sequenz der genomischen DNA von AcoA stammt aus der *A. nidulans*-Datenbank des Broad Institutes ([www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/](http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/aspergillus/)). Ein Teil der m-RNA-Sequenz war bereits teilweise veröffentlicht worden (Oberegger *et al.*, 2002), allerdings fehlte der N-Terminus des Proteins. Daher wurde für das fehlende Stück eine Reverse Transkription angefertigt und sequenziert. Dazu wurde RNA aus dem Stamm SMI 45 isoliert, welcher auf Acetat/Propionat (50 mM/50 mM) gewachsen war. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und den Oligonucleotiden Acn\_ATG2 und Acn\_mitte\_RNA\_up in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde das Fragment in den Vektor PCR 2.1 ligiert und in den

*E. coli*-Stamm XL1 Blue eingebracht. Über verschiedene Oligonucleotide, die im 5'-Bereich der RNA binden, wurden die cDNA-Abschnitte sequenziert. Die Oligonucleotide, die für die Sequenzierung verwendet wurden lauteten: M13 Forward, M13 Reverse, Acn\_Nein, und AcnATG2. Das Startmethionin ist unsicher, da keine eindeutige mitochondriale Importsequenz mit Hilfe der Programme Mitoprot und Predator (ExPasy) gefunden werden konnte.

```

M Q D Q Stop V L I L D Q L F G T R G Met A T V A D L D K K V E
M C N L E K G N Y I N Y K K M S E N L D V V R R R L T R P L T
Y A E K I L Y S H L D D P Q N Q D I E R G K S Y L K L R P D R
V A C Q D A T A Q M A I L Q F M S A G M P S V A T P T T V H C
D H L I E A Q L G G E K D L A R A N E I N K E V Y D F L A S S
T A K Y N I G F W K P G S G I I H Q I I L E N Y A F P G G L M
I G T D S H T P N A G G L A I A A I G V G G A D A V D V M A G
L P W E L K A P K V I G V R L T G E M S G W T A P K D I I L K
V A G L L T V K G G T G A I I E Y H G P G V N S L S A T G M A
T I C N M G A E I G A T T S L F P F N D R M Y D Y L K A T K R
Q Q I G D F A R S Y A K D L R E D E G A E Y D Q L I E I N L S
E L E P H I N G P F T P D L A T P I S Q F K E A V K A N G W P
E E L K V G L I G S C T N S S Y E D M S R A A S I A Q D A L D
H G L K A K S I F T V T P G S E Q I R A T I E R D G Q L K T L
E E F G G V I L A N A C G P C I G Q W D R K D V K K G T P N S
I V S S Y N R N F T G R N D A N P A T H A F V T S P D L V V A
L S I A G T L N F N P L T D T L K D K D G K E F K L K A P T G
D G L P S R G Y D P G R D T Y Q A P P T D R S S V D V A V S P
S S D R L Q L L A G F Q P W D G K D A T G I P I L I K C Q G K
T T T D H I S M A G P W L K Y R G H L D N I S N N M L I G A V
N A E N G E A N K I K N V F T G E Y G A V P A T A R D Y K A R
G V K W V V I G D W N Y G E G S S R E H A A L E P R H L G G L
A I I T R S F A R I H E T N L K K Q G M L P L T F S D P A D Y
D R I P P D A T V D L L C T E L A V D K P M T L R V H P K D G
A S F D V K L S H T F N E S Q I E W F K D G S A L N T M A R K
S G N Stop

```

Abb. 19: Proteinsequenz von AcoA mit 759 codierenden Aminosäuren.



CAGGCCCTAAGTCCCGTCTTGTAAGACATCTCCTAGCCGCCTTGATCCCGGAATTGTGAAATGCAG  
 GATCAGTGAGTACTAATTCTGGACCAGCTGTTCTGGGACTCGGGGCATGGCCACCGTTGCCGACCTCGA  
 CAAGAAGGTCGAGATGTGCAATCTCGAAAAGGGCAACTACATCAACTACAAGAAGATGTCCGAGAACC  
 TGGACGTTGTTTCGCCGTCGTTTACTCGTCCTCTCACATACGCCGAGAAGATTCTGTACTCTCACCTT  
 GACGACCCCCAGAACCAGGACATCGAGCGTGGCAAGTCTACCTCAAGCTCCGCCCTGACCGTGTTC  
 TTGCCAGGATGCCACCGCCCAGATGGCCATCCTGCAGTTCATGTCCGGCTGGTATGCCGTCGCTCGCTA  
 CTCCCACCACCGTGCACCTGTGATCACTTGATTGAGGCTCAGCTTGGTGGTGAGAAGGATCTTGCTCGC  
 GCGAACGAGATCAACAAGGAGGTCTACGACTTCTTGCCTCTTCGACTGCCAAGTACAACATTGGTTTT  
 CTGGAAGCCTGGCTCTGGTATCATTCACCAGATTATCCTTGAGAACTACGCCTTCCCCGGTGGTCTTA  
 TGATCGGTACCGATTCTCACACTCCTAACGCTGGTGGTCTTGCTATTGCTGCTATTGGTGTGGTGGT  
 GCCGATGCCGTCGATGTCATGGCTGGCCTTCTTGGGAATTGAAGGCTCCCAAGGTCATCGGTGTTAG  
 GCTCACTGGTGAGATGTCCGGCTGGACCGCTCCCAAGGATATCATCCTCAAGTTCGCTGGTCTCCTGA  
 CTGTCAAGGGTGGTACTGGTGGCATCATTGAATACCACGGTCTGGTGTCAACTCCCTCTCTGCCACT  
 GGTATGGCCACCATCTGTAACATGGGTGCTGAGATTGGTGCCACCACCTCTCTCTTCCCCTTCAACGA  
 CCGTATGTACGACTATCTGAAGGCTACCAAGCGTCAGCAGATTGGTGACTTCGCCCCGCTCCTACGCCA  
 AGGACCTACGCGAGGATGAGGGTGTGAGTACGACCAGCTGATCGAGATCAACCTGTCCGAGCTCGAG  
 CCCCACATCAACGGTCCCTTCACCCCGACTTGGCTACTCCCATCTCTCAGTTC AAGGAGGCTGTCAA  
 GGCCAACGGCTGGCCGAGGAGCTCAAGGTCGGTTTGATTGGCTCTTGCACCAACTCTTCTTACGAGG  
 ACATGTCTCGTGCTGCTTCCATCGCCCAGGATGCTCTCGACCACGGTCTGAAGGCCAAGTCTATCTTC  
 ACTGTTACTCCTGGTTCGAGCAGATTTCGCGCTACCATTGAGCGTGACGGTCAGCTCAAGACCCTTGA  
 GGAGTTCGGTGGTGTATCCTGGCCAACGCCTGCGGTCTTGCATTGGACAGTGGGACCGCAAGGATG  
 TCAAGAAGGGTACTCCCAACTCCATTGTCTCTTCTTACAACCGTAACTTCACTGGTTCGTAACGATGCC  
 AACCTTGCTACTCACGCTTTCGTCACCTCCCCCGACCTTGTGCTTCTGAGCATTGCTGGTACTCT  
 CAACTTCAACCCCCCTCACCGACACTCTCAAGGACAAGGATGGCAAGGAGTTC AAGCTTAAGGCCCTA  
 CTGGTGACGGTCTCCCCAGCCGTGGCTACGACCCCGCCGACACCTACCAGGCTCCTCCCACCGAC  
 CGCAGCAGTGTGATGTTGCTGTTTCCCCCTCCAGTGACCGTCTTCAGCTCCTCGCTGGATTCCAGCC  
 TTGGGACGGCAAGGATGCCACTGGCATTCCCTATCCTGATCAAGTGCCAGGGCAAGACTACTACTGATC  
 ACATCTCCATGGCTGGCCATGGCTCAAGTACCGTGGTACCTTGACAACATCTCTAACAACATGCTG  
 ATCGGTGCCGTC AACGCTGAGAACGGCGAGGCCAACAAGATCAAGAACGTTTTCTACTGGCGAGTATGG  
 TGCTGTCCCCGCCACGGCTCGTACTACAAGGCTCGTGGTGTAAAGTGGGTGTTATCGGTGACTGGA  
 ACTACGGTGAGGGTAGCTCTCGTGAGCACGCTGCCCTTGAGCCCCGCCACCTTGGCGGTCTCGCCATC  
 ATCACCCGCAGCTTTGCCCGTATTCACGAAACCAACCTTAAGAAGCAGGGTATGCTTCCCCTCACCTT  
 CTCCGACCCTGCCGACTACGACCGCATCCCCCCGACGCCACCGTCGACCTCCTCTGCACGGAACCTCG  
 CCGTTGACAAGCCATGACCCTCCGTGTTACCCCCAAGGATGGTGCCTCCTTCGACGTCAAGCTCAGC  
 CACACCTTCAACGAGTCCAGATTGAGTGGTTCAAGGACGGTTCGGCCCTCAACACCATGGCCCGCAA  
 GTCTGGCAACTAA

Abb. 20: mRNA-Sequenz von AcoA; grau hinterlegt: Start- und Stop-Codon. Anzahl der codierenden Nucleotide : 2277.

## 6. Überproduktion von AcoA

Bei der Reinigung der Midh bzw. der Aconitase mit anschließender Maldi-TOF-Analyse konnte gezeigt werden, dass beide Aktivitäten demselben Enzym AcoA zuzuordnen sind. Um dies zu bestätigen wurde ein Multi-Copy-Stamm (AcoA-ArgB Nr. 20) erzeugt, der mehrere Kopien des *acoA*-Gens unter der Kontrolle des nativen Promotors enthält.

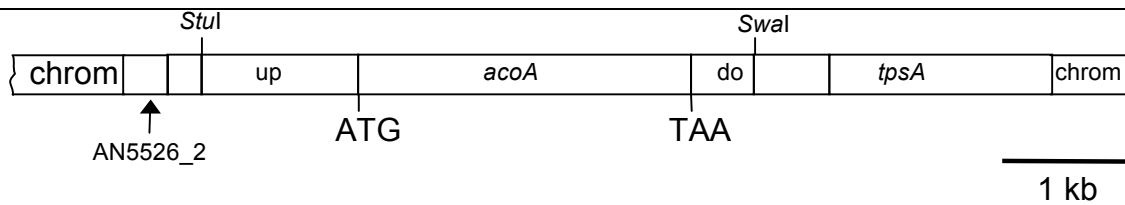


Abb. 21: Umgebung von *acoA* aus *A. nidulans*. 1.94 Scaffold Chromosom 5; AN5526\_2 = hypothetisches Protein; *tpsA* = Trehalose-6-phosphat Synthase; up = upstream-Bereich; do = downstream-Bereich.

TAGG/CCTCGGTTCTAGCTCGGCTCAGTCAGCAGCCGAGTTGTGCTTAGTGCCCCAGTGTCTTTGGGCGATTTCTCCGTACG  
 GCCATGTATGACGATTCACATATTCGGCATTTTCTCCGAATCTTCGCCGTCCAGTTGCGAGGGTAGCAAAGTAATTCATTC  
 CACGAGCTGAGCTCCATAAACTGAAGATGCCAGACTGTGAACCTCGACAAGAAGCAGGAGGTGTTGGTATTGCTTGTG  
 CTTTGGCTTGGGTGCTTCTAGTATTCAGTTCATCGAACGCTATATCACCATGAGATGAGCCCGTCAGGCTATGATGTAAA  
 GAGTTGTAATGCTACTTCAAAGAATATAGGGTGTAAATCAGAACGTTCTGATTGGTTTATTTGAATACTAATATTACCGGTCTC  
 ACATGCTTCTTACCATTACCGGCAGCGTATTTACAGTACGCGATATTGCTTGTGCGCATGGGGAACATAATAGCAATCTCGTA  
 GATGAAGCAATAGAAAAATACGGTTTTCGAGGAGTATATACTCTAAAGCGTGAGCAATTATTACTCTAGCAAGAAATAACTCT  
 AGCAAGCTTGTAGAATGCCTACATTCCTCTGACTGGCTGGTGGGAAAGCCCATGACCTTCCATGTCTCCGGTTGCATGCTTGT  
 GTTCGGTGTGCCCCGAAAGCGTACAGCGGCTTGTAAATGGAGGTATTGCAGCGGTTACGGGTCTCCACTCCGGTTCAGAGGA  
 GCAAGCTGAGGTCACCGTCGAGTCAAACAAGAATTCGCACTTGAAGCCCAAGCTTCCTTTAATCGACGACCTTCCTT  
 TGGGTTTCAAACCTCTCTTTTCTCCCTTCACTCTCCACTCCATTTCCCGAGGTTGAAGCTGCTACTTGGTTTAGCTCTCCAG  
 CGTGTGTGGCCTAGCCATCTTGCATAGAGAGCTTCCATCATGATCACCACAAGGCTTGCAGCGCATGGGTGCGCTGGTGAGTA  
 ACCATATTTCTCATCTCCCGTAGTCTCGCATAGCTGGCTCGAGATTGCTGCTCTAAGCGCAATGAAGTTCGGCCTATGCAG  
 GTTCTGAACACTTAGCAGCTAACATGGTTTTGATGCAGGCCCTAAGTCCCGTCTTGTAAAGACATCTCTAGCCGCTTATC  
 CCGGAATTTGTAATGCAGGATCAGTGAGTAAATCTGGACCAGCTGTTCGGGACTCGGGGACTGGCCACCGTTGCCGAC  
 CTCGACAAGAAGTGCAGATGTGCAATCTCGAAAAGGTGAGCTATTCCTTGTGCTGACTCTATTGTGGCTAGCCTCGTTGCT  
 TCGGATGAGTTAGCAGTCTGGACAACTCCGCTAACGCTCGCATTC TAGGGCAACTACATCAACTACAAGTATGTTTAAAGAG  
 TCATTGGAGTCTGGAGTGTGGTCTATTGGCGAAGCCAAATGTGCGGAGTTGACTAATATGTTTTTGAACCTGCAGGAAGAT  
 GTCGAGAACCTGGACGTGTTCGCGCTCGTTTGTACTGCTCTCACATACGCCGAGAAGATTCTGTACTCTCACCTTGACG  
 ACCCCAGAACCAGGACATCGAGCTGGCAAGTCTTACCTCAAGCTCCGCCCTGACCGTGTGTGCTTGCAGGATGCCACCGCC  
 CAGATGGCCATCCTGCAGTTCATGTGCGGTGGTATGCCGTCCGTGCTACTCCCACCACCGTGCAGTGTGATCACTTGATTGA  
 GGCTCAGCTTGGTGGTGTGAGAAGGATCTTGTCTCGCGCAAGCAGATCAACAAGGAGGTCTACGACTTCTTGCCTCTTCGACTG  
 CCAAGTACAACATTTGGTTTCTGGAAGCTGGCTCTGGTATCATTACACAGATTATCCTTGAAGACTACGCTTCCCGGTTGGT  
 CTTATGATCGGTACCGATTCTCACACTCCTAACGCTGGTGGTCTTGTGCTATTGCTGCTATTGGTGTGGTGGTGGCAGTCCGCT  
 CGATGTCATGGCTGGCCTTCTTGGGAATTGAAGGCTCCCAAGGTCACTGGTGTAGGCTCACTGGTGTGATGTCCGGCTGGA  
 CCGCTCCCAAGGTAAGTATCATTATTACATCTGACCAAGGCTTGAGGGGAATTGTGACTAATACTCTCTTAGATATCAT  
 CCTCAAGGTCGCTGGTCTCCTGACTGTCAAGGTTGACTGGTGGCATCATTGAATACCACGGTCTCTGGTGTCAACTCCCTCT  
 CTGCCACTGGTATGGCCACCATCTGTAACATGGGTGCTGAGATTGGTGCACCACCTCTCTTCCCTTCAACGACCGTATG  
 TAGACTATCTGAAGGCTACCAAGCGTCAGCAGATTGGTACTTCCCGCTCCTACGCCAAGGACTACGCGAGGATGAGGG  
 TGTGAGTACACCAAGCTGATCGAGATCAACCTGTCCGAGCTCGAGCCACATCAACGGTCCCTTACCCTTCACTTGGCTA  
 CTCCCATCTCTCAGTTC AAGGAGGCTGTCAAGGCCAACGGCTGGCCCGAGGAGCTCAAGGTCGGTTTGAATTGGCTCTTGCAACC  
 AACTCTTCTTACGAGGACATGTCTCGTGTGCTTCCATCGCCAGGATGCTCTCGACCAGGCTGTAAGGCCAAGTCTATCTT  
 CACTGTACTCCTGGTTCGAGCAGATTTCGCGCTACCATGAGCGTGACGGTCAGCTCAAGACCCTTGAGGAGTTCGGTGGTG  
 TCATCCTGGCCAACGCTGCGGTCTTGCATTGGACAGTGGGACCGCAAGGATGTCAAGAAGGGTACTCCCAACTCCATTGTC  
 TCTTCTTACAACCGTAACCTTCACTGGTCGTAACGATGCCAACCCTGCTACTCACGCTTTCGCTACTTCCCGACCTTGTGCT  
 TGCTGTGACATTTGCTGACTCTCAACTTCAACCCCTCACCCAGCTCTCAAGGACAAGGATGGCAAGGAGTTCAAGCTTA  
 AGGCCCTACTGGTACGGTCTCCCGAGCGTGGCTACGACCCCGCGACACCTACCAGGCTCCTCCGACCCGACCGCAGC  
 AGTGTGATGTTGCTGTTTCCCCCTCAGTGACCGTCTTACGCTCCTCGCTGGATTCCAGCCTTGGGACGGCAAGGATGCCAC  
 TGGCATTCCTATCCTGATCAAGTGCAGGGCAAGACTACTACTGATCACATCTCCATGGCTGGCCATGGCTCAAGTACCGTG  
 GTCACCTTGACAACATCTCTAACAACATGCTGATCGGTGCCGTCAACGCTGAGAACCGCGAGGCCAACAAGATCAAGAACGTT  
 TCACTGGCGAGTATGGTGTGTCCTCCCGCCACGGCTCGTGACTACAAGGCTCGTGGTGTAAAGTGGGTTGTATCGGTGACTG  
 GAACTACGGTGAGGTTAGCTCTCGTGAGCAGCTGCCCTTGAGCCCCGCCACCTTGGCGGTCTCGCCATCATCACCCGACGCT  
 TTGCCGATTTGTAAGTCTCATGCTCATTACAGACTAAGTAGTATTTGGACTAACAATAATTTCTCCAGCACGAAACCAACC  
 TTAAGAAGCAGGGTATGCTTCCCTTCACTTCTCCGACCCTGCCGACTACGACCGCATCCCCCGACGCCACCGTTCGACCTC  
 CTCTGCACGGAACCTGCGGTTGACAAGCCATGACCCTCCGTGTTACCCCCAAGGATGGTGCCTCCTTCGACGTCAAGCTCAG  
 CCACACCTTCAACGAGTCCCAGATTGAGTGGTTCAAGGACGGTTCGGCCCTCAACACCATGGCCCGCAAGTCTGGCAACTAAA  
 CGACATCCTGTAATTTATGTCTTGTGCTTTGATCAGTTAGCAGCGAGCAAGAAAAGGAGTACTAGAGCTGCTAATGGTCTTT  
 CTATGATTGATATCACGGAGTGGGTTTCGAAAAATTTTATGAATCGCTTCTGCTCAGGGGATGTATCGGCAACTTTGGGC  
 GGACTACATGGATATACACTGTTTTTGTACATCGTCCATTGTATGTTAGGGATTGGATGCATACATACTATTAATTCGTA  
 TTAATGCTTCTTCTGACTACTTCTTATACTGTAAACTCTTATCAATTAGGAAGCTCTCAGTGGCGGATGACATAAGATC  
 GCGTGTCTGCGGTGCCGACTGGCCGAGGCCAACCTTTCGCGCCTGCCCGCCTCGGCCGTTTAGCAATGAGCATGTCAGC  
 GTAACGGGCGTATATGATGGGCCCTCCTCTCAACATAATGGCATCTCCCTTAAACTAGATCTGTAATTT/AAAT

Abb. 22 *StuI/SwaI*-Fragment der *acoA*. Die codierende Sequenz ist grau unterlegt. Größen: *StuI*-Schnittstelle bis ATG (Promotor): 1,222 kb, ATG bis TAA: 2,590 kb, TAA (Stopp-Codon) bis *SwaI*-Schnittstelle: 486 Bp.

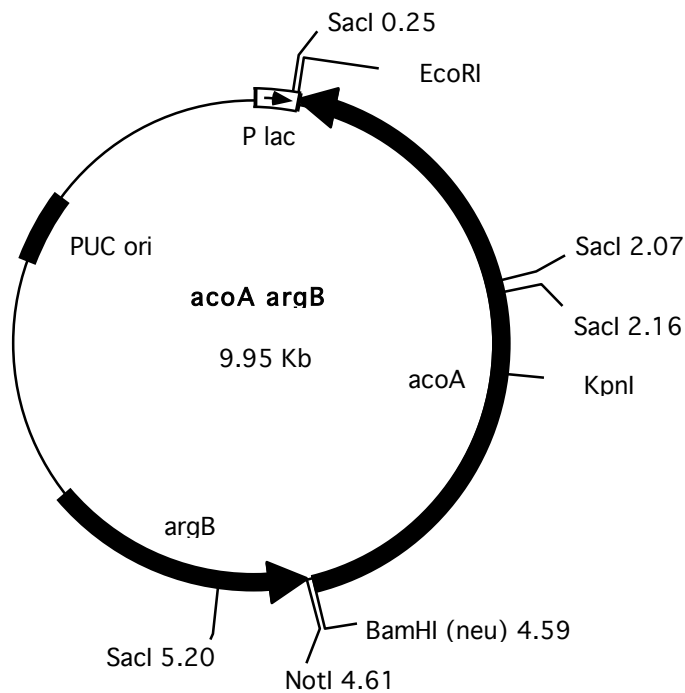


Abb. 23 Transformationsvektor zur Überproduktion von AcoA.

Der pCR2.1 Vektor wurde mit *EcoRV* linearisiert. Das *StuI/SwaI*-Fragment wurde mit dem linearisierten Vektor ligiert. Nach Ligation entstand eine neue *BamHI*-Schnittstelle.

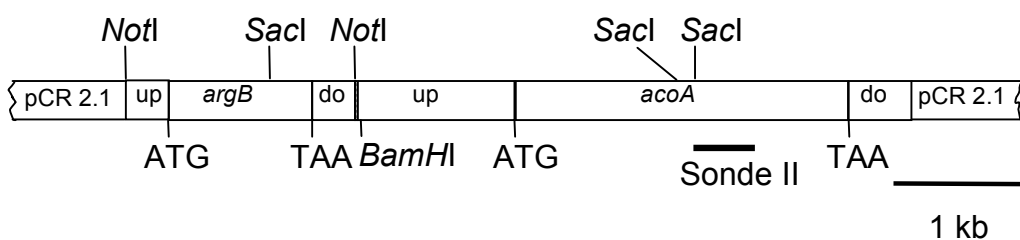


Abb. 24: Detail des Transformationsvektors acoA argB pCR2.1.

Nach Transformation von *A. nidulans* WG355 wurden die erhaltenen Transformanten auf AMM Glucose/Biotin-Platten vereinzelt. Mit den Sporen wurden 100 ml AMM Glucose (100 mM) angeimpft und nach 22 h geerntet. Das Mycel wurde gemörsert, in 30 mM KPP pH 7,2 aufgenommen und anschließend die Aktivitäten bestimmt. Als Substrat diente *cis*-Aconitat im gekoppelten Test.

Tab. 16: Aconitase-Aktivitäten der Transformanten nach Wachstum auf Glucose.

Transformant	Aconitase-Aktivität
Nr.	(U/mg)
WG355 (wt)	0,14
2	0,29
3	0,33
4	0,25
5	0,24
8	0,10
10	0,16
19	0,12
21	0,16
20	0,42

In Tabelle 16 sind die Aktivitäten der Transformanten wiedergegeben. Der Wildtyp und die Transformanten Nr. 8, 10, 19 und 21 zeigen ähnliche Aktivitäten, sodass hier wahrscheinlich kein zusätzlicher Einbau des *acoA*-Gens erzielt wurde. Bei den Transformanten Nr. 2, 3, 4 und 5 konnte ca. die doppelte Aktivität im Vergleich zum Wildtyp gemessen werden. Der Transformant Nr. 20 zeigte eine 3-fache Steigerung der Aktivität, wahrscheinlich enthält er 2 zusätzliche Kopien des *acoA*-Gens. Ausgewählte Transformanten wurden zusätzlich auf ihre Midh-Aktivität getestet. Dazu wurde Methyl-*cis*-aconitat im gekoppelten Test eingesetzt. In Tabelle 17 sind die unterschiedlichen Aktivitäten des Wildtyps und der Transformanten Nr. 2 und 20 wiedergegeben. Die Steigerung der Aktivität konnte auch für die Midh gemessen werden. Das Verhältnis Aconitase/Midh lag jeweils zwischen 4,4 und 5,4. Die gleichzeitige Steigerung beider Enzymaktivitäten unterstützt die Annahme, dass AcoA sowohl die Aconitase- als auch die Methylisocitrat-Dehydratase-Reaktion katalysiert.

Tab. 17: Vergleich der Aktivitäten zwischen Transformanten und Wildtyp nach Wachstum auf Glucose.

Aktivität	Wildtyp (U/mg)	AcoA-ArgB 2 (U/mg)	AcoA-ArgB 20 (U/mg)
Aconitase	0,14	0,29	0,42
Midh	0,032	0,054	0,100
Ratio Midh/A	1:4,4	1:5,4	1:4,2

Zur Untersuchung der Auswirkung verschiedener C-Quellen auf die Aktivitäten wurde der Stamm AcoA-ArgB 2 auf Glucose (100 mM), Acetat/Glucose (100 mM/50 mM) und Propionat/Glucose (100 mM/10 mM) gezogen und die Enzymaktivitäten im Rohextrakt bestimmt.

Tabelle 18: Vergleich der Aconitase- und Midh- Aktivitäten von AcoA-ArgB 2 nach Wachstum auf verschiedenen C-Quellen.

Aktivität	Glucose (U/mg)	Acetat / Glucose (U/mg)	Propionat /Glucose (U/mg)
Aconitase	0,29	1,25	1,66
Midh	0,054	0,240	0,380
Ratio Midh/A	1: 5,4	1:5,2	1: 4,4

Durch Wachstum auf Propionat/Glucose konnte eine Steigerung der Aconitase-Aktivität um den Faktor 5,7 im Vergleich zu Glucose als einziger C-Quelle erzielt werden (Tab. 18). Das Verhältnis der Aktivitäten blieb jedoch in einem Bereich zwischen 4,4 und 5,4 konstant. Dies unterstützt die Annahme, dass AcoA für beide Aktivitäten verantwortlich ist.

### 6.1 Southern Blot

Um die Integration des *acoA*-Genes in das Genom zu überprüfen, wurde ein Southern Blot mit einer Sonde (Sonde II) gegen das *acoA*-Gen durchgeführt.

Dazu wurde DNA von den verschiedenen Transformanten und dem Wildtyp (WG355) isoliert und mit *SpeI* verdaut (siehe Material und Methoden 6.3).

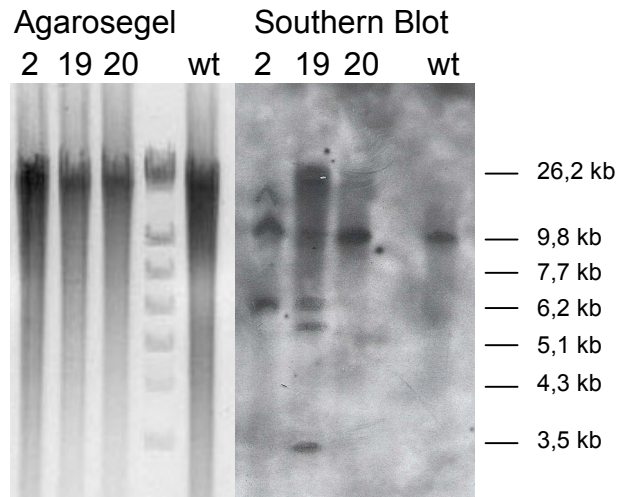


Abb. 25: Southern Blot der Transformanten und des Wildtyps.

Abbildung 25 zeigt das Agarosegel und den anschließenden Southern Blot. Der Wildtyp weist eine einzelne Bande in Höhe von ca. 9,8 kb auf. Der Stamm AcoA-ArgB Nr. 20 mit der höchsten Aktivität zeigt ebenfalls eine Bande in dieser Höhe. Eventuell waren die zusätzlichen Kopien in den Genlocus integriert oder ergaben zufälligerweise die selben Fragmentgrößen. Die Stämme Nr. 19 und Nr. 2 zeigen mehrere Banden, allerdings war bei Nr.19 keine erhöhte Aconitase-Aktivität festgestellt worden, was darauf schließen lässt, dass das Gen nur teilweise integriert wurde. Nr. 2 zeigte eine Verdopplung der Aconitase-Aktivität.

## 6.2 Reinigung der AcoA aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20

Während der Reinigung von AcoA aus dem Stamm AcoA-ArgB 20 wurden die Aconitase- und Midh-Aktivitäten parallel gemessen. Dazu wurden 8 g Acetatgewachsenes Mycel gemörsert und AcoA wie unter Material und Methoden 5.7 beschrieben aufgereinigt. Alle Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte wurden jeweils auf beide Aktivitäten getestet, um ein mögliches Aufspalten der Aktivitäten zu dokumentieren. Obwohl der Anreicherungsfaktor sehr

unterschiedlich war (siehe Tab. 19 und 20) konnten beide Aktivitäten immer nur in den jeweils selben Fraktionen nachgewiesen werden.

Tab. 19: Reinigungstabelle für die Aconitase-Aktivität, gemessen im gekoppelten Test mit *cis*-Aconitat.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	An- reicherung
Rohextrakt	485	252	1,92	100	1
40-80 % Pellet	178,3	114	1,56	37	0,8
Phenyl-Sepharose	49	15,2	3,22	10	1,7
Resource Q	1,08	3	0,36	0,3	0,2
Reactive Red 120	0,27	0,18	1,5	0,1	0,8

Tab. 20: Reinigungstabelle für die Midh-Aktivität, gemessen im gekoppelten Test mit Methyl-*cis*-aconitat.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Aus- beute (%)	An- reicherung	Ratio Ac/Midh
Rohextrakt	87,3	252	0,35	100	1	5,5 : 1
40-80 % Pellet	49,2	114	0,43	56	1,2	3,6 : 1
Phenyl- Sepharose	20	15,2	1,32	23	4	2,5 : 1
Resource Q	9,7	3	3,23	11	9	1 : 9
Reactive Red 120	4,8	0,18	26,7	5	76	1 : 17,8

Zunächst betrug die Aconitase-Aktivität das 5,5-fache der Midh-Aktivität. Im Verlauf der Reinigung nahm die spezifische Aconitase-Aktivität stark ab,

während die Midh eine im Verhältnis höhere spezifische Aktivität entwickelte: Zum Ende der Reinigung betrug die Midh-Aktivität das 17,8-fache der Aconitase-Aktivität. Die Umkehrung des Verhältnisses beider Aktivitäten erfolgte zwischen der Phenylsepharose und der ResourceQ. Da die Reinigung unter aeroben Bedingungen durchgeführt wurde, ist diese Abnahme der Aconitase-Aktivität möglicherweise durch den Verlust des labilen Eisens  $Fe_a$  aus dem  $4Fe-4S$ -Cluster zu erklären. Die Aktivität der Midh scheint von diesem Eisen unabhängig zu sein, sodass es zu einer stetigen Zunahme der spezifischen Aktivität kam. Abbildung 26 zeigt das aufgereinigte Protein als homogene einzelne Bande in Höhe von ca. 80 kDa.

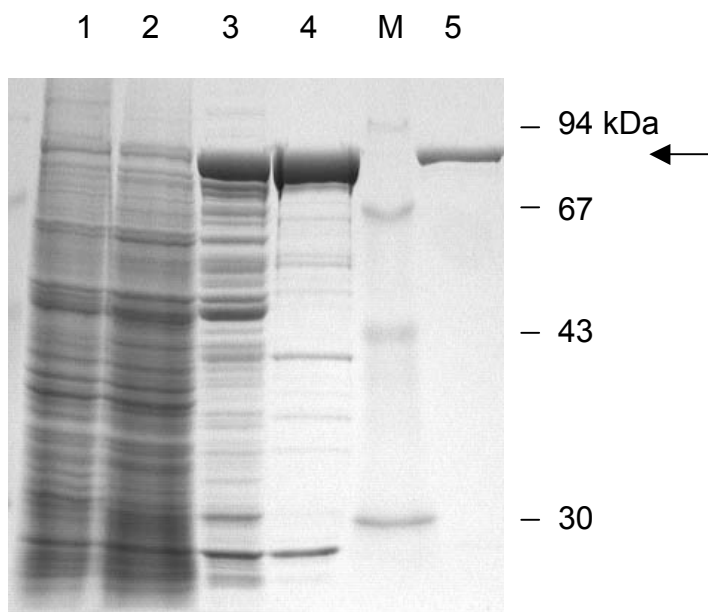


Abb. 26: SDS-Gel der Reinigung von AcoA. Spuren: 1. Rohextrakt (72  $\mu$ g); 2. 40-80 % Pellet (76  $\mu$ g), 3. Phenyl-Sepharose (19  $\mu$ g), 4. Resource Q (10  $\mu$ g); 5. Reactive Red (1,8  $\mu$ g); der Pfeil markiert die AcoA-Bande bei 82 kDa; M = Marker.

### 6.2.1 MALDI-TOF-Messung von AcoA

Eine Probe, bei der AcoA bis zu der Reinigungsstufe der Q-Sepharose gereinigt wurde, wurde ebenfalls tryptisch verdaut und am HKI in Jena wurden die Peptidmassen bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt. Die Abdeckung betrug 24,7 für das Genprodukt von *acoA*.



### 6.3 Reaktivierung der gereinigten AcoA

Da AcoA offensichtlich für die Midh- und die Aconitase-Aktivität verantwortlich ist, wurde getestet, ob sich die Aktivitätsverhältnisse wieder umkehren lassen. Dazu wurde gereinigte AcoA reaktiviert (siehe Material und Methoden 5.13). Anschließend wurden Volumina von 10 und 20  $\mu\text{l}$  entnommen und direkt in den jeweiligen Enzymtest eingesetzt. Die Volumenaktivität wurde auf das Ausgangsvolumen bezogen. Als Substrate dienten jeweils *cis*-Aconitat und Methyl-*cis*-aconitat im gekoppelten Test. Die Aktivitäten vor und nach Reaktivierung sind in Abb. 27 und Tab. 21 dargestellt.

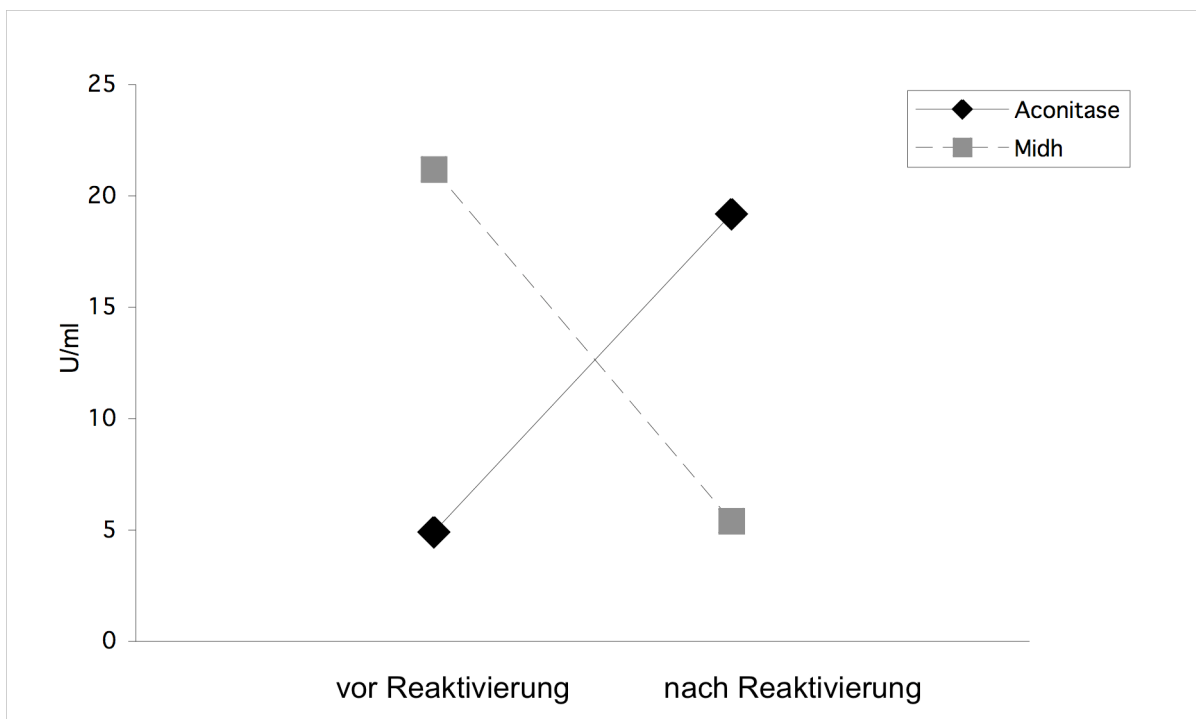


Abb. 27: Volumenaktivitäten von AcoA vor und nach Reaktivierung.

Tab. 21: Midh- und Aconitase-Aktivität von AcoA.

Aktivität	vor Reaktivierung (U/ml)	nach Reaktivierung (U/ml)	Faktor Änderung
Aconitase	4,9	19,2	+ 3,9
Midh	21,2	5,4	- 3,9
Ratio Midh:Aconitase	4,3 :1	1: 3,6	15,48

Die in Tab. 22 angegebenen Werte zeigen eine wechselseitige Abhängigkeit der beiden Aktivitäten von AcoA. Vor der Reaktivierung betrug die Midh-Aktivität das vierfache der Aconitase-Aktivität. Nach Reaktivierung war die Aconitase-Aktivität um fast das 4-fache erhöht, bei gleichzeitiger Verringerung der Midh-Aktivität. Hierbei stellten sich nahezu die gleichen Verhältnisse wie in den Rohextrakten ein. Da die Midh-Aktivität durch die Reaktivierung vermindert wurde, ist anzunehmen, dass diese Aktivität nicht unbedingt von einem intakten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand abhängig ist. Im Vergleich hierzu zeigte die Aconitase aus Rinderherz nach einer aeroben Reinigung zu 80 % Homogenität weder Aktivität mit *cis*-Aconitat noch mit Methyl-*cis*-Aconitat. In diesem Zustand lag das Enzym nahezu vollständig im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand vor. Reaktivierung führte zur Wiederherstellung beider Aktivitäten (Kennedy *et al.*, 1983) (Beinert *et al.*, 1983) (Beinert and Thomson, 1983). Daher scheint es signifikante Unterschiede zwischen Aconitase aus Säugern und aus *A. nidulans* zu geben.

## 7. Vergleichende Messungen der Aconitase-Aktivität

### 7.1 Aconitase-Aktivität aus Schweinherz

Um im eigenen Meßsystem die Ergebnisse aus Säugerherzaconitase zu bestätigen, wurde Aconitase aus Schweineherz über eine Aceton-Fällung angereichert (siehe Material und Methoden 5.10).

Die Probe wurde ebenso wie AcoA reaktiviert und die Aktivitäten im gekoppelten Test gemessen. Hierbei sollte herausgefunden werden, ob auch diese Aconitase Midh-Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster besitzt.

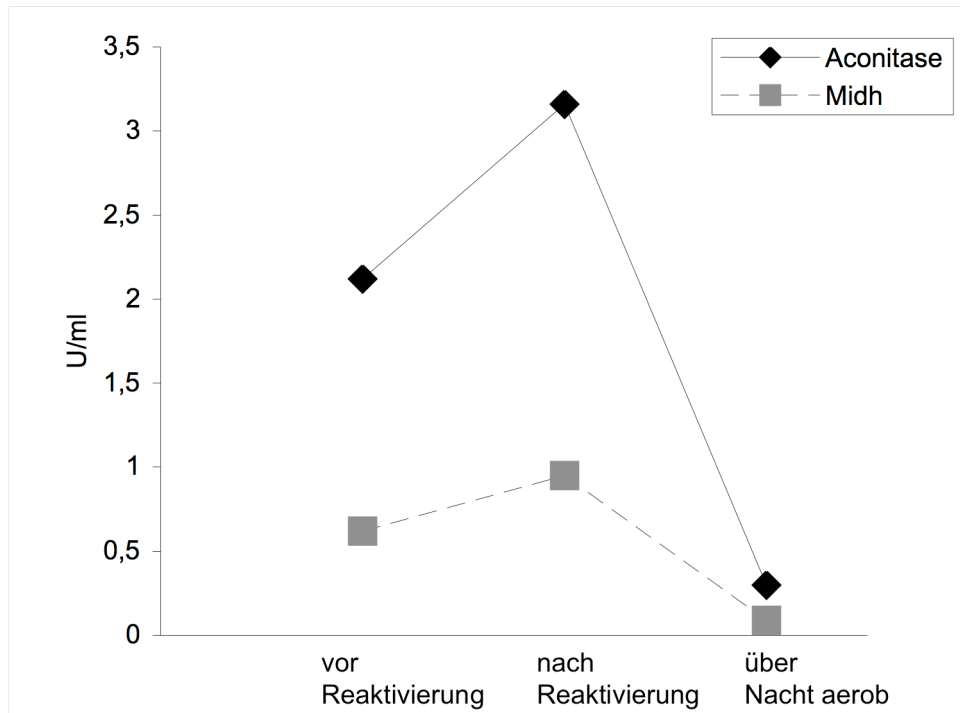


Abb. 28: Reaktivierung der Aconitase aus Schweineherz.

Tab. 22: Midh- und Aconitase-Aktivitäten aus Schweineherz (*Sus scrofa domestica*).

Aktivitäten	vor Reaktivierung (U/ml)	nach Reaktivierung (U/ml)	über Nacht bei 4°C (U/ml)
Aconitase	2,12 ± 0,15	3,16	0,30
Midh	0,62 ± 0,01	0,95	0,09
Ratio			
Midh/Aconitase	1:3,4	1:3,3	1:3,3

Im Gegensatz zu AcoA aus *A. nidulans* verfügt die Aconitase aus Schweineherz immer über eine relativ höhere Aconitase-Aktivität (Faktor 3,3 - 3,4). Beide Aktivitäten stammen von demselben Enzym ACO2 das nur im aktiven [4Fe-4S]<sup>+2</sup>-Zustand Aconitase- und Midh-Aktivität besitzt.

## 7.2 Reaktivierung der gereinigten AcoA für die EPR-Spektroskopie

Um die reaktivierte Aconitase EPR-spektroskopisch untersuchen zu können, mussten nach der Reaktivierung die Bestandteile des Reaktivierungsmix entfernt werden. Zunächst wurden 250  $\mu\text{l}$  der unter 6.2 beschriebenen, gereinigten AcoA (0,80 mg/ml Proteinkonzentration) reaktiviert (siehe Material und Methoden 5.13). Anschließend wurde das Enzym-Gemisch umgepuffert (siehe Material und Methoden 5.14). Die Fraktionen wurden auf ca. 230  $\mu\text{l}$  eingengt und die Aktivitäten bestimmt. Die Aktivitätsverteilung der Proben ist in der Abb. 29 und der Tab. 23 zusammengefasst. 200  $\mu\text{l}$  wurden in EPR-Röhrchen gefüllt und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Daten für die dazugehörige EPR-Spektroskopie sind unter Ergebnisse 10.2 zusammengefasst.

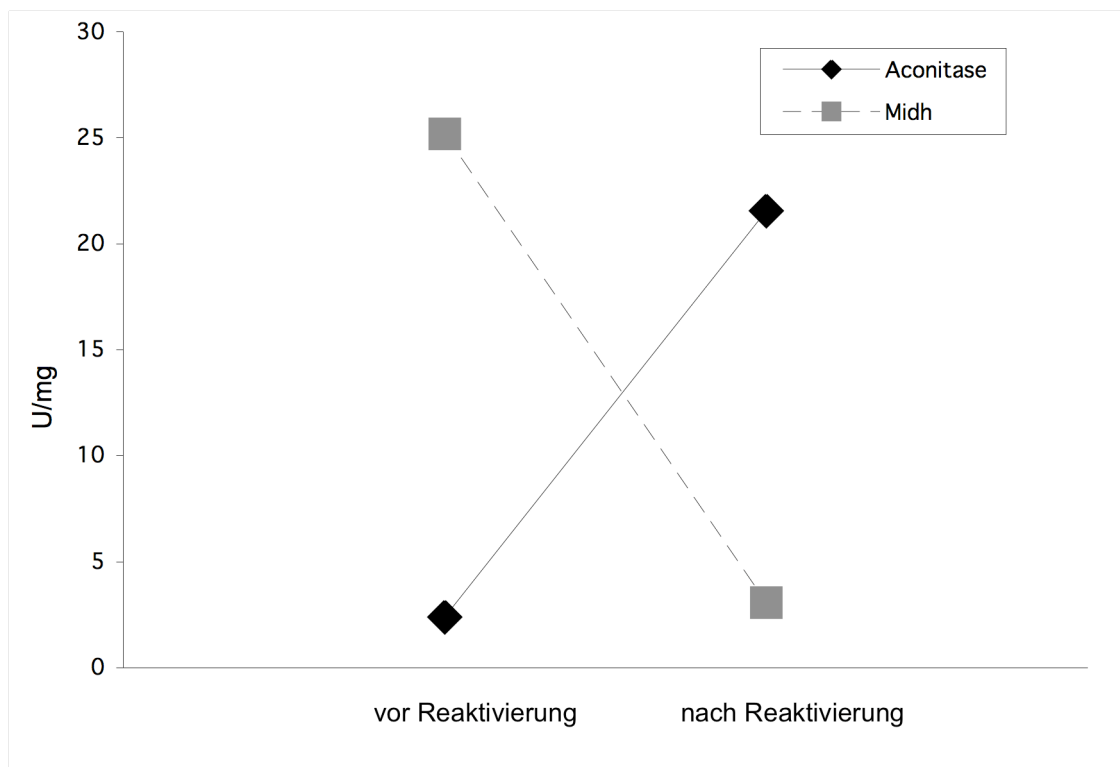


Abb. 29: Spezifische Aktivitäten von AcoA vor und nach Reaktivierung.

Tab. 23: Spezifische Aktivitäten von AcoA vor und nach Reaktivierung.

Aktivitäten	vor Reaktivierung (U/mg)	nach Reaktivierung (U/mg)
Aconitase	2,39 ± 0,04	21,55 ± 0,24
Midh	25,2 ± 1,41	3,07 ± 0,17
Ratio Midh/Aconitase	10,5 : 1	1:7

In diesem Versuch konnte das Ergebnis der vorherigen Reaktivierung bestätigt werden. Nach Entfernung des überschüssigen Cysteins aus dem Reaktivierungsmix konnte die Proteinmenge bestimmt und die spezifischen Aktivitäten errechnet werden. Vor Reaktivierung betrug die Midh-Aktivität das Zehnfache der Aconitase-Aktivität, nach Reaktivierung betrug die Aconitase- das Siebenfache der Midh-Aktivität. Daher können die einzelnen Proben als spezifisch für die einzelnen Aktivitätszustände angesehen werden (siehe EPR-Messung 10.2).

### 7.3 Reaktivierung des Rohextraktes

Um zu testen, ob sich die Verhältnisse der Aktivitäten auch im Rohextrakt beeinflussen lassen, wurden ca. 0,2 g Mycel des Stammes AcoA-ArgB Nr. 20 (100 mM Acetat, 20 mM Propionat) aufgeschlossen und in 1 ml 50 mM KPP pH 7,2 aufgenommen. Nach Zentrifugation wurde der Überstand mit dem Reaktivierungsmix im Verhältnis 1:2 versetzt und für 2,5 h inkubiert. Anschließend wurden Volumina von 5 µl entnommen und direkt in den gekoppelten Test gegeben.

Tab. 24: Reaktivierung des Rohextraktes.

Aktivitäten	vor Reaktivierung (U/ml)	nach Reaktivierung (U/ml)
Aconitase	3,17	3,47
Midh	1,41	1,37
Ratio Midh:Aconitase	1: 2,2	1:2,5

Die in Tabelle 24 angegebenen Werte zeigen, dass sich die Aconitase-Aktivitäten im Rohextrakt kaum steigern ließ. Die Midh nahm geringfügig ab. Das Verhältnis von 1 : 2 ließ sich nur auf 1 : 2,5 steigern. Somit konnte das Ergebnis der letzten Reaktivierung mit einem Verhältnis von 1 : 6 – 1 : 7 nicht erreicht werden. Dies kann auf den Einfluss inhibierender Metabolite im Rohextrakt zurückzuführen sein, die eine effektive Reaktivierung verhindern.

#### **7.4 Anreicherung der AcoA aus dem überproduzierenden Stamm AcoA-ArgB 20**

Um AcoA mit überwiegender Aconitase-Aktivität zu erhalten wurde die Reinigung auf die Ammoniumsulfatfällung und die Phenylsepharose beschränkt. Da bis zu diesem Reinigungsschritt die spezifische Aktivität stetig anstieg, ist davon auszugehen, dass ein Großteil des Enzyms noch das labile Eisen ( $Fe_a$ ) enthält. Es wurden rund 16 g Mycel des Stammes AcoA-ArgB 20, der auf 100 mM Acetat gewachsen war, aufgeschlossen und AcoA angereichert. Anschließend an die Ammoniumsulfat-Fällung wurde das Pellet wieder in Puffer gelöst und wegen der großen Proteinmenge in 3 Fraktionen über die Phenylsepharose gereinigt. Die Proben wurden jeweils ankonzentriert, die Enzymaktivitäten bestimmt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben konnten so über mehrere Wochen gelagert werden. Dieses verkürzte Reinigungsprotokoll war notwendig, um größere Mengen aktives Protein zu erhalten, das für die nachfolgenden Aktivitätsbestimmungen und spektroskopischen Untersuchungen benötigt wurde.

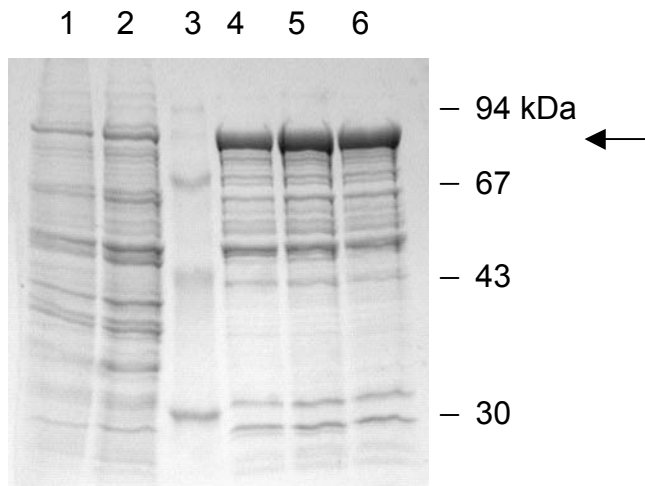


Abbildung 30: SDS-Gel der Anreicherung von AcoA: Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: 40-80 % Ammoniumsulfatfällung, Spur 3: Marker, Spur 4-6: Pools 1-3.

Das SDS-Gel in Abbildung 30 zeigt eine  $\approx 70$  %ige Anreicherung von AcoA. In den Tabellen 25 und 26 sind die Aktivitäten während der Anreicherung wiedergegeben. Wie aus Tabelle 25 zu ersehen ist, überwiegt die Aconitase-Aktivität nach Reinigung über die Phenylsepharose noch deutlich. Das bestätigt die Vermutung, dass nach dieser Prozedur ein Großteil der Aconitase noch einen aktiven  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster trägt.

Tab. 25: Reinigungstabelle für die Aconitase-Aktivität.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)
Rohextrakt	1547	747	2,1
40-80 % Pellet	1301	472	2,8
Phenyl I	133,3	27,1	4,9
Phenyl II	154,5	25,9	6,0
Phenyl III	131,1	23,5	5,6

Tab. 26: Reinigungstabelle für die Midh-Aktivität.

Reinigungsstufe	Aktivität (U)	Protein (mg)	spez. Aktivität (U/mg)	Ratio Ac/Midh
Rohextrakt	290	747	0,39	5,4:1
40-80 % Pellet	200	472	0,42	6,7:1
Phenyl I	28,2	27,1	1,0	4,9:1
Phenyl II	36,0	25,9	1,4	4,3:1
Phenyl III	25,2	23,5	1,1	5,1:1

Die Midh-Aktivität von AcoA betrug zwischen 1,0 und 1,4 U/mg. Die Aconitase-Aktivität betrug zwischen 4,9 und 6,0 U/mg.

## 8. Wirkung von Eisenchelatoren auf die Aktivitätsverteilung von AcoA

### 8.1 Dialyse gegen Phenanthrolin

Die verschiedenen Cluster-Zustände der Aconitase  $[4\text{Fe-4S}]^{+1,+2}$ ,  $[3\text{Fe-4S}]^{0,+1}$  lassen sich relativ leicht ineinander umwandeln. Für die Umwandlung der 4Fe-4S- Form in die 3Fe-4S-Formen haben sich Eisenchelatoren bewährt, wie z.B. *o*-Phenanthrolin, welches eine größere Affinität zu Fe(II) als zu F(III) besitzt (Plank *et al.*, 1989). Nach Anreicherung von AcoA (siehe Material und Methoden 5.8) wurden 300  $\mu\text{l}$  Enzymprobe (53 mg/ml) gegen 250 ml Puffer dialysiert (50 mM Tris-HCl pH 7,5). Der Puffer enthielt zusätzlich 1 mM Phenanthrolin. Nach ca. 30 min setzte eine Rosafärbung der Probe ein. Dies ist auf eine Chelatisierung des Eisens durch *o*-Phenanthrolin zurückzuführen, welche auch zur Eisenbestimmung genutzt wird (Plank *et al.*, 1989). Zum Messen der Aktivitäten wurden nach einer Stunde Proben von 2 bis 5  $\mu\text{l}$  entnommen und direkt in den jeweiligen Testansatz pipettiert. Die Aktivitätsverteilung ist in Abb. 31 und Tab. 27 dargestellt.



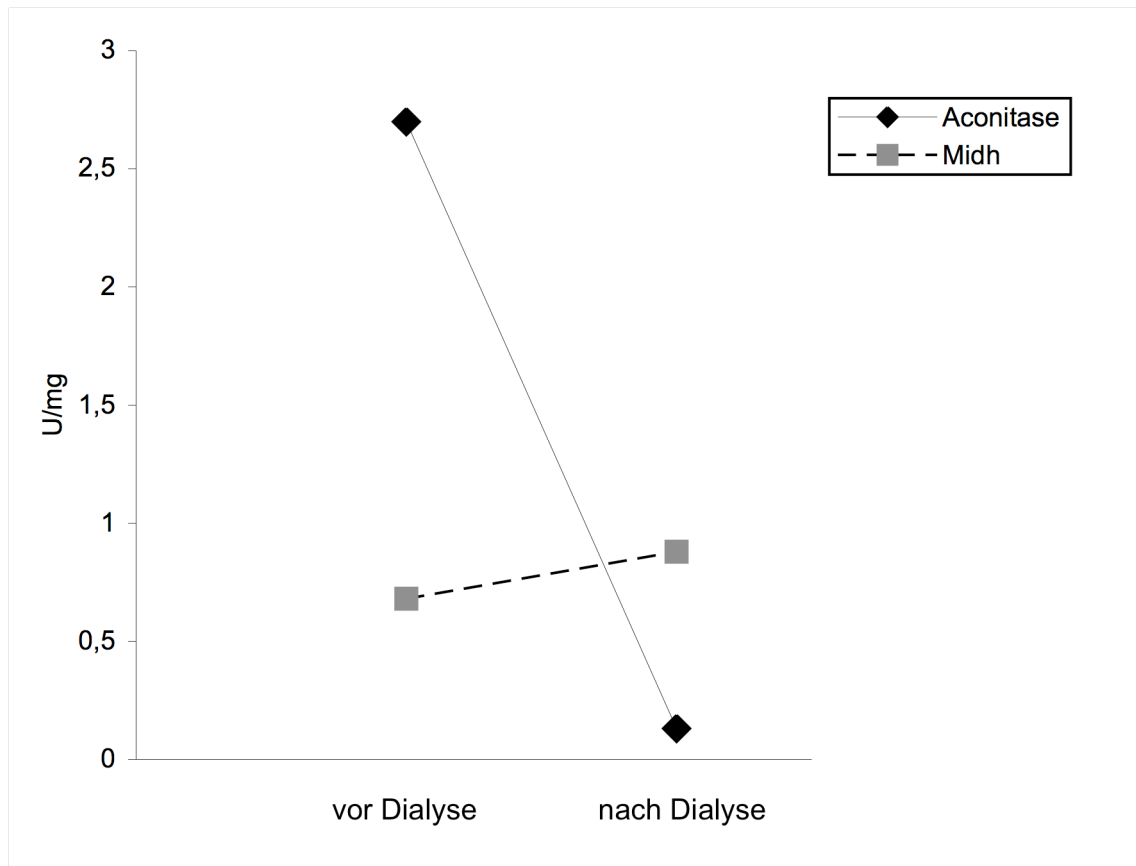


Abbildung 31: Spezifische Aktivitäten vor und nach Dialyse gegen Phenanthrolin.

Tab. 27: Aktivitäten von AcoA vor und nach Dialyse gegen Phenanthrolin.

Aktivitäten	vor Dialyse (U/mg)	nach Dialyse (U/mg)
Aconitase	2,70	0,13 ± 0,01
Midh	0,68	0,88 ± 0,03
Verhältnis		
Midh/Aconitase	1 :4	6,7:1

Nach der Anreicherung über Ammoniumsulfatfällung und Phenyl-Sepharose enthielt AcoA noch überwiegend Aconitase-Aktivität; durch Dialyse gegen *o*-Phenanthrolin verringerte sich die Aconitase-Aktivität um den Faktor 20 von 2,7 auf 0,13 U/mg. Gleichzeitig stieg die Midh-Aktivität um den Faktor von 1,3 von 0,68 auf 0,88 U/mg an. Dies zeigt deutlich, dass die Aconitase-Aktivität stark reduziert wird, wobei ein leichter Anstieg der Midh-Aktivität zu verzeichnen ist.

Dies wurde wahrscheinlich durch die Chelatisierung des Eisens verursacht. Da sich Phenanthrolin irreversibel an das Protein bindet, ergeben sich Schwierigkeiten bei den spektroskopischen Messungen. Daher wurde in weiteren Versuchen EDTA als alternativer Eisenchelator eingesetzt. In Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem EDTA konnte Kennedy (Kennedy *et al.*, 1983) zeigen, dass EDTA nicht an die Aconitase bindet, sondern der Clusterabbau durch Oxidation eingeleitet wird und EDTA das freie Eisen bindet. Daher ist es möglich den Fe-EDTA-Komplex über Dialyse zu entfernen und das Enzym spektroskopisch zu untersuchen.

### 8.2 Dialyse gegen EDTA I (hohe EDTA-Konzentration)

In einer Dialyse gegen EDTA-haltigen Puffer sollte die Wirkung dieses Chelators auf die Aconitase- und Midh-Aktivität getestet werden. Zunächst wurden 300  $\mu\text{l}$  angereicherte AcoA (30 mg/ml Proteinkonzentration) (siehe Ergebnisse 7.4) gegen 500 ml 50 mM Tris-HCl pH 7,5 dialysiert. In stündlichen Abständen wurden Proben entnommen und die Aktivitäten gemessen. Nach 2 h wurde der Dialyse-Puffer mit 2 mM EDTA versetzt und weitere Proben entnommen.

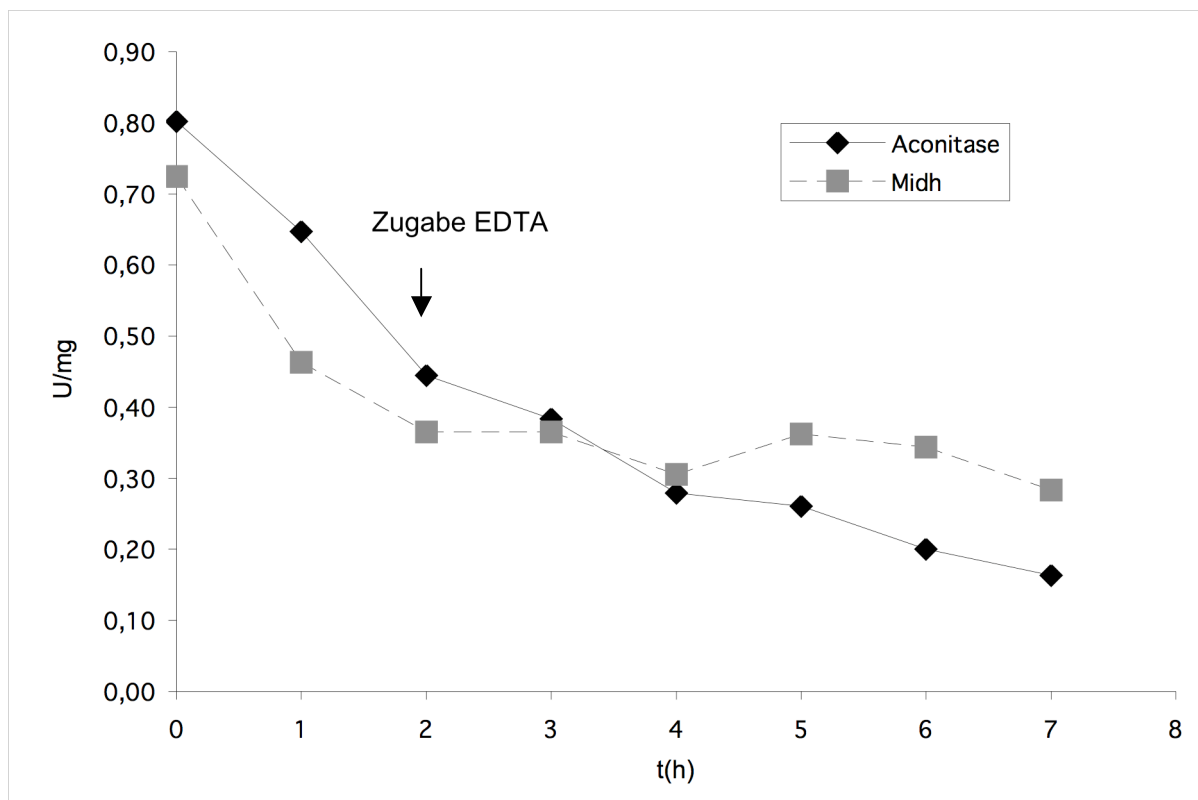


Abb. 32: Spezifische Aktivitäten während Dialyse gegen EDTA.

---

Zunächst verringerten sich beide Aktivitäten parallel, was auf den Puffereinstrom und auf eine Destabilisierung durch Verdünnung des Enzyms zurückzuführen ist. Nach Zugabe von EDTA nach 2 h veränderte sich das annähernd konstante Verhältnis von Midh zu Aconitase: Die Midh-Aktivität schwankte um einen Mittelwert, während die Aconitase-Aktivität kontinuierlich abnahm. Die relativ hohe Konzentration an EDTA von 2 mM scheint zu einem gleichzeitigen Verlust beider Aktivitäten zu führen, da nicht nur das labile Eisen, sondern auch weitere Eisenatome aus dem Cluster chelatisiert wurden. Um diesen Effekt zu vermindern, wurden in nachfolgenden Dialysen die EDTA-Konzentration um einen Faktor von 500 auf 4  $\mu$ M reduziert.

### **8.3 Dialyse gegen EDTA II (niedrige Konzentration mit Fe-S-Bestimmung)**

Um zu verhindern, dass es zum Puffereinstrom während der Dialyse kommt, wurde die Pufferkonzentration auf 200 mM Tris-HCl pH 7,5 erhöht. Es wurden 250  $\mu$ l angereicherte AcoA (50 mg/ml Proteinkonzentration) über einen Zeitraum von 12 h gegen diesen Puffer, dem 4  $\mu$ M EDTA zugesetzt wurde, dialysiert. Anschließend wurden die Aktivitäten und Konzentrationen an Eisen und Sulfid bestimmt. Abbildung 33 und Tab. 28 zeigen die Aktivitäten bzw. deren Verhältnisse vor und nach Dialyse.

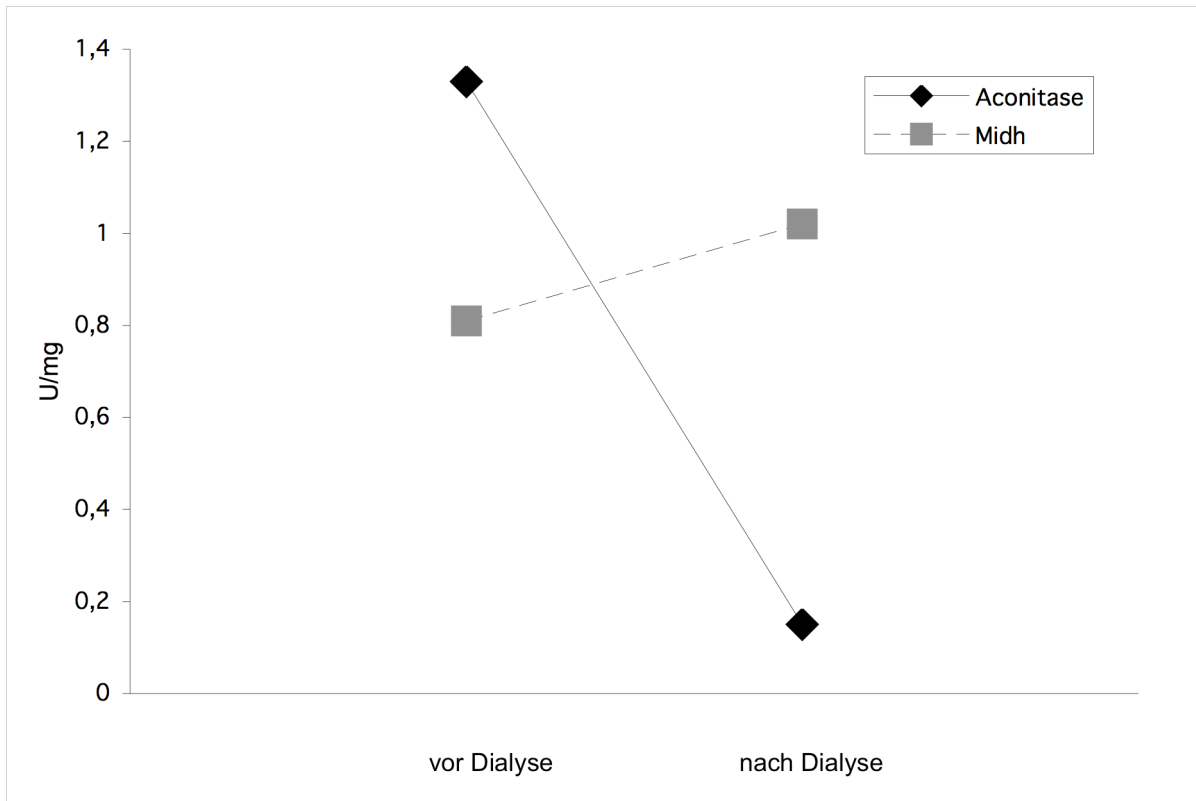


Abb. 33: Spezifische Aktivitäten vor und nach Dialyse gegen EDTA.

Da die angereicherte Probe vor Dialyse nicht umgepuffert wurde, sondern nur eingeeengt war, befanden sich noch ca. 0,6 M Ammoniumsulfat in der Probe. Dadurch kam es bei der Dialyse zum Einstrom von Wasser. Das Volumen der Probe nahm zu (von 250  $\mu\text{l}$  auf 400  $\mu\text{l}$ ) bei gleichzeitiger Abnahme der Proteinkonzentration (von 52,3 mg/ml auf 33,5 mg/ml), was durch die Berechnung der spezifischen Aktivitäten berücksichtigt wurde.

Tab. 28: Die Aktivitäten von AcoA vor und nach Dialyse gegen EDTA.

Aktivitäten	vor Dialyse (U/mg)	nach Dialyse (U/mg)
Aconitase	1,33	0,15 ± 0,01
Midh	0,81	1,02 ± 0,002
Ratio Midh/Aconitase	1:1,6	6,8:1

Nach Dialyse gegen EDTA nahm die Aconitase-Aktivität um das 9-fache ab, die Midh-Aktivität stieg um das 1,3-fache an. Dies scheint zu bestätigen, dass eine

geringere EDTA-Konzentration besser geeignet ist, das labile Eisen aus dem Cluster zu entfernen.

Tab. 29: Fe-S-Konzentrationen der Enzymprobe vor und nach Dialyse gegen EDTA.

Fe (nmol/10 $\mu$ l)	S (nmol/10 $\mu$ l)	AcoA* (nmol/10 $\mu$ l)	Ratio Fe:AcoA	Ratio S:AcoA	Fe/S
Vor Dialyse					
4,77	6,50	3,19	1,5:1	2,0:1	0,75
Nach Dialyse					
2,10	2,0	2,04	1,0:1	1,0:1	1

\*bei der Annahme das AcoA zu 50 % Reinheit vorlag und die molekulare Masse von AcoA 82 000 Da beträgt.

In der Tabelle 29 sind die Fe- und S- Konzentrationen der Enzymprobe vor und nach Dialyse gegen EDTA wiedergegeben. Durch die Dialyse verliert der Cluster Eisen und Sulfid, letzteres entweicht teilweise als H<sub>2</sub>S. Der Eisengehalt nahm um 50 % ab, der Sulfidgehalt sogar um 70 %. Gleichzeitig nahm Aconitase-Aktivität um 90 % ab. Die Midh-Aktivität stieg an, was dafür spricht, dass AcoA mit einem unvollständigen Cluster Midh-Aktivität aufweist. Die Ratio von 1:1 (Tab. 29) der dialysierten Probe könnte damit zusammenhängen, dass der Eisen-EDTA-Komplex durch die Dialyse nicht abgetrennt und in die Eisenbestimmung einbezogen wurde. Aerob gereinigte Rinderherzaconitase wies eine Ratio von Eisen zu Sulfid von 0,66-0,74 auf (Beinert *et al.*, 1983). Der genaue Zustand eines Clusters in einer nicht-homogenen Enzymlösung ist nicht direkt zu bestimmen, da auch Apoenzym auftreten kann, welches das Ergebnis verfälscht. Daher wurden in späteren Versuchen EPR- und Mössbauerspektren für diese Bestimmung hinzugezogen.

## 9. $K_m$ -Wert-Bestimmung

Zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes wurde entweder eine angereicherte Probe verwendet oder eine gereinigte Probe reaktiviert, sodass das Verhältnis Midh:Aconitase ca. 1:1 betrug. Die Bestimmungen wurden in 50 mM Tris-HCl

pH 7,5 durchgeführt. Für die Messung wurden gleiche Volumina unterschiedlicher Substratkonzentration zugegeben und die Extinktion bei 240 nm verfolgt. Die  $K_m$ -Werte wurden mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots errechnet.

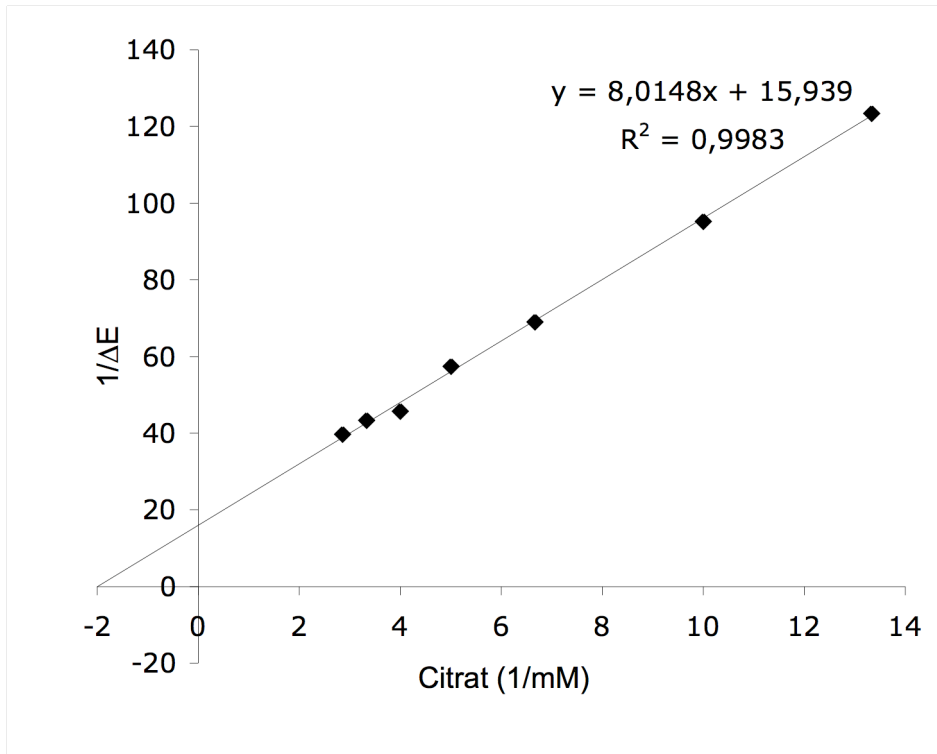


Abb. 34: Lineweaver-Burk-Auftragung für Citrat;  $K_m = 0,503$  mM.

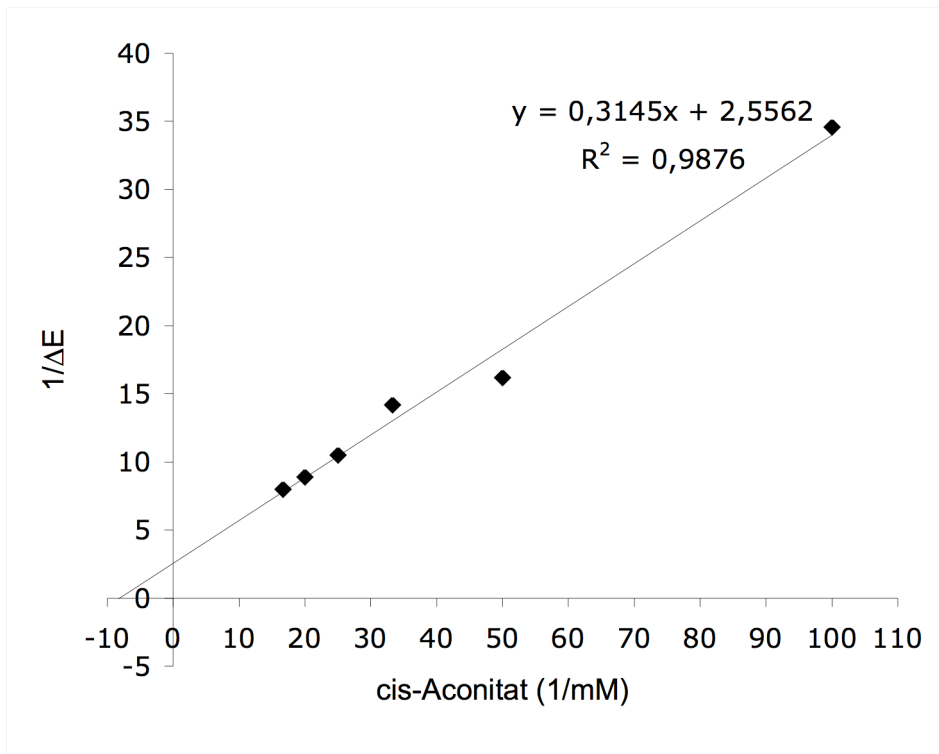


Abb. 35: Lineweaver-Burk-Auftragung für *cis*-Aconitase;  $K_m = 0,123$  mM.

Bei *cis*-Aconitase als Substrat wurde ein  $K_m$ -Wert von 0,123 mM mit Hilfe des Lineweaver-Burk-Plots errechnet. Allerdings war  $V_{max}$  schon bei einer Substratkonzentration von 0,06 mM erreicht, woraus sich ein  $K_m$  von 0,025 mM in der Michaelis-Menten-Auftragung bestimmen lässt. Ab 0,06 mM trat Substratinhibierung auf. Daher erscheint der Wert von 0,025 mM wahrscheinlicher.

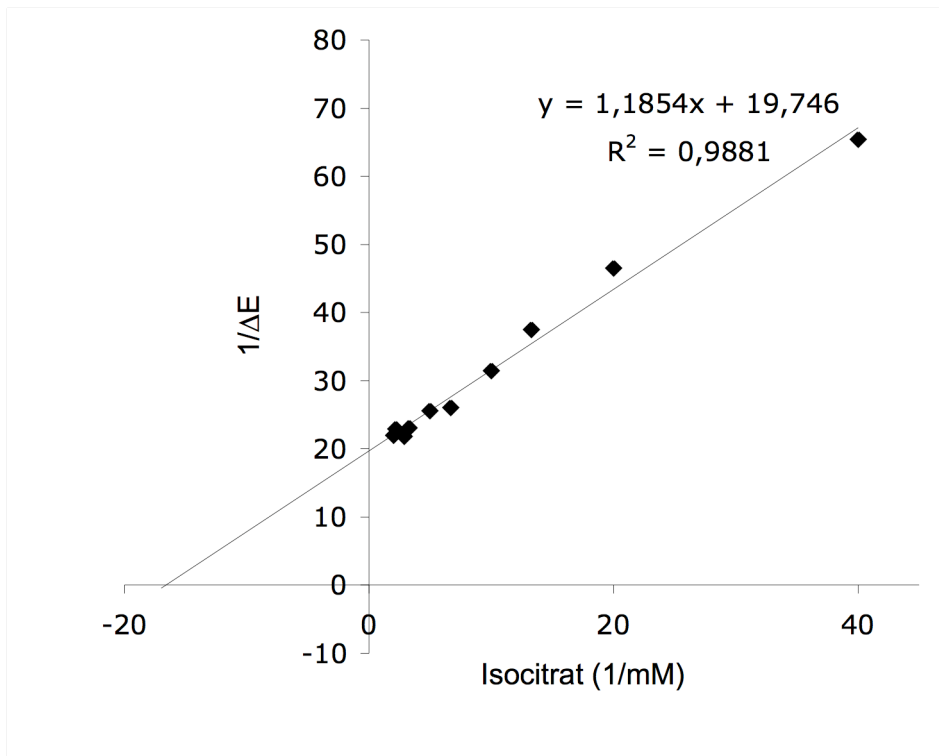


Abb. 36: Lineweaver-Burk-Auftragung für Isocitrat;  $K_m = 0,060$  mM.

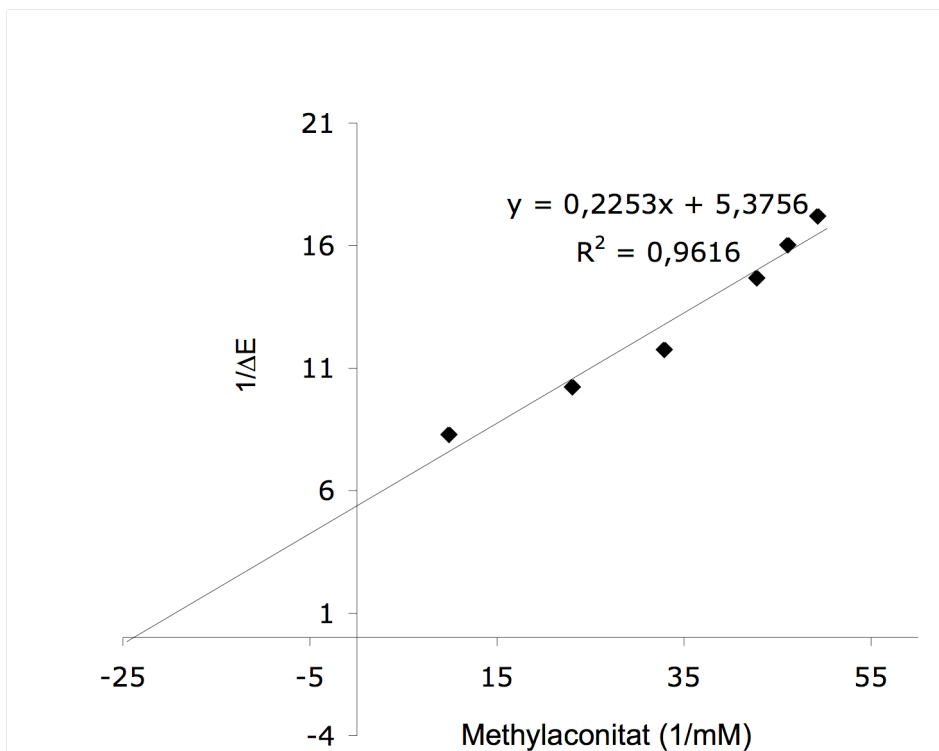


Abb. 37: Lineweaver-Burk-Auftragung für Methyl-*cis*-aconitat;  $K_m = 0,042$  mM.



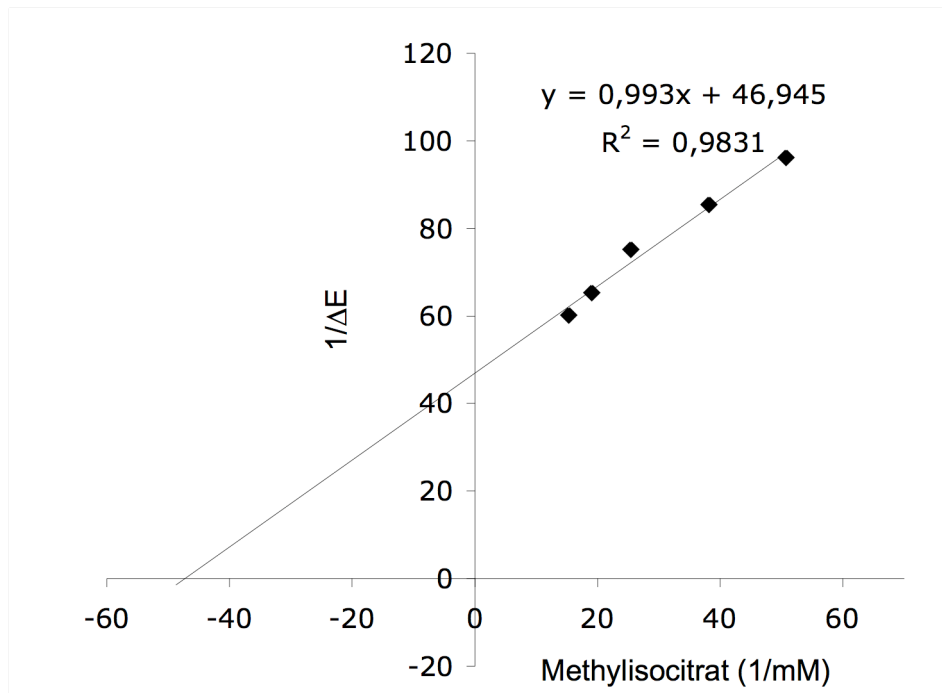


Abb. 38: Lineweaver-Burk-Auftragung für Methylisocitrat;  $K_m = 0,021$  mM.

Tab. 30:  $K_m$ -Werte für AcoA (*A. nidulans*) im Vergleich zu Rinderherz-Aconitase.

Substrat	$K_m$ -Werte für AcoA (mM)	$K_m$ -Werte* für ACO2 (mM)
Citrat	0,503	1,630
<i>cis</i> -Aconitat	0,123 (0,025)**	0,030
Isocitrat	0,060	0,076
Methyl- <i>cis</i> -aconitat	0,042	0,050
Methylisocitrat	0,021	0,214

\*(Beach *et al.*, 1977)

\*\* $K_M$  in der Michaelis-Menten-Auftragung

In Tab. 30 sind die  $K_m$ -Werte für AcoA und die mitochondriale Aconitase aus Rinderherz zusammengefasst. Die Werte zeigen eine hohe Übereinstimmung, bis auf die Werte für Citrat und Methylisocitrat. Bei diesen Substraten liegen die  $K_m$ -Werte für die Säugeraconitase deutlich über denen für die pilzliche Aconitase. Im Falle von Methylisocitrat unterscheiden sich die Werte um den Faktor 10. Da für AcoA mit dem Substrat *cis*-Aconitat ab einer Konzentration von 0,06 mM

Substrathemmung auftrat, wurde der  $K_m$  aus der Michaelis-Menten Auftragung abgeschätzt (0,025 mM). Dieser Wert entspricht dem der Aconitase aus Rinderherz. Um zu prüfen, ob sich der  $K_m$ -Wert mit dem Zustand des Clusters ändert, muß man die Bestimmung mit verschiedenen Proben von AcoA (reaktiviert, dialysiert) wiederholen.

## 10. EPR Spektroskopie

### 10.1 Messung der gereinigten AcoA

Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie können paramagnetische Zentren, die eine ungerade Elektronenanzahl enthalten, analysiert werden. Für die Eisen-Schwefel-Proteine bedeutet dies, dass der paramagnetische Zustand nur in bestimmten Oxidationsstufen auftritt. Sehr viele Eisen-Schwefel-haltige Proteine sind Oxido-Reduktasen, d.h. sie katalysieren Elektronentransfers. In einigen Proteinen treten mehrere paramagnetische Zentren auf, die miteinander in Wechselwirkung treten können. Die paramagnetischen Zentren können verschiedene spektroskopische Eigenschaften aufweisen, wie verschiedene  $g$ -Werte, unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten usw. Durch Zugabe von Substrat lassen sich unter Umständen auch Übergangszustände herstellen, die unterschiedliche spektroskopischen Eigenschaften haben. Besonders interessant ist die Möglichkeit der Quantifizierung: bei einem System mit  $S = \frac{1}{2}$  ist die doppelt integrierte Intensität des Spektrums proportional zur Spin-Konzentration. Dies trifft allerdings nur zu, wenn das Signal ungesättigt ist. Durch Vergleich mit einem Kupfer(II)-Standard lässt sich so die Konzentration an paramagnetischen Zentren in der Probe ermitteln (Cammack *et al.*, 1985).

### 10.2 Messung der gereinigten und reaktivierten AcoA

Nach der Reinigung (analog zu der unter 6.2 beschriebenen) wurde ein Teil der Probe reaktiviert, in 10 mM Tris-HCl pH 7,5 umgepuffert und in einer Konzentration von 1 mg/ml in EPR-Röhrchen eingefroren. Der andere Teil wurde ebenfalls umgepuffert und sowohl mit als auch ohne Substrat (Methyl-*cis*-aconitat) in EPR-Röhrchen eingefroren. Die Ergebnisse der Reaktivierung wurden unter 7.2 beschrieben. Das EPR-Spektrum ist in Abb. 39 dargestellt.

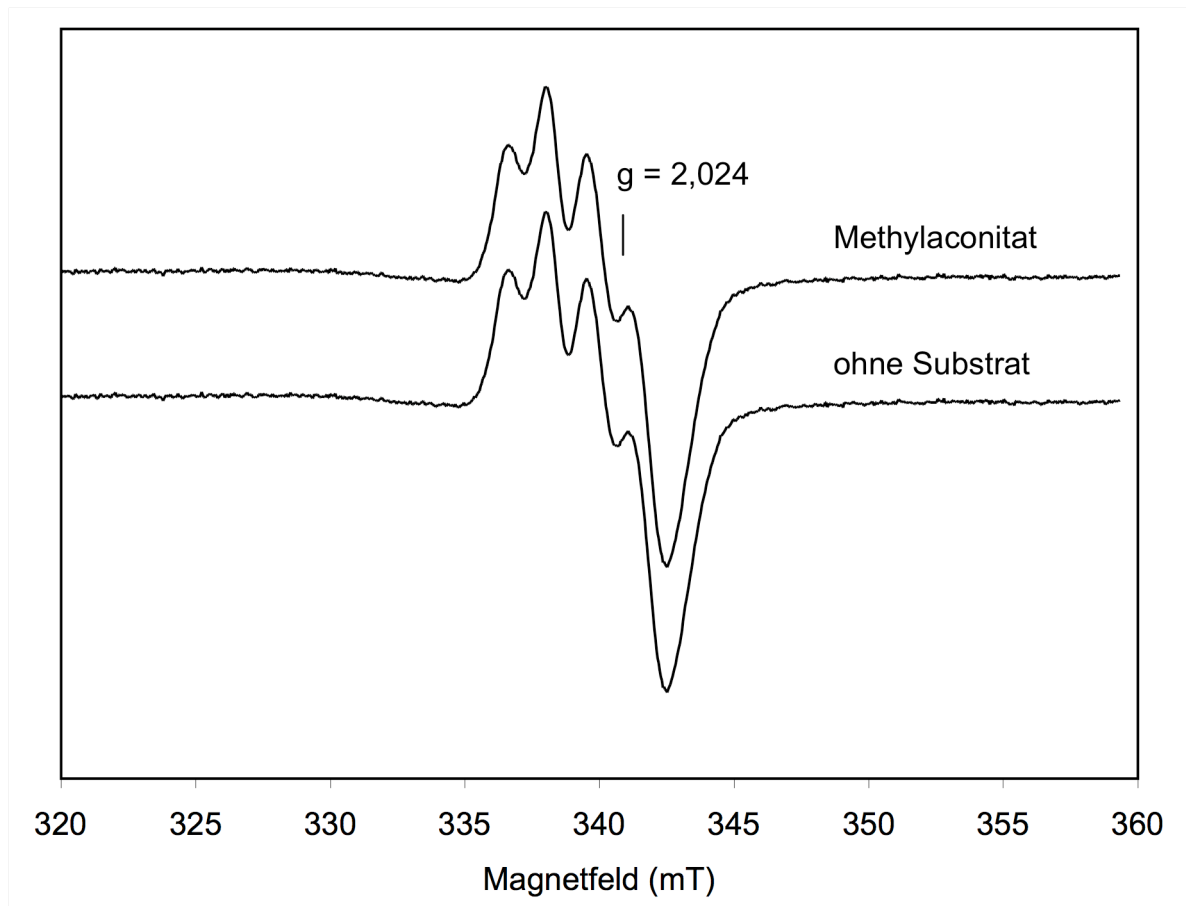


Abb. 39: X-Band EPR-Spektrum der gereinigten AcoA ohne Reaktivierung (1 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 7,5; Endkonzentration Substrat (Methyl-*cis*-aconitat) 7,5 mM;  $T = 10$  K; Mikrowellenleistung 0,80 mW; Modulationsamplitude 1 mT; Mikrowellenfrequenz 9,635 GHz; die  $g$ -Werte betragen für beide Spektren 2,024. Die Amplituden waren innerhalb der Fehlergenauigkeit gleich groß.

Das EPR-Spektrum spricht dafür, dass die vollständig gereinigte Aconitase zum Großteil abgebaute Cluster enthielt, die weder einen eindeutigen Rückschluss auf das Vorliegen eines [4Fe-4S] noch eines [3Fe-4S] Cluster zulassen und höchstwahrscheinlich nur inaktives Enzym repräsentieren. Diese Folgerung kann gezogen werden, da das Spektrum nach Substratzugabe unverändert blieb. Bei Substratbindung in der Nähe des Clusters hätte es zu einer Beeinflussung des Signals kommen müssen.

Das Signal zeigt starke Ähnlichkeiten zur Aconitase AcnA aus *E. coli* nach aerober Dialyse des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Zustandes gegen EDTA (Bennett *et al.*, 1995). Dieses Signal spiegelte einen weiteren Abbau des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Clusters wieder,

denn durch Reaktivierung konnte dieser Zustand wieder in das ursprüngliche Signal des  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters ( $g = 2,01$ ) umgewandelt werden.

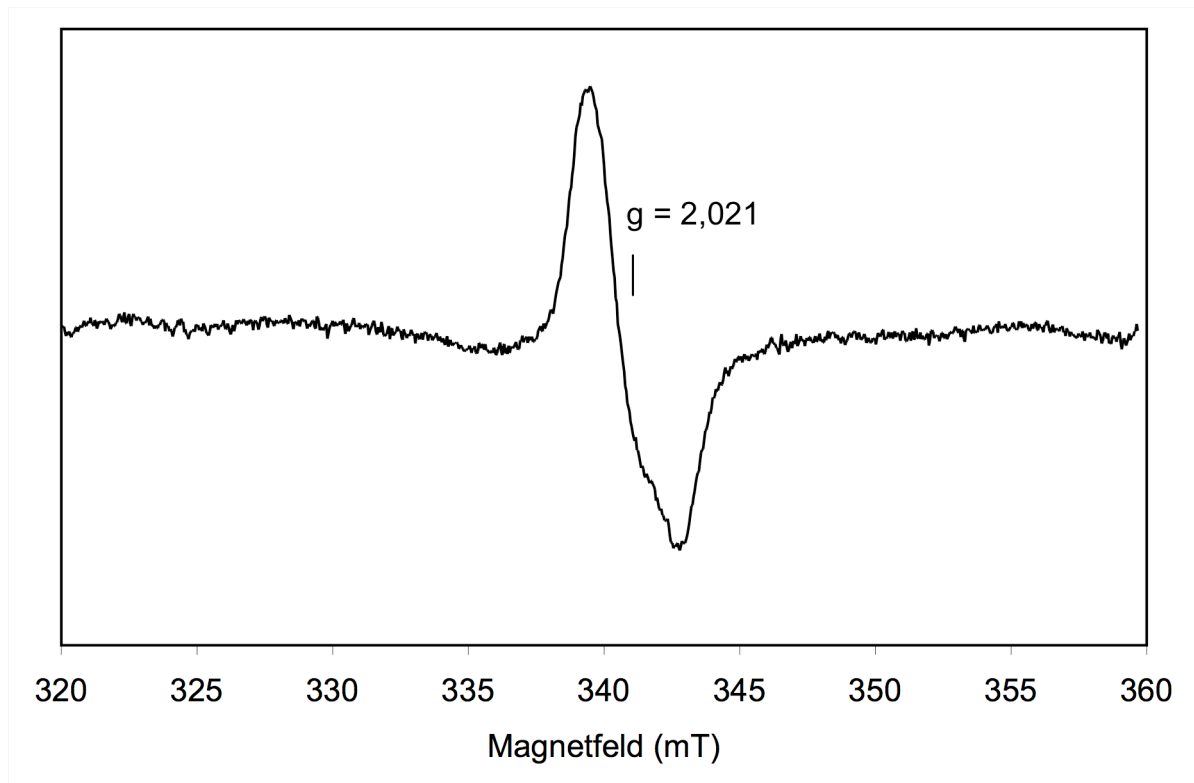


Abb. 40: X-Band EPR-Spektrum von AcoA nach Reaktivierung 1 mg/ml, in 10 mM Tris-HCl pH 7,5  $T = 10$  K, Mikrowellenleistung 0,80 mW, Modulationsamplitude 1 mT, Mikrowellenfrequenz 9,635 GHz. Das Spektrum entspricht einem  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster (ca. 4 % der gesamten Aconitase).

Das Spektrum in Abb. 40 bestätigt diese Annahme, da ein Signal nach Reaktivierung erhalten wurde, welches dem  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters der Aconitase aus *E. coli* und aus Rinderherz entspricht (Bennett *et al.*, 1995) (Kennedy and Beinert, 1988). Der durch die Reaktivierung vermutlich ebenfalls entstandene  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster ist diamagnetisch und EPR-spektroskopisch nicht sichtbar. Der  $g$ -Wert des  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters aus Rinderherz betrug 2,01 (Ruzicka and Beinert, 1978) und weicht nur leicht von dem hier gemessenen von 2,021 ab. Durch Eichung gegen einen Kupfer-Standard konnte die Konzentration an paramagnetischen Clustern in der reaktivierten Probe bestimmt werden. Die Konzentration an  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clustern in der Probe betrug  $0,48 \mu\text{M}$ . (Proteingehalt: 1 mg/ml, molare Masse AcoA = 82 000 g/mol). Bei einer Proteinkonzentration von  $12,2 \mu\text{mol/l}$  entspricht das einem Anteil von 4 %. Die

restlichen 96 % Protein enthielten entweder keinen Cluster (Apoenzym) oder eine EPR-stumme Form, wie den  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ -Cluster. Es war also über diese Methode der Reaktivierung möglich, einen Großteil des Enzyms in EPR-stumme Formen zu überführen. Die geringe Midh-Aktivität dieser Probe scheint mit der geringen Anzahl an  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Clustern zu korrelieren.

### 10.3 Messung der angereicherten AcoA mit Substrat

Nach vollständiger Reinigung lag die Aconitase in einem Zustand vor, in dem nur Abbauprodukte des  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster detektiert werden konnten (siehe Abb. 39). Daher sollte in einer weiteren Messung der Cluster-Zustand nach Anreicherung bestimmt werden. Falls es sich bei dem  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Zustand um die aktive Midh handelt, sollten sich durch Substrat-Zugabe die Form des Spektrums und möglicherweise der g-Wert ändern.

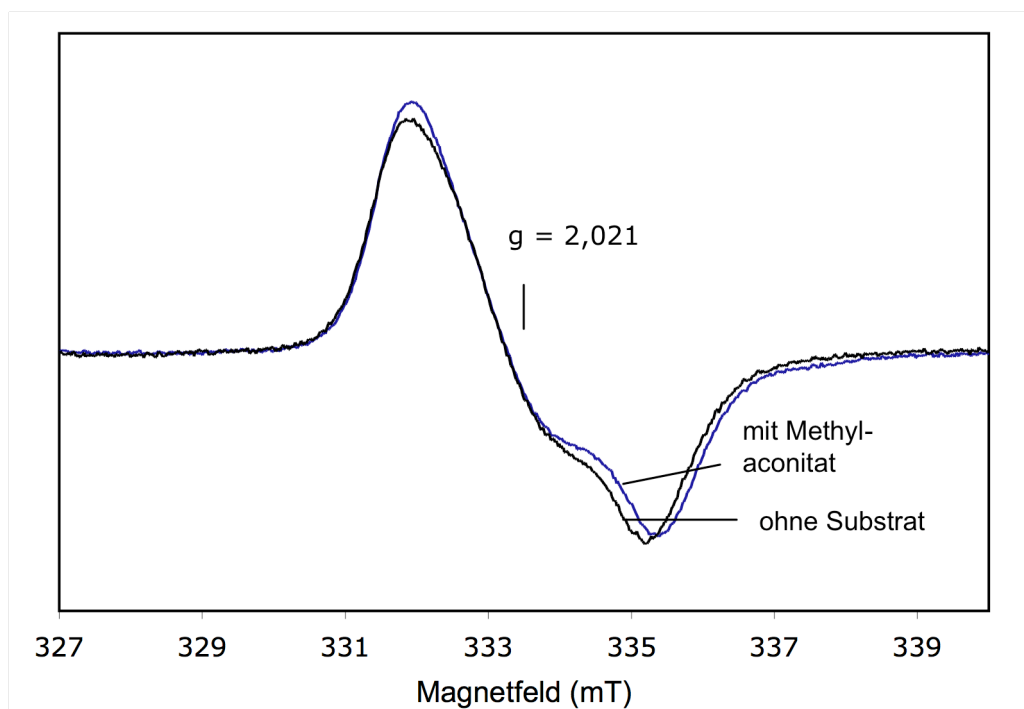


Abb. 41 X-Band EPR-Spektrum der angereicherten Aconitase mit und ohne Substratzugabe. AcoA 0,75 mg/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7,5; Endkonzentration Substrat 5 mM; T = 10 K; Mikrowellenleistung 0,016-0,253 mW; Modulationsamplitude = 0,6 mT; Mikrowellenfrequenz 9,635 GHz. Eine Verschiebung des Spektrums nach Substratzugabe wird sichtbar.

In Abb. 41 ist das EPR-Spektrum nach Anreicherung mit und ohne Substrat (Methyl-*cis*-aconitat) zu sehen. Die Spektren wurden normiert. Die Form des

Spektrums mit Substrat zeigt eine deutliche Verschiebung gegenüber dem Spektrum ohne Substrat. Die Veränderung ist jedoch nicht so stark, dass sich der g-Wert ändert. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Substrat in unmittelbarer Nähe des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Cluster bindet. Die genaue Lage der Substratbindung kann jedoch durch die EPR-Spektroskopie nicht bestimmt werden.

## 11. Mössbauer Spektroskopie

### 11.1 Messung der angereicherten AcoA

Nach der Anreicherung von AcoA befindet sich ein Teil der Cluster noch im [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zustand. Um alle vorhandenen Clusterzustände zu untersuchen, wurden die Zellen auf <sup>57</sup>Fe-haltigem Medium angezogen, AcoA angereichert (siehe Material und Methoden 5.8) und Mössbauer-Spektren angefertigt. Parallel dazu wurde der Gehalt an Eisen und säurelabilem Schwefel bestimmt. Ungeachtet der Vorteile der Mössbauer-Spektroskopie besteht einer ihrer Nachteile in der großen benötigten Probenmenge. Ideal sind 0,3-0,5 mM Cluster-gebundenes Eisen, wobei das Gesamtvolumen 500-700 µl betragen sollte. Als Maß für die s-Elektronendichte am Eisenkern wird der Isomer shift  $\delta$  betrachtet. Da die d-Elektronen teilweise mit den s-Elektronen überlappen liefert  $\delta$  auch Informationen über die Anzahl der d-Elektronen und den Oxidationszustand. Den Wert erhält man durch die Verschiebung des Zentrums eines Spektrums gegenüber einem Standard, z.B. <sup>57</sup>Fe in metallischer Form. (Gütlich *et al.*, 1978). Die Elektronen des Clusters können delokalisiert vorliegen, was auch als Spin-abhängige Delokalisation (spin-dependent delocalization) bezeichnet wird. Der [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Cluster enthält drei gleiche high-spin Fe<sup>3+</sup>-Atome. Der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster dagegen enthält zwei delokalisierte Fe<sup>2,5+</sup>-Fe<sup>2,5+</sup> Paare. Dies entspricht je einem Fe<sup>3+</sup>-Fe<sup>3+</sup> Dimer, welches sich ein zusätzliches delokalisiertes Elektron „teilt“.

Tab. 31: Aktivitäten nach Anreicherung für die Mössbauer Spektroskopie.

Aktivitäten	U/mg
Aconitase	1,33
Midh	0,76
Ratio Midh/Aconitase	1: 1,8

Die hier ermittelte Ratio zwischen Aconitase und Midh läßt darauf schließen, dass ein signifikanter Anteil des Proteins keinen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster mehr trägt.

Tab. 32: Fe-S-Konzentrationen von AcoA nach Anreicherung.

Fe	S	AcoA*	Ratio	Ratio	Fe/S
nmol/10 $\mu\text{l}$	nmol/10 $\mu\text{l}$	nmol/10 $\mu\text{l}$	Fe:AcoA	S:AcoA	
4,70	7,50	3,32	1,42	2,26	0,63

\*Abgeschätzt im SDS Gel 50 %ige Reinheit von AcoA

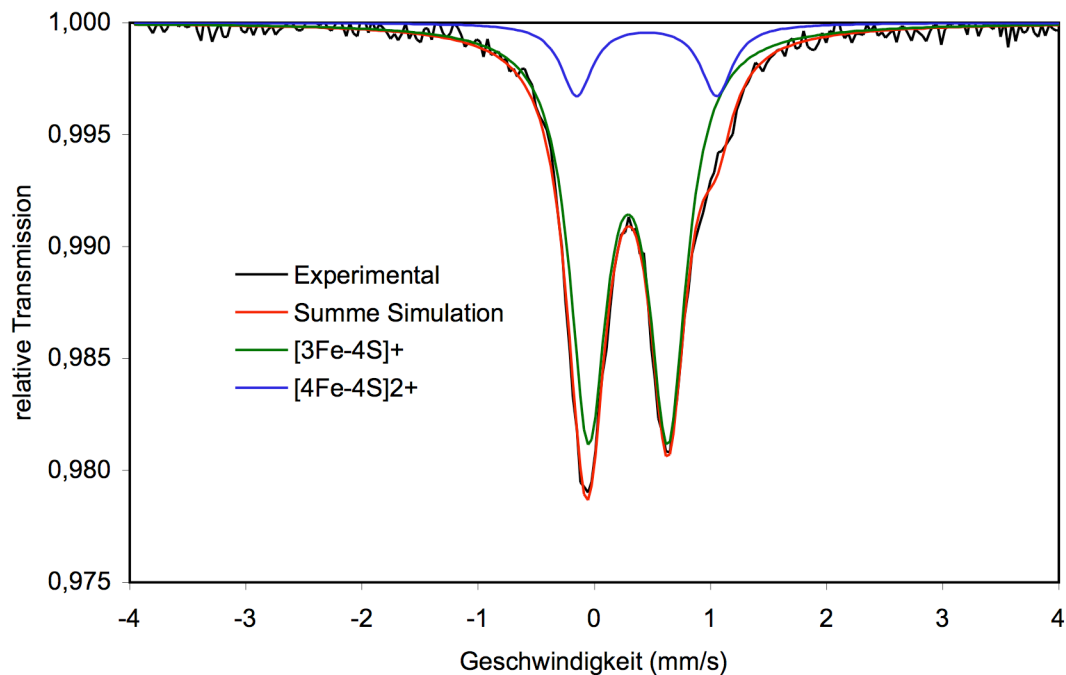


Abb. 42: Mössbauer-Absorptionsspektrum der angereicherten Aconitase AcoA im Nullfeld gemessen,  $T = 80 \text{ K}$ , Proteingehalt: 54,4 mg/ml, Fe-Gehalt 0,47 mM, S-Gehalt: 0,75 mM. Das Spektrum enthält  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster (87 %) und  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster (13 %).

Tab. 33: Parameter der Spektren aus Abb. 42.

Parameter	[3Fe-4S] <sup>+</sup> -	[4Fe-4S] <sup>2+</sup> -
	Anteil (mm/s)	Anteil (mm/s)
Isomer shift $\delta$	0,291	0,451
Quadrupole splitting $\Delta E_Q$	0,684	1,206
Linienbreite*	0,388	0,326
Relative Intensität	87 %	13 %

\*full width at half maximum

Die Abbildung 42 zeigt das gemessene Spektrum und die Simulationen der 2 Doublets. Bei gereinigter Aconitase aus Rinderherz konnten folgende Parameter für den oxidierten 3Fe-4S-Zustand gemessen werden:  $\Delta E_Q = 0,71$  mm/s,  $\delta = 0,27$  mm/s, Linienbreite: 0,3 mm/s bei 85 K. Diese Parameter sind charakteristisch für high-spin Fe<sup>3+</sup> in einer tetrahedrischen Umgebung. Für die reaktivierte Aconitase aus Rinderherz konnten folgende Parameter gemessen werden:  $\Delta E_Q = 1,30$  mm/s,  $\delta = 0,45$  mm/s (wobei die Aconitase zuvor mit <sup>56</sup>Fe reaktiviert worden war). Diese Werte sind charakteristisch für den [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster. (Kent *et al.*, 1982). Nach Aufspaltung des experimentellen und daraus simulierten Signals können in der vorliegenden Probe eindeutig Signale für [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Cluster und [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster extrapoliert werden. Das beweist, dass die eingesetzte Probe beide Clustertypen enthält, was auch die „gemischte Aktivitätsverteilung“ erklärt.



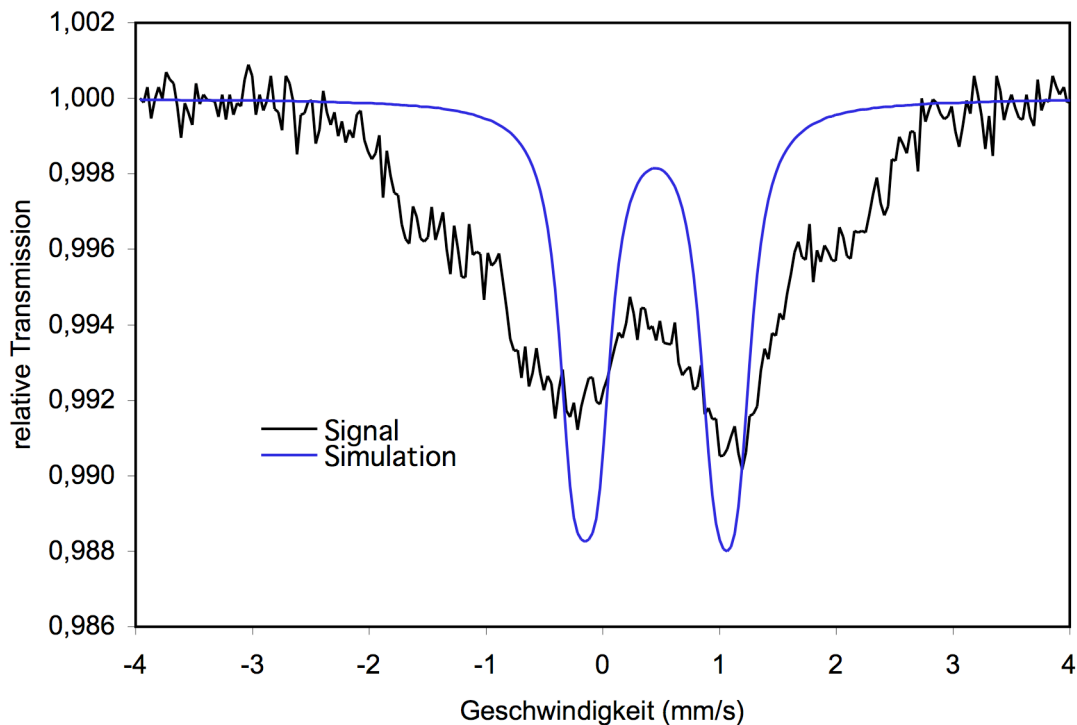


Abb. 43: Mössbauerabsorptionsspektrum der Aconitase aus Abb. 42 im Magnetfeld  $B = 1$  T senkrecht zur gemessenen Mössbauerstrahlung. Die Simulation enthält die Parameter für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster.  $T = 4,2$  K.

Durch Anlegung eines starken äußeren Magnetfeldes erfährt der  $^{57}\text{Fe}$ -Kern ein effektives Magnetfeld  $H_{\text{eff}}$ , das sich aus dem internen und dem externen Magnetfeld zusammensetzt. Die Simulation in Abb. 43 zeigt einen diamagnetischen Part. Der Rest des Spektrums ist magnetisch aufgespalten ( $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster). Durch Anlegen eines starken magnetischen Feldes lassen durch Änderung des Spektrums Hinweise darauf finden, ob es sich bei dem Cluster um die  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Form handelt. Internes und externes Feld können sich addieren oder subtrahieren, was zu einer Änderung der Magnetfeldaufspaltung führt (Kent *et al.*, 1982).

## 11.2 Messung der reaktivierten AcoA

Da sich nach der Anreicherung und Lagerung bei  $-80^\circ\text{C}$  der überwiegende Teil der Aconitase im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand befindet, sollte untersucht werden, ob durch Reaktivierung der Anteil an  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Clustern erhöht werden kann, was aus den vorherigen EPR-Studien vermutet wurde (Ergebnisse 10.2). Dazu wurde AcoA aus  $^{57}\text{Fe}$ -gewachsenen Zellen angereichert (siehe Material und Methoden 5.8) und anschließend reaktiviert und umgepuffert. Die Reaktivierung erfolgte

ebenfalls in Gegenwart von  $^{57}\text{Fe}$ . Die Aconitaseaktivität konnte durch die Reaktivierung erhöht werden, wobei die Midh-Aktivität stark herabgesetzt wurde. Das Verhältnis Midh/A betrug vor der Reaktivierung 1 zu 1,5 und nach Reaktivierung 1 zu 5,3.

Tab. 34: Aktivitäten vor und nach Reaktivierung.

Aktivitäten	vor Reaktivierung (U/mg)	nach Reaktivierung (U/mg)
Aconitase	2,07	2,67
Micdh	1,38	0,5
Ratio Micdh/Aconitase	1: 1,5	1: 5,3

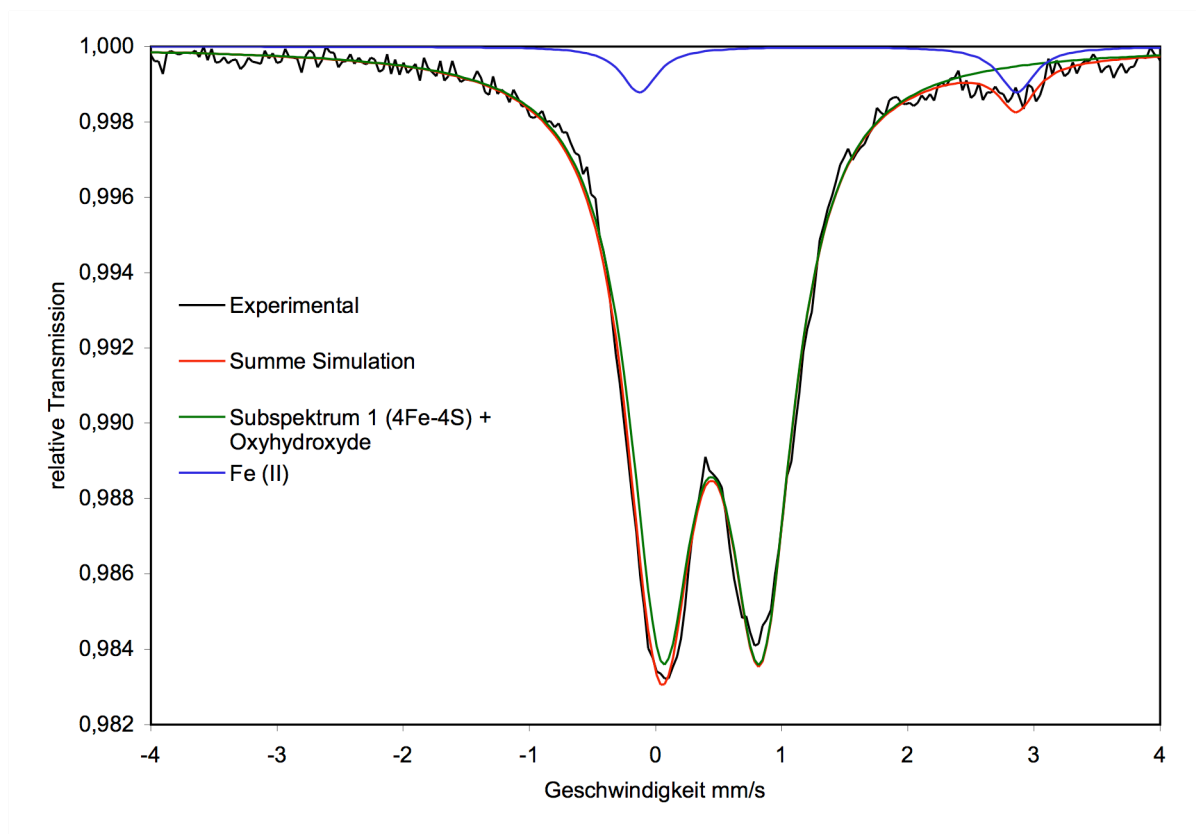


Abb. 44: Mössbauerabsorptionsspektrum reaktivierter AcoA im Nullfeld gemessen,  $T = 80\text{ K}$ , Proteingehalt: 46 mg/ml. Das Hauptsignal zeigt einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster und Oxyhydroxyde, die nach Reaktivierung nicht vollständig entfernt werden konnten.

Tab. 35: Parameter der Spektren aus Abb. 44.

Parameter	für Subspektrum 1 (mm/s)	für Fe(II) (mm/s)
Isomer shift $\delta$	0,443	1,369
Quadrupole splitting $\Delta E_Q$	0,781	2,991
Linienbreite*	0,635	0,344
Relative Intensität	96 %	4 %

\*full width at half maximum

Das Spektrum in Abb. 44 enthält ein kleineres Subspektrum, welches vom Fe(II) des Reaktivierungsmixes stammt und ein größeres Subspektrum. Dieses größere Subspektrum wurde zusätzlich im Magnetfeld analysiert und ergab einen prozentualen Anteil von 40 %  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  und 60 % Oxyhydroxide. Das Spektrum ist in Abb. 45 dargestellt.

Dieses Spektrum ist vergleichbar mit den Spektren der Aconitase aus Rinderherz. Diese Aconitase zeigte nach Reduzierung mit Dithionit und Zugabe von  $^{57}\text{Fe}$  ein Subspektrum mit einem prozentualen Anteil von 60 % mit  $\Delta E_Q = 3.2$  mm/s und  $\delta = 1,25$  mm/s für das freie Fe (II) aus dem Reaktivierungsmix. Ein zweites Doublet mit  $\Delta E_Q = 0,80$  mm/s und  $\delta = 0,45$  mm/s wurde als eine Seite des  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ -Clusters interpretiert, die das reaktive Eisen trägt (Kent *et al.*, 1982).

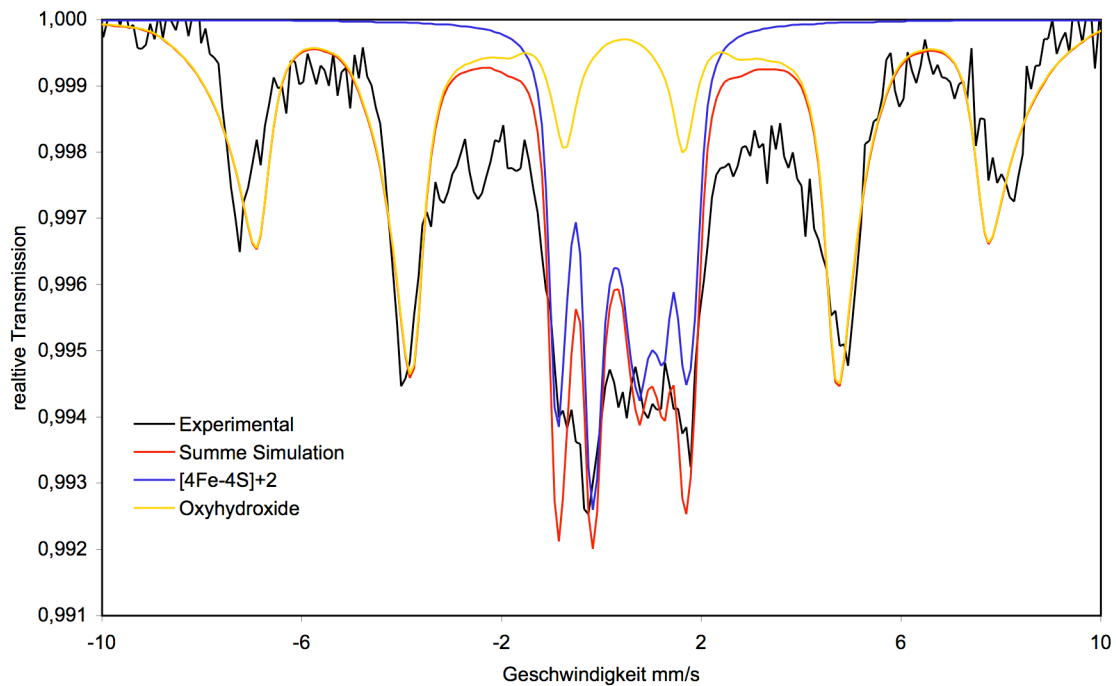


Abb. 45: Mössbauer-Absorptionsspektrum reaktivierter AcoA im Magnetfeld gemessen;  $B = 7 \text{ T}$  senkrecht zur gemessenen Mössbauerstrahlung,  $T = 4,2 \text{ K}$ . Das Spektrum zeigt die Aufspaltung der Signale für das restliche Eisen aus dem Reaktivierungsmix (Oxyhydroxide) und für den  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster im Magnetfeld.

Tab. 36: Parameter aus Abb. 45.

Parameter	für $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ (mm/s)	für Oxyhydroxide (mm/s)
Isomer shift $\delta$	0,440	0,440
Quadrupole splitting $\Delta E_Q$	0,780	0,084
Relative Intensität	40 %	60 %

Hieraus kann bestätigt werden, dass die Aconitase nahezu vollständig in einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand durch Reaktivierung überführt werden kann, wobei dieser Zustand annähernd keine Midh-Aktivität aufweist.

### 11.3 Messung nach Dialyse gegen EDTA

Durch Messungen der Aktivitäten konnte gezeigt werden, dass die Dialyse gegen EDTA eine Verschiebung zu Gunsten der Midh-Aktivität bewirkt (siehe Ergebnisse 8.3).

Tab. 37: Spezifische Aktivitäten vor und nach Dialyse gegen EDTA.

Aktivitäten	vor Dialyse (U/mg)	nach Dialyse (U/mg)
Aconitase	1,24	0,09
Midh	0,69	0,54
Ratio Midh: Aconitase	1:1,8	6:1

Proteingehalt nach Dialyse: 73,7 mg/ml.

Tab. 38: Fe-S-Konzentrationen nach Dialyse gegen EDTA.

Fe	S	AcoA*	Ratio	Ratio	Fe/S
nmol/10 $\mu$ l	nmol/10 $\mu$ l	nmol/10 $\mu$ l	Fe:AcoA	S:AcoA	
5,20	4,30	4,49	1,16:1	0,96:1	1,21:1

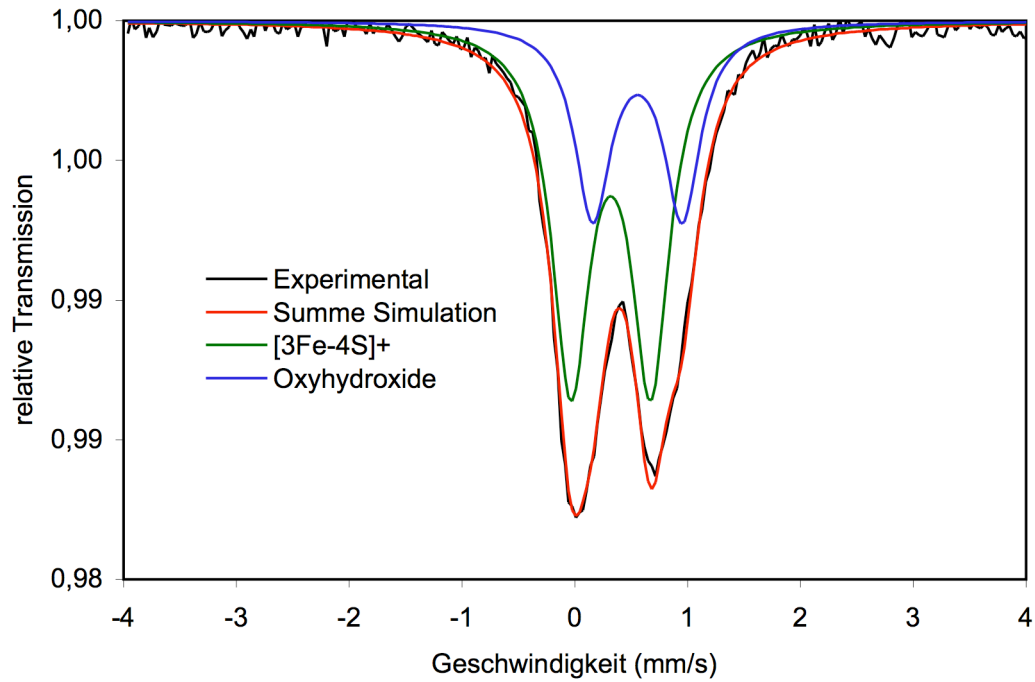


Abb. 46: Mössbauerabsorptionsspektrum von dialysierter AcoA im Nullfeld,  $T = 80 \text{ K}$ , Proteingehalt:  $74 \text{ mg/ml}$ , Fe-Gehalt:  $0,52 \text{ mM}$ , S-Gehalt:  $0,43 \text{ mM}$ . Das Spektrum zeigt, dass in der Probe keine  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster mehr nachzuweisen sind.

Tab. 39: Parameter des Spektrums aus Abb. 46.

Parameter	für $[3\text{Fe-4S}]^+$ (mm/s)	für Oxyhydroxide (mm/s)
Isomer shift $\delta$	0,318	0,556
Quadrupole splitting $\Delta E_Q$	0,707	0,792
Linienbreite*	0,405	0,388
Relative Intensität	66 %	34 %

\*full width at half maximum

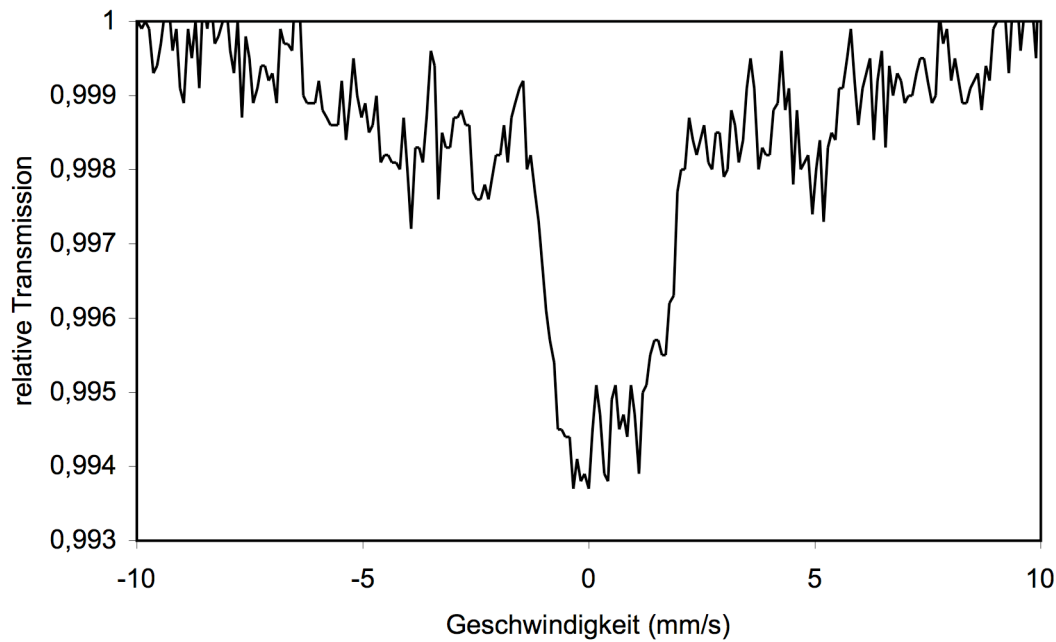


Abb. 47: Mössbauerabsorptionsspektrum von dialysierter AcoA im Magnetfeld,  $B = 4$  T senkrecht zur gemessenen Mössbauerstrahlung,  $T = 4,2$  K. Das Multiplet in der Mitte repräsentiert den  $[3\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster.

Die breite Aufspaltung im Magnetfeld stammt von Oxyhydroxiden, während das wenig aufgespaltene Multiplet in der Mitte von paramagnetischen oxidierten  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clustern stammt. Aus diesen Spektren wird ersichtlich, dass kein intakter  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster mehr vorliegt, was die äußerst geringe Akonitaseaktivität erklärt. Da trotzdem noch signifikante Mengen an Midh-Aktivität nachzuweisen sind, ist diese Aktivität vom  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster unabhängig. Dies bestätigt, dass sich das Enzym AcoA aus *A. nidulans* nicht verhält, wie man es aus bisherigen Untersuchungen an Aconitasen aus Säugern erwartet hätte. Die Aktivitäten spalten sich auf die unterschiedlichen Clustertypen auf.

---

## DISKUSSION

### 1. AcoA: ein Enzym mit zwei Aktivitäten

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl die Aconitase- als auch Midh-Aktivität von einem einzelnen Enzym katalysiert wird: AcoA. Interessanterweise ist die Aktivitätsverteilung von Aconitase und Midh jedoch von Modifikationen des Enzyms abhängig.

Wie M. Brock (Brock, 2001) in Vorversuchen zeigen konnte, ist die Aktivität der Midh sauerstoffempfindlich. Allerdings nimmt unter Einwirkung von Sauerstoff die Aconitase-Aktivität deutlich schneller ab als die Midh-Aktivität. Dieser Effekt kann durch Zugabe von Eisenchelatoren wie *o*-Phenanthrolin und EDTA noch verstärkt oder durch Reaktivierung wieder umgekehrt werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass in beiden Aktivitäten ein Eisen-Schwefel-Cluster involviert ist. Durch die hohe Sensitivität der Aconitase-Aktivität kann diese dem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster zugeschrieben werden, die Midh-Aktivität hingegen hängt von einem stabileren Zustand ab. Aoki et al. und Tabuchi et al. konnten zeigen, dass die Midh aus *Y. lipolytica* keine Aktivität mit 2-Methylcitrat, Citrat, *cis*-, *trans*-Aconitat oder Isocitrat zeigte und unempfindlich gegenüber dem Eisenchelator *o*-Phenanthrolin war. Das Gleichgewicht lag mit 92 % weit auf der Seite des Methylisocitrats. Die ebenfalls gereinigte Aconitase aus *Y. lipolytica* besaß jedoch ebenfalls Midh-Aktivität. Der  $K_m$ -Wert von 120  $\mu\text{M}$  für 2-Methylisocitrat lag deutlich über dem der Midh für dieses Substrat (18  $\mu\text{M}$ ) (Aoki et al., 1995) (Tabuchi et al., 1995). Daraus wurde gefolgert, dass ein spezielles Enzym mit niedrigem  $K_m$ -Wert existiert, welches die Dehydratisierung von Methylisocitrat katalysieren kann und unabhängig von der Aconitase ist. In anderen Parametern wiesen Midh und Aconitase allerdings hohe Ähnlichkeiten zueinander auf: die apparenten molekularen Massen unterschieden sich nur minimal (Aconitase 69 kDa, Midh 71 kDa) ebenso der isoelektrische Punkt  $pI$  (für Aconitase bei pH 4,2; für Midh bei pH 4,4) (Tabuchi et al., 1995). Diese Werte wurden über isoelektrische Fokussierung bestimmt und liegen innerhalb der Fehlertoleranz. Es wurde jedoch weder die Protein- noch die Gensequenz dieses neuen Enzyms bestimmt, wodurch die Möglichkeit besteht,



---

dass Aconitase und Mdh aus *Y. lipolytica* ebenfalls identische Proteine sind, die sich allerdings durch posttranslationale Modifikationen unterscheiden.

## 2. Die Aconitase

Die Aconitase besitzt nativ einen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster, der durch Oxidation sehr leicht in den stabileren  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster übergeht. Die Aconitase wurde zunächst auch als „high potential iron-sulfur protein“ (HiPIP) bezeichnet, da es ähnliche spektroskopische Eigenschaften mit dieser Gruppe von Proteinen aufweist. Ruzicka und Beinert konnten zeigen, dass mitochondriales HiPIP und mitochondriale Aconitase identisch sind (Ruzicka and Beinert, 1978).

Sowohl die mitochondriale Aconitase aus Rinderherz als auch aus Schweineherz zeigten maximale Aktivität im  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$  und keine Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand.

## 3. Der $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand der Aconitase

Obwohl der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand sehr leicht durch Oxidation erreicht wird, blieb seine physiologische Funktion, zumindest für die mitochondriale Aconitase, unklar. Es wurde vermutet, dass der Zustand lediglich als Intermediat beim Auf- und Abbau des Clusters entsteht, und in der Zelle nicht vorkommt (Beinert and Thomson, 1983).

Demgegenüber stehen einige Proteine, deren enzymatische Aktivitäten mit dem  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster zusammenhängen, z.B. das bakterielle Ferredoxin II aus *Desulfovibrio gigas* (Huynh *et al.*, 1980) (Moura *et al.*, 1984), der Fumarat-Reduktase-Komplex (Morningstar *et al.*, 1985), die Nitrat-Reduktase (Johnson *et al.*, 1985) und das Pyruvat-Formiat-Lyase-aktivierende Enzym, jeweils aus *E. coli* (Broderick *et al.*, 2000). Die Aconitase aus Schweineherz kann im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand die Substrate Citrat und *trans*-Aconitat binden, aber nicht umsetzen (Ramsay *et al.*, 1981).

Obwohl die mitochondriale Aconitase aus Säugern keine Aconitase-Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand zeigt, konnte jedoch eine weitere Aktivität bestimmt werden: die inaktive Aconitase aus Rinderherz, wahrscheinlich im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand, zeigte Oxalacetat-*keto-enol*-Tautomerase-Aktivität. Nach Reaktivierung konnten beide Aktivitäten, sowohl Aconitase- als auch Oxalacetat-*keto-enol*-Tautomerase-

Aktivität, nachgewiesen werden. Die Zugabe von N-Ethylmaleimid (Modifikation von Cysteinen) führte zum irreversiblen Verlust beider Aktivitäten (Belikova *et al.*, 1988) (Belikova Yu *et al.*, 1989).

Andere Dehydratasen besitzen keine Fe-S-haltigen Co-Faktoren, beispielsweise die Fumarase aus dem Citratzyklus, die die reversible Reaktion von Fumarat zu Malat katalysiert (Batelli and Stern, 1911). Hierbei wird das Wasser, wie bei der Aconitase, in *trans* addiert. Ein anderes Beispiel ist die Methylcitrat-Dehydratase aus *E. coli* (PrpD), allerdings wird hierbei das Wasser in *syn* abgespalten (Brock *et al.*, 2002).

Der lineare Cluster, der bei Inkubation der [3Fe-4S]<sup>+</sup>-haltigen Aconitase bei pH 9-10 oder durch Zugabe von 8 M Harnstoff entsteht und eine purpurrote Farbe besitzt (purple aconitase), scheint dagegen unter physiologischen Bedingungen nicht vorzukommen (Kennedy *et al.*, 1984).

#### 4. Zwei Cluster-Zustände = zwei Aktivitäten

Durch EPR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass gereinigte AcoA aus *A. nidulans* hauptsächlich ein Abbauprodukt des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Cluster enthielt und durch seine dominierende Ausprägung weitere Signale wie das des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Clusters überdeckte. Dieser „geschädigte“ Cluster scheint weder Aconitase- noch Midh-Aktivität zu besitzen. Daher wurden in den nachfolgenden spektroskopischen Untersuchungen angereicherte Proben verwendet, d.h. die Aconitase wurde nicht zur Homogenität gereinigt. Diese Proben zeigten noch überwiegend Aconitase-Aktivität. Über EPR-Spektroskopische Messungen konnte deutlich ein [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Signal detektiert werden, welches bei Zugabe des Substrats Methylaconit eine leichte Verschiebung des Spektrums ergab. Diese Veränderung wird wahrscheinlich durch die Substratbindung verursacht. Um den Unterschied zu vergrößern müsste man EPR-Spektren bei einer höheren Frequenz (Q-Band) anfertigen. Bisher waren Änderungen im EPR-Spektrum nur bei der reduzierten Form des aktiven Clusters ([4Fe-4S]<sup>+</sup>) der Aconitase aus Säugern nach Zugabe von Citrat beobachtet worden. Durch die Bindung an das 4. Eisen des Clusters ändern sich die Form des Spektrums und die g-Werte deutlich (Emptage *et al.*, 1983). Das ist hier nicht zu erwarten, da das

Methylaconitat wahrscheinlich nicht direkt am, sondern in der Nähe des Clusters bindet. Trotz der Ratio von Midh/Aconitase-Aktivität von 1:1,8 nach Anreicherung zeigten sich im Mössbauer-Spektrum eine Verteilung von 87 %  $[3\text{Fe-4S}]^+$  und 13 %  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ . D.h. obwohl nach Anreicherung bereits der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand überwiegt, ist die spezifische Aconitase-Aktivität des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustandes höher als die Midh-Aktivität des  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustandes. Nach Reaktivierung betrug das Verhältnis 40 %  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  zu 60 % Eisenhydroxide.  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster konnten nicht detektiert werden. Die Midh-Aktivität dieser Probe betrug 0,5 U/mg (Aconitase: 2,67 U/mg) und stammt vom  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand. Das zeigt, dass die Aconitase im  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand geringe Midh-Aktivität besitzt, wobei umgekehrt im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand nur Midh-Aktivität vorhanden ist. Das Verhältnis von Midh : Aconitase von 1 : 5,3 ist vergleichbar mit den Anfangswerten nach Aufschluss der Zellen (siehe Ergebnisse 6.2) nach Wachstum auf Acetat. Durch Dialyse gegen EDTA konnte das Verhältnis zu Gunsten des  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Clusters verschoben werden: es befanden sich 66 %  $[3\text{Fe-4S}]^+$  und 34 % Eisenhydroxyde in der Probe. Diese Probe zeigte kaum Aconitase-Aktivität.

## 5. Cluster-Zustand innerhalb der Zelle

Die Ergebnisse zeigen, dass AcoA unterschiedliche, mit dem Zustand des Clusters verbundene Aktivitäten entwickeln kann. Daher stellt sich die Frage, ob diese Zustände auch in der Zelle eine Rolle spielen. Prinzipiell sind Messungen eines sauerstoffempfindlichen Enzyms kritisch zu beurteilen, da bereits durch den Aufschluss unter Sauerstoffatmosphäre ein Teil der Cluster oxidiert vorliegen kann. Jedoch konnte im Rohextrakt von Propionat-gewachsenen Zellen immer ein niedrigeres Aconitase/Midh-Aktivitätsverhältnis gemessen werden, als in Acetat (siehe 1. Vergleichende Enzymaktivitäten, 7.3 Reaktivierung des Rohextraktes und 7.4 Anreicherung der AcoA aus dem überproduzierenden Stamm). Daher könnte der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster vermehrt in Zellen vorkommen, die auf Propionat gewachsen sind und auf eine funktionale Midh angewiesen sind. Eventuell kommt es im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand nicht zu Interferenzen mit den anderen Substraten der Aconitase, da diese nicht binden. In diesem

Zusammenhang ist interessant zu erwähnen, dass sich der Rohextrakt nicht reaktivieren ließ, vermutlich durch hemmende Substanzen im Zellextrakt.

Um die Frage zu klären, in welchem Zustand die Aconitase in der Zelle vorliegt, können auch ganze Zellen für die Mössbauer-Spektroskopie eingesetzt werden, was allerdings bisher nur in Bakterien untersucht wurde (Ringeling *et al.*, 1994) (Kadir *et al.*, 1991).

## 6. Bedeutung der Aktivitätstrennung für *A. nidulans*

Tierische Aconitasen zeigen nicht nur Aktivität als Enzym des Citratzyklus, indem sie Citrat über *cis*-Aconitat in Isocitrat umwandeln können, sondern besitzen zusätzlich Midh-Aktivität. Beide Aktivitäten sind jedoch fest mit einem funktionalen und vollständigen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster verbunden. Daher stellt sich die Frage, warum die Aktivitäten in *A. nidulans* getrennten Cluster-Zuständen zuzuordnen sind. Ein möglicher Grund hierfür ist, dass tierische Gewebe die Aktivität einer Midh nicht benötigen. Zwar fällt auch in diesen Organismen Propionyl-CoA an, welches z.B. beim Abbau einiger Aminosäuren entsteht, es wird aber über einen alternativen Stoffwechselweg abgebaut. Dieser alternative Abbauweg ist der Methymalonyl-CoA-Weg, wobei Propionyl-CoA direkt carboxyliert wird, das entstehende R-Methylmalonyl-CoA in S-Methylmalonyl-CoA isomerisiert wird und dann über ein Coenzym B12 abhängiges Enzym, die Methylmalonyl-CoA-Mutase in Succinyl-CoA umgewandelt wird. Methylcitrat entsteht hier nur über unspezifische Reaktionen der Citrat-Synthase. Bei einigen genetischen Defekten im Methylmalonyl-CoA-Weg werden hohe Konzentrationen an Propionyl-CoA angereichert, die dann über die Citrat-Synthase in Methylcitrat umgesetzt und über den Urin ausgeschieden werden. Der Nachweis von Methylcitrat über GC-MS-(Gaschromatographie-Massen-Spektrometrie)-Analysen ist ein häufig angewandtes diagnostisches Mittel, um Defekte im Methylmalonyl-CoA-Weg aufzudecken. (Kuhara *et al.*, 2002). Eine weitere Reaktion von Methylcitrat in Methyl-*cis*-aconitat ist jedoch nicht möglich, da durch eine sterische Behinderung der Methylgruppe des Methylcitrats im aktiven Zentrum der Aconitase eine Substratbindung nicht möglich ist und höchstwahrscheinlich keine Methylcitrat-Dehydratase existiert. Zudem besitzen

Citratsynthasen nicht die gleiche Spezifität für die Synthese von Methylcitrat aus Propionyl-CoA und Oxalacetat. Methylcitratsynthasen synthetisieren zu >99 % nur ein Isomer, das 2S-3S-Methylcitrat, wohingegen Citratsynthasen alle 4 möglichen Isomere bilden (van Rooyen *et al.*, 1994). In Organismen, die den Methylcitratzyklus als Abbauweg von Propionyl-CoA nutzen, ist für diese Dehydratisierung ein spezielles Enzym, die Methylcitrat-Dehydratase (bei *E. coli*: PrpD (Brock *et al.*, 2002)) verantwortlich.

Obwohl die Aconitase aus tierischen Geweben also in der Lage ist, Methyl-*cis*-aconitat in Methylisocitrat umzusetzen, wird diese Reaktion unter natürlichen Bedingungen nicht genutzt. Hierin liegt der grundsätzliche Unterschied zu der pilzlichen Aconitase. Beim Wachstum auf Propionat als einziger C-Quelle müssen Citrat- und Methylcitratzyklus gleichzeitig und im selben Kompartiment, den Mitochondrien, ablaufen. Durch die  $\alpha$ -Oxidation von Propionyl-CoA zu Pyruvat kommt es zu keinem Energiegewinn, da bei diesen Reaktionen keine Reduktionsäquivalente gewonnen werden. Daher ist der Energiestoffwechsel über den Citratzyklus essentiell. Da sowohl der Methylcitratzyklus als auch der Citratzyklus auf eine funktionale Aconitase angewiesen ist, erscheint es sinnvoll die Aktivitäten aufzuteilen. Auf diese Weise steht dem Methylcitratzyklus immer eine gewisse Anzahl von Aconitasemolekülen zur Verfügung, um eine Anhäufung von Methyl-*cis*-aconitat zu verhindern. Da in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, dass eine Anreicherung verschiedener Metabolite des Methylcitratzyklus toxische, bzw. wachstumshemmende Effekte hervorruft (Brock, 2005) (Brock and Buckel, 2004) (Zhang *et al.*, 2004), verhindert diese Strategie eine Anreicherung von unerwünschten Nebenprodukten. Die unterschiedlichen  $K_m$ -Werte der beiden Cluster-Zustände könnten einen weiteren Regulationsmechanismus beinhalten: eventuell ist der  $K_m$ -Wert für Methyl-*cis*-aconitat geringer für den [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Zustand als für den [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zustand.

## 7. Vergleich der pilzlichen Aconitasen zu den aus Säugern

In Säugern (*Bos taurus*) zeigte sowohl die cytosolische Aconitase aus der Leber (Schloss *et al.*, 1984) als auch die mitochondriale Aconitase aus dem Herzmuskel Midh-Aktivität (Lauble and Stout, 1995) (Beach *et al.*, 1977). Im Gleichgewicht

beträgt das Verhältnis von Methyl-*cis*-aconitat zu Methylisocitrat 43:57 bei pH 7,5 (Lauble and Stout, 1995). Dagegen liegt das Gleichgewicht für die „natürlichen“ Substrate auf der Seite des Citrats (Citrat 90,9%, *cis*-Aconitat 2,9% und Isocitrat 6,2% (Aconitase aus Schaf, bei pH 7,4 und 25°C) (Krebs, 1953). Bei der Midh aus *Y. lipolytica* lag dagegen das Gleichgewicht auf der Seite des Methylisocitrats. Da Methylisocitrat für den Stoffwechsel der Säuger kein physiologisches Substrat darstellt, scheint es nicht wichtig zu sein, dass sich das Gleichgewicht auf der Seite des Produkts befindet.

Die Aminosäuresequenz von AcoA aus *A. nidulans* stimmt zu 68% mit der Aconitase ACO2 aus Schweineherz überein (errechnet über SIM, ExPASy). Der Aufbau der Domänen von AcoA ähnelt stark dem der ACO2 aus dem Schwein (siehe Abb. 48). Am N-Terminus befindet sich die Domäne 1 (ACO2 Rest 1-202) gefolgt von Domäne 2 (Rest 203-320) und Domäne 3 (Rest 321-513). Domäne 3 und 4 sind über einen relativ langen Linker (514-537) miteinander verbunden. Die ersten 3 Domänen sind kompakt angeordnet und tragen den Eisen-Schwefel-Cluster. Die vierte Domäne ist über den Linker mit den ersten drei verbunden und bildet so das reaktive Zentrum. (Robbins and Stout, 1989). Dieser Aufbau entspricht dem der Stress-induzierten Aconitase AcnA aus *E. coli*. Der Aufbau der Haupt-Aconitase AcnB aus *E. coli* unterscheidet sich dagegen signifikant: Am N-Terminus befindet sich Domäne 4, die über einen relativ kurzen Linker mit Domäne 1 verbunden ist. Direkt an Domäne 1 folgen die Domänen 2 und 3. Das aktive Zentrum befindet sich ebenfalls zwischen der Domäne 4 und den Domänen 1-3 (Gruer *et al.*, 1997) (Williams *et al.*, 2002).

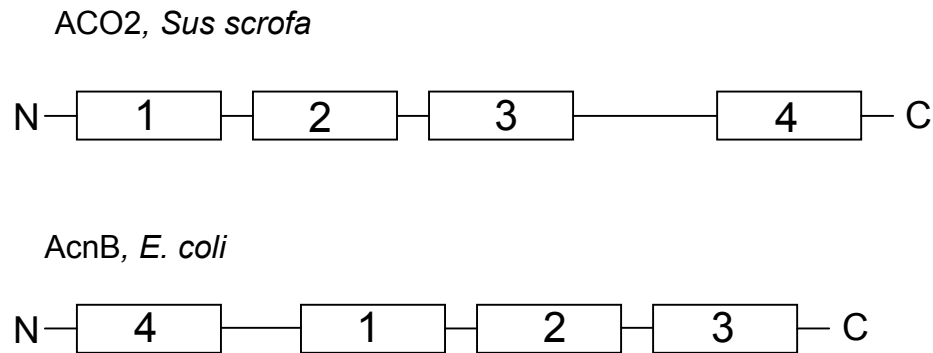


Abb. 48: Domänenaufbau der Aconitasen aus *Sus scrofa* und *E. coli*.

Durch kristallographische Studien und Mutagenisierungsexperimente konnte die Rolle einiger wichtiger Aminosäurereste aufgeklärt werden: die 3 Cysteine, die die Liganden des Clusters bilden, befinden sich bei der Schweineherzaconitase an den Positionen 385, 448 und 451 (oder 358, 421 und 424, wenn man das Leaderpeptid nicht mitzählt). Asp-192 (Asp-165) bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Substrat und dem Wasser, welches an Fe<sub>a</sub> koordiniert ist. His-128 (His-101) katalysiert den Transfer der Hydroxylgruppe und wird durch Asp-127 (Asp-100) in der protonierten Form stabilisiert. Ser-669 (Ser-642) bildet die Base, die das Proton abstrahiert. (Zheng *et al.*, 1992).

Zwischen den Aconitasen aus der Gruppe der Pilze einerseits und der Gruppe der Säuger andererseits besteht ein Unterschied von rund 70 Aminosäuren (siehe Abb. 49). Allerdings stimmen in beiden Gruppen alle katalytisch wichtigen Aminosäuren überein. Nach Entstehung des [3Fe-4S]<sup>+</sup>-Clusters befinden sich bei der Aconitase aus Schweineherz folgende Reste in einem Abstand von 3,5 Å um den Cluster: Ile-172 (Ile-145), His-174 (His-147), His-194 (167), Ser-384 (Ser-357), Cys-385 (Cys-358), Asn-473 (Asn-446) und Ile-452 (Ile-425) (Robbins and Stout, 1989). Ile-452 (Ile-425) spielt ebenfalls eine Rolle bei der Bindung von Methylisocitrat: es entsteht eine van-der-Waals-Bindung zwischen diesem Rest und der Methylgruppe des Substrates. Die Bindung von Methylcitrat ist hingegen sterisch behindert, da die Methylgruppe weniger als 2 Å von der Carboxylgruppe des Asp-192 (Asp-165) entfernt wäre. Daher ist eine Reaktion der Aconitase mit Methylcitrat als Substrat für pilzliche und Säugeraconitasen ausgeschlossen. Obwohl sich Säuger- und Pilz-Aconitasen stark ähneln, ist es in

---

diesem Stadium der Untersuchungen schwierig zu bestimmen, was den Unterschied zwischen pilzlichen Aconitasen (mit Midh-Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand) und Aconitasen aus Säugern (ohne Midh-Aktivität im  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand) ausmacht. Dies muss durch gezielte und vergleichende Mutationsanalysen beider Aconitasetypen weiter untersucht werden.



```

A. terreus -----MGALAPKSRLLLGTRGLATVADSPLDKKVENTNHEKGNYINYYKKMSENLDIV 52
A. fumigatus MISTRLARAGALAPKSRLFGLTRAFATVGDSPDKKVEMANTEKGNYINYYKKMSENLDIV 60
A. nidulans -----MATVAD--LDKKVEMCNLEKGNYINYYKKMSENLDIV 34
Y. lipolytica -----MNNWEANNFLNFKKHTENVQIV 22
S. scrofa -----MAPYSLLVTRLQKALGVRQYHVASVLCQRAKVMASHFEPHEYIRYDLEKNIDIV 55
B. taurus -----MAPYSLLVSRQLQKALGARQYHVASVLCQRAKVMASHFEPNEYIRYDLEKNINIV 55
H. sapiens -----MAPYSLLVTRLQKALGVRQYHVASVLCQRAKVMASHFEPNEYIHYDLEKNINIV 55

```

\* \* \* \* \*

Domäne 1

```

A. terreus RRRLSRPLTYAEKVLVYSHLDDPHGQDIERGVSYLKLRLPDRVACQDATAQMAILQFMSAGM 112
A. fumigatus RRRLQRPLTYAEKVLVYSHLDDPHGQEI ERGKSYLKLRLPDRVACQDATAQMAILQFMSAGM 120
A. nidulans RRRLTRPLTYAEKILVYSHLDDPQNQDI ERGKSYLKLRLPDRVACQDATAQMAILQFMSAGM 94
Y. lipolytica KERLNRPLTYAXKILYGHLDKPHEQEI VVGQSYLKLRLPDRAACQDATAQMAILQFMSAGI 82
S. scrofa RKRLNRPLTLSEKIVYGHLDLDPANQEI ERGKTYLRLRPDRVAMQDATAQMAMLQFISSGL 115
B. taurus RKRLNRPLTLSEKIVYGHLDLDPANQEI ERGKTYLRLRPDRVAMRDATAQMAMLQFISSGL 115
H. sapiens RKRLNRPLTLSEKIVYGHLDLDPASQEI ERGKSYLRLRPDRVAMQDATAQMAMLQFISSGL 115

```

\*\* \*

```

A. terreus PSVATPTTVHCDHLIEAQVGGKDLARANEINKEVYDFLATATAKYNIGFWKPGSGI IHQ 172
A. fumigatus PSVATPTTVHCDHLIEAQVGGKDLARANEINKEVYDFLASATAKYNIGFWKPGSGI IHQ 180
A. nidulans PSVATPTTVHCDHLIEAQLGGKDLARANEINKEVYDFLASSTAKYNIGFWKPGSGI IHQ 154
Y. lipolytica PTVQTPTTVHCDHLIQAQVGGQDLARADINKEVYNFLGTASAKYDGFWKAGSGI IHQ 142
S. scrofa PKVAVPSTIHC DHLIEAQLGGKDLRRAKDINQEVYNFLATAGAKYGVGFWFRPGSGI IHQ 175
B. taurus PKVAVPSTIHC DHLIEAQLGGKDLRRAKDINQEVYNFLATAGAKYGVGFWFRPGSGI IHQ 175
H. sapiens SKVAVPSTIHC DHLIEAQVGGKDLRRAKDINQEVYNFLATAGAKYGVGFWKPGSGI IHQ 175

```

\* \*

```

A. terreus IVLENYAFPGGLMIGTDSHTPNAGGLAMAAGI VGGADAVDMAGLPWELKAPKVI GVKLT 232
A. fumigatus IVLENYAFPGGLMIGTDSHTPNAGGLAMAAGI VGGADAVDMAGLPWELKAPKVI GVKLT 240
A. nidulans IILENYAFPGGLMIGTDSHTPNAGGLAIAAGI VGGADAVDMAGLPWELKAPKVI GVRLT 214
Y. lipolytica IILENYAFPGALLIGSDSHTPNAGGLMLAAGI VGGADVDMAGLPWELKAPKVI GVKLT 202
S. scrofa IILENYAYPGVLLIGTDSHTPNAGGLGGICIG VGGADAVDMAGIPWELKCPKVI GVKLT 235
B. taurus IILENYAYPGVLLIGTDSHTPNAGGLGGICIG VGGADAVDMAGIPWELKCPKVI GVKLT 235
H. sapiens IILENYAYPGVLLIGTDSHTPNAGGLGGICIG VGGADAVDMAGIPWELKCPKVI GVKLT 235

```

Domäne 2

\* \*

```

A. terreus GEMSGWTTPKDII LKVGALLTVKGGTGAI IEYHGPGVNSL SCTGMGTICNMGAIEIGATTS 292
A. fumigatus GEMSGWTTPKDVILKVGALLTVKGGTGAI IEYHGPGVTSL SCTGMGTICNMGAIEIGATTS 300
A. nidulans GEMSGWTAPKDI LKVGALLTVKGGTGAI IEYHGPGVNSL SATGMATICNMGAIEIGATTS 274
Y. lipolytica GKLSGWTS PKDII LKVGAILTVKGGTGAI VEYFGDGVNLS SCTGMGTVCNMGAIEIGATTS 262
S. scrofa GSLSGWTS PKDVILKVGAILTVKGGTGAI VEYHGPGVDS ISCTGMATICNMGAIEIGATTS 295
B. taurus GSLSGWTS PKDVILKVGAILTVKGGTGAI VEYHGPGVDS ISCTGMATICNMGAIEIGATTS 295
H. sapiens GSLSGWSSPKDVILKVGAILTVKGGTGAI VEYHGPGVDS ISCTGMATICNMGAIEIGATTS 295

```

\* \*

```

A. terreus MFPPFNDRMYDYLKATKRQHIGEFARSYAKELREDEGAEYDQLIEINLSELEPHINGPFTP 352
A. fumigatus MFPPFNDRMYDYLKATKRQHIGDFAREYAKELREDEGAEYDQLIEINLSELEPHINGPFTP 360
A. nidulans LFPFNDRMYDYLKATKRQIGDFARSYAKDLREDEGAEYDQLIEINLSELEPHINGPFTP 334
Y. lipolytica TFPPFNERMADYLNATGRKEIADFARLYNHFLSADEGCEYDQLIEIDLNTLEPYVNGPFTP 322
S. scrofa VFPPYNHRMKKYLSKTGRADIANLADEFKDHLPDPGCHYDQVIEINLSELKPHINGPFTP 355
B. taurus VFPPYNHRMKKYLSKTGRADIANLADEFKDHLPDPGCHYDQVIEINLSELKPHINGPFTP 355
H. sapiens VFPPYNHRMKKYLSKTGREDIANLADEFKDHLPDPGCHYDQVIEINLSELKPHINGPFTP 355

```

\* \*

Domäne 3

```

A. terreus DLATPISKFKEAVDANGWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMSRAAS IARDALNHGVKSKSLFT 412
A. fumigatus DLATPISKFKEAVETNKWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMSRAAS IARDALNHGLKAKSLFT 420
A. nidulans DLATPISQFKEAVKANGWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMSRAAS IAQDALDHGLKAKSIFT 394
Y. lipolytica DLATPISKLDVAVENGWPEELKVGLIGSCTNSSYEDMERSAS IAKDAMAHGLKSKSIYT 382
S. scrofa DLAHPVAEVGSVAEKEGWPLDIRVGLIGSCTNSSYEDMGRSAAVAKQALAHGLKCKSQFT 415
B. taurus DLAHPVAEVGSVAEKEGWPLDIRVGLIGSCTNSSYEDMGRSAAVAKQALAHGLKCKSQFT 415
H. sapiens DLAHPVAEVGVKVAEKEGWPLDIRVGLIGSCTNSSYEDMGRSAAVAKQALAHGLKCKSQFT 415

```

\* \*

<i>A. terreus</i>	VTPGSEQIRATIERDGLQTLLEFFGGVILANACGPCIQQWDRKDVKKGEPNSIISSYNRRN	472
<i>A. fumigatus</i>	VTPGSEQIRATIERDGLQTLLEFFGGVILANACGPCIQQWDRRDKVKKGEPNSIISSYNRRN	480
<i>A. nidulans</i>	VTPGSEQIRATIERDGLKTLLEFFGGVILANACGPCIQQWDRKDVKKGTPNSIVSSYNRRN	454
<i>Y. lipolytica</i>	VTPGSEQIRATIERDGLQTLFLDFGGVILANACGPCIQQWDRRDIKKGEKNTIVSSYNRRN	442
<i>S. scrofa</i>	ITPGSEQIRATIERDGYAQLRDVGGVILANACGPCIQQWDRKDIKKGEKNTIVTSYNRRN	475
<i>B. taurus</i>	ITPGSEQIRATIERDGYAQLIRDVGGVILANACGPCIQQWDRKDIKKGEKNTIVTSYNRRN	475
<i>H. sapiens</i>	ITPGSEQIRATIERDGYAQLIRDVGGVILANACGPCIQQWDRKDIKKGEKNTIVTSYNRRN	475
	***** ** ***** * ** * *	
<i>A. terreus</i>	FTGRNDANPATAHFAVSPDLVVAMCVAGTLKFNPLTDTVKDKDGKEFKLAPPSGDGLPSK	532
<i>A. fumigatus</i>	FTGRNDANPATAHFAVSPDLVVAMTIAGTLKFNPLTDKLDKDGNEFLLQPPTGEGLPK	540
<i>A. nidulans</i>	FTGRNDANPATAHFAVTSPLVVALSIAGTLNFNPLTDTLKDKGKEFKLKAPTGDGLPSR	514
<i>Y. lipolytica</i>	FTGRNDSNPATAHFAVTSPLVTAFAIAGDLRFNPLTDSLKDSEGKEFKLKEPTGKGLPDR	502
<i>S. scrofa</i>	FTGRNDANPETHAFVTSPEIVTALAIAGTLKFNPETDFTLGKDGKFKLEAPDADELPR	535
<i>B. taurus</i>	FTGRNDANPETHAFVTSPEIVTALAIAGTLKFNPETDFTLGKDGKFKLEAPDADELPR	535
<i>H. sapiens</i>	FTGRNDANPETHAFVTSPEIVTALAIAGTLKFNPETDYLGTGDKKFRLEAPDADELPKG	535
	***** * * ***** *	
<i>A. terreus</i>	GYDAGRNTYQAPPQDRASINVAVSPTSRLQQLLAGFEAWDGKDANGIPIILIKCQGKT	592
<i>A. fumigatus</i>	GYDPGRDITYQAPPADRSSVNVAVSPTSRLQQLLAGFEPWDGKDANGIPIILIKCQGKT	600
<i>A. nidulans</i>	GYDPGRDITYQAPPTRSSVDVAVSPSSRLQQLLAGFQPWDGKDANGIPIILIKCQGKT	574
<i>Y. lipolytica</i>	GYDPGMDITYQAPPADRSAVEVDVSPTSRLQILKPFKPWDGKDIDMPLIKSLGKT	562
<i>S. scrofa</i>	EFDPGQDITYQHPPKSSGQRVDVSPTSRLQLELPEFDKWDGKDLLEDLQILIKVKGKCT	595
<i>B. taurus</i>	EFDPGQDITYQHPPKSSGQVVDVSPTSRLQLELPEFDKWDGKDLLEDLQILIKVKGKCT	595
<i>H. sapiens</i>	EFDPGQDITYQHPPKSSGQHVDVSPTSRLQLELPEFDKWDGKDLLEDLQILIKVKGKCT	595
	* *	
	Linker Domäne 4	
<i>A. terreus</i>	HISMAGPWLKRYRGHLDNISNNMLIGAVNAENGEANKVKNKFTGEYGAVPATARDYKARGV	652
<i>A. fumigatus</i>	HISMAGPWLKRYRGHLDNISNNMLIGAVNAENKANSVKNKFTGEYDAVPATARDYKARGV	660
<i>A. nidulans</i>	HISMAGPWLKRYRGHLDNISNNMLIGAVNAENGEANKIKNVFTGEYGAVPATARDYKARGV	634
<i>Y. lipolytica</i>	HISQAGPWLKRYRGHLDNISNNMIGAINAENEEANNVRNQITGEWGGVPEAIAYRDNGI	622
<i>S. scrofa</i>	HISAAGPWLKFRGHLDNISNNLLIGAINIENRKANSVRNAVTOEFGVPVPTARYYKQHG	655
<i>B. taurus</i>	HISAAGPWLKFRGHLDNISNNLLIGAINVENGKANSVRNAVTOEFGVPVPTARYYKKHGI	655
<i>H. sapiens</i>	HISAAGPWLKFRGHLDNISNNLLIGAINIENKANSVRNAVTOEFGVPVPTARYYKKHGI	655
	*** ** *	
<i>A. terreus</i>	KWVIGDWNYGEGSSREHAALEPRHLGGLAIITRSFARIHETNLKKQGMPLPTFADPADY	712
<i>A. fumigatus</i>	KWVIGDWNYGEGSSREHAALEPRHLGGLAIITRSFARIHETNLKKQGMPLPTFADPADY	720
<i>A. nidulans</i>	KWVIGDWNYGEGSSREHAALEPRHLGGLAIITRSFARIHETNLKKQGMPLPTFSDPADY	694
<i>Y. lipolytica</i>	RWVVVGGDNFGEHAALEPRFLGGFAITKPFARIHETNLKKQGLPLNLFVNGADY	682
<i>S. scrofa</i>	RWVIGDENYGEHAALEPRHLGGRAIITKSFARIHETNLKKQGLPLPTFADPADY	715
<i>B. taurus</i>	RWVIGDENYGEHAALEPRHLGGRAIITKSFARIHETNLKKQGLPLPTFADPADY	715
<i>H. sapiens</i>	RWVIGDENYGEHAALEPRHLGGRAIITKSFARIHETNLKKQGLPLPTFADPADY	715
	*** *	
<i>A. terreus</i>	DKIQPEDTVDLL-CTELVGGKPMPLRVHPKNGST-FDVKLNHTFNESQIEWFKDGSALNT	770
<i>A. fumigatus</i>	DKINPEDTVDLL-CTQLEVGKPMPLRVHPKDGSAFFDISLNHTFNESQIEWFKDGSALNT	779
<i>A. nidulans</i>	DRIPPDATVDLL-CTELAVDKPMPLRVHPKDGAS-FDVKLSHTFNESQIEWFKDGSALNT	752
<i>Y. lipolytica</i>	DKIQPSDKISILGLKDLAPGKNVTIEVTPKDGAK-WTTEVSHTYNSEQLEWFKYGSALNK	741
<i>S. scrofa</i>	NKIHPVDKLTIQGLKDFAPGKPLKCI IKHPNGTQ-ETILLNHTFNETQIEWFRAGSALNR	774
<i>B. taurus</i>	NKIHPVDKLTIKGLKDFAPGKPLTCI IKHPNGTQ-ETILLNHTFNETQIEWFRAGSALNR	774
<i>H. sapiens</i>	NKIHPVDKLTIQGLKDFTPGKPLKCI IKHPNGTQ-ETILLNHTFNETQIEWFRAGSALNR	774
	* *	
<i>A. terreus</i>	MARKAASN 778	
<i>A. fumigatus</i>	MARKSGAK 787	
<i>A. nidulans</i>	MARKSGN- 759	
<i>Y. lipolytica</i>	MAASKK-- 747	
<i>S. scrofa</i>	MKELQQK- 781	
<i>B. taurus</i>	MKELQK-- 780	
<i>H. sapiens</i>	MKELQ--- 779	
	*	

Abb. 49 : Alignment pilzlicher Aconitasen mit mitochondrialen Aconitasen aus Säugern: *Aspergillus terreus* Aco AF093142; *Aspergillus fumigatus* Aconitase XM\_746078; *A. nidulans*

*AcoA* AF515630; *Yarrowia lipolytica* ACO1 AY584249; *Sus scrofa* ACO2 NM\_213954; *Bos taurus* ACO2 BC102642; *Homo sapiens* ACO2 CR456365;

\*: Übereinstimmende Reste. Gelb: Liganden des Clusters, Rot: Reste, die in Kristall-Struktur-Analysen in der Nähe zu gebundenem Isocitrat gefunden wurden. Pink: Bindung der Methylgruppe bei Katalyse von Methylisocitrat. Grau: Domänenstruktur der Säugeraconitasen. Einzelne graue Reste: Aminosäuren, die sich in pilzlichen Aconitasen von denen aus Säugern unterscheiden. Die Aconitase aus *Sus scrofa* enthält ein Leaderpeptid aus 27 Aminosäuren.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

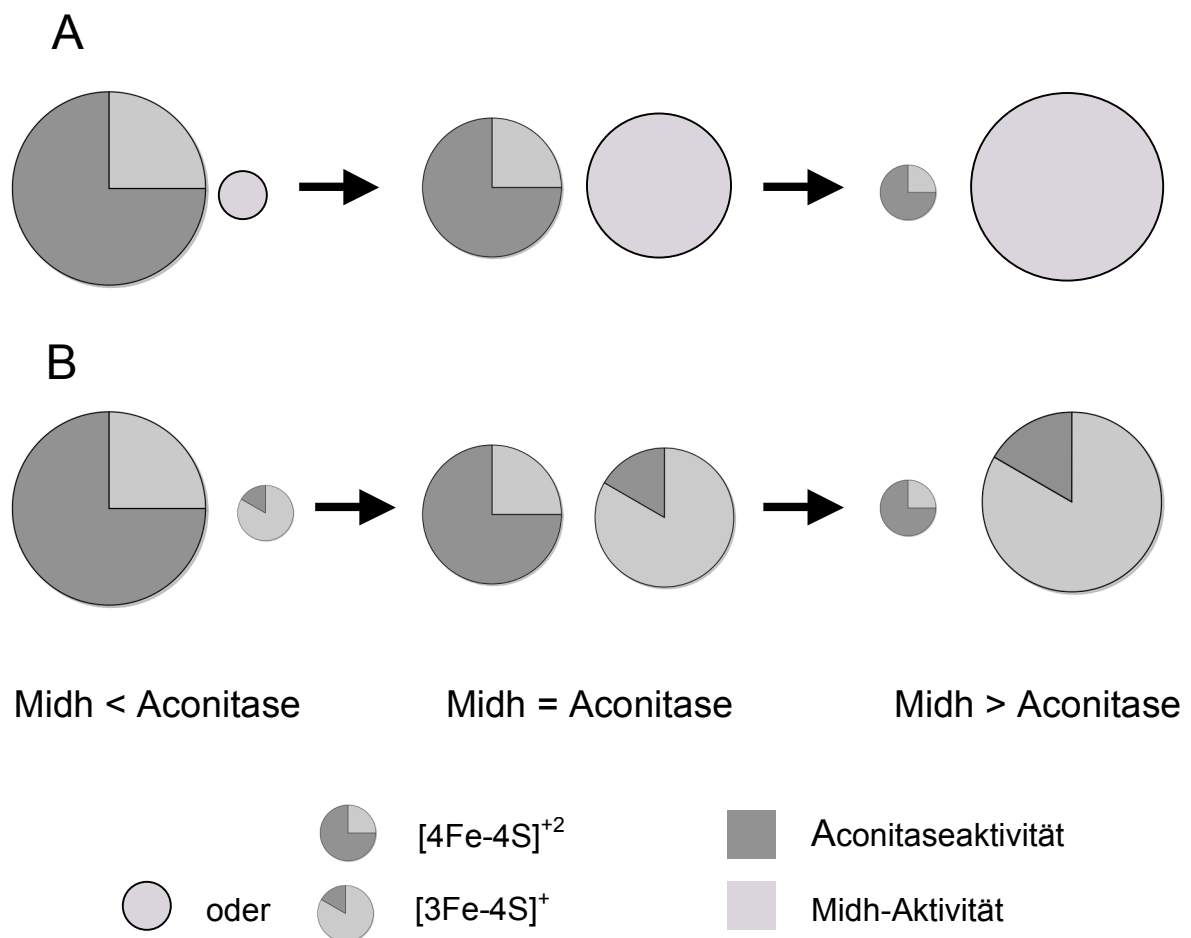


Abb. 50: Entwicklung der Aktivitäten der Aconitase AcoA während einer Reinigung. Zunächst überwiegt der  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zustand und die damit verbundene Aconitase-Aktivität. Im Verlauf der Reinigung entsteht der  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Zustand und die Midh-Aktivität steigt. A: Hierbei enthält der  $[4\text{Fe-4S}]^{+2}$ -Cluster eine geringe Midh-Aktivität. Der  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster enthält nur Midh-Aktivität. B: Hierbei enthält der  $[3\text{Fe-4S}]^{+}$ -Cluster ebenfalls geringe Aconitase-Aktivität. Das Vorkommen von B ist nicht wahrscheinlich.

Aufgrund der gezeigten Ergebnisse lässt sich ein Modell entwerfen, wonach die Aconitase-Aktivität von AcoA aus *A. nidulans* vom  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Cluster abhängig ist, während der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster hauptsächlich Midh-Aktivität aufweist. Andererseits könnte der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Cluster auch eine sehr geringe Aconitase-Aktivität besitzen. Die Aconitase scheint ein vielfältiges Enzym zu sein, das neben der Aktivität im Citrat- und Glyoxylatzyklus die Midh-Reaktion im Propionatstoffwechsel katalysiert und als Eisen-regulatorischer Faktor fungiert. In einer vor kurzem veröffentlichten Publikation wird eine mögliche Funktion der Aconitase im  $\alpha$ -Aminoadipat-Weg der Lysin-Biosynthese in Pilzen und Bakterien diskutiert. Jia et al. konnten zeigen, dass die Aconitase aus Schweineherz die reversible Reaktion zwischen (R)-Homocitrat und *cis*-Homoaconitat katalysiert, während die Homoaconitase aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* die reversible Reaktion zwischen *cis*-Homoaconitat und (2*R*,3*S*)-Homoisocitrat katalysiert. Die Homoaconitase aus diesem Organismus war nicht in der Lage Homocitrat als Substrat umzusetzen (Jia et al., 2006). Daher könnte die Aconitase sogar in vier verschiedenen Stoffwechselwegen eine essentielle Rolle spielen: dem Citratzyklus, dem Glyoxylatzyklus, dem Methylcitratzyklus, und dem  $\alpha$ -Aminoadipat-Weg. Ob letzteres jedoch auch für die pilzliche Aconitase zutrifft, muß in weiteren Studien gezeigt werden.

Als weiterführende Versuche sollen die unterschiedlichen  $K_m$ -Werte in verschiedenen Oxidationszuständen der Aconitase bestimmt und Inhibitorstudien mit Tricarallylat und den Nitroanaloga von Citrat und Isocitrat durchgeführt werden. Tricarallylat (1,2,3-Propantricarbonsäure) ist besonders interessant, da es ein Analogon zu Citrat darstellt, aber aufgrund der fehlenden OH-Gruppe nicht an  $\text{Fe}_a$  bindet (Kent et al., 1985). Des Weiteren soll versucht werden, die Aminosäuren zu identifizieren, die für die MidH-Aktivität im  $[3\text{Fe-4Fe}]^+$ -Zustand verantwortlich sind.

Durch heterologe Überexpression von AcoA in *E. coli*, zusammen mit einem Chaperon wie GroESL oder über ein pilzliches Expressionssystem, wie das von *Pichia pastoris*, sollen größere Proteinmengen mit einem intakten Fe-S-Cluster erhalten werden. Außerdem soll untersucht werden, ob es sich bei der Midh aus

*Y. lipolytica* tatsächlich um ein eigenständiges Protein handelt oder um die oxidativ „geschädigte“ Aconitase.

Aufgrund der Ergebnisse, die man durch die gut untersuchte Aconitase aus Säugern erhalten hatte, wurde vermutet, dass der  $[3\text{Fe-4S}]^+$ -Zustand keine Aktivität aufweist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings, dass dies zumindest für die Aconitase aus *A. nidulans* nicht zutrifft.

---

## LITERATUR

- Aoki, H., and Tabuchi, T. (1981) Purification and properties of 2-methylcitrate dehydratase from *Yarrowia lipolytica*. *Agric Biol Chem* **45**: 2831-2837.
- Aoki, H., Uchiyama, H., Umetsu, H., and Tabuchi, T. (1995) Isolation of 2-methylisocitrate dehydratase, a new enzyme serving in the methylcitrate acid cycle for propionate metabolism, from *Yarrowia lipolytica*. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 1825-1828.
- Bachellier, S., Saurin, W., Perrin, D., Hofnung, M., and Gilson, E. (1994) Structural and functional diversity among bacterial interspersed mosaic elements (BIMEs). *Mol Microbiol* **12**: 61-70.
- Batelli, F., and Stern, L. (1911) Die Oxydation der Citronen-, Apfel- und Fumarsäure durch Tiergewebe. *Biochem Z* **31**: 478-505.
- Beach, R.L., Aogaichi, T., and Plaut, G.W. (1977) Identification of D-threo-alpha-methylisocitrate as stereochemically specific substrate for bovine heart aconitase and inhibitor of TPN-linked isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem* **252**: 2702-2709.
- Beinert, H., Emptage, M.H., Dreyer, J.L., Scott, R.A., Hahn, J.E., Hodgson, K.O., and Thomson, A.J. (1983) Iron-sulfur stoichiometry and structure of iron-sulfur clusters in three-iron proteins: evidence for [3Fe-4S] clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 393-396.
- Beinert, H., and Thomson, A.J. (1983) Three-iron clusters in iron-sulfur proteins. *Arch Biochem Biophys* **222**: 333-361.
- Beinert, H., and Kennedy, M.C. (1989) 19th Sir Hans Krebs lecture. Engineering of protein bound iron-sulfur clusters. A tool for the study of protein and cluster chemistry and mechanism of iron-sulfur enzymes. *Eur J Biochem* **186**: 5-15.
- Beinert, H., Holm, R.H., and Munck, E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* **277**: 653-659.
- Belikova, Y.O., Burov, V.I., and Vinogradov, A.D. (1988) Isolation and properties of oxaloacetate keto-enol-tautomerases from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **936**: 10-19.
- Belikova Yu, O., Kotlyar, A.B., and Vinogradov, A.D. (1989) Identification of the high-molecular-mass mitochondrial oxaloacetate keto-enol tautomerase as inactive aconitase. *FEBS Lett* **246**: 17-20.
- Bennett, B., Gruer, M.J., Guest, J.R., and Thomson, A.J. (1995) Spectroscopic characterisation of an aconitase (AcnA) of *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **233**: 317-326.

- Borges-Walmsley, M.I., Turner, G., Bailey, A.M., Brown, J., Lehmbeck, J., and Clausen, I.G. (1995) Isolation and characterisation of genes for sulphate activation and reduction in *Aspergillus nidulans*: implications for evolution of an allosteric control region by gene duplication. *Mol Gen Genet* **247**: 423-429.
- Brakhage, A.A., and Turner, G. (1992) L-lysine repression of penicillin biosynthesis and the expression of penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett* **77**: 123-127.
- Brakhage, A.A., Andrianopoulos, A., Kato, M., Steidl, S., Davis, M.A., Tsukagoshi, N., and Hynes, M.J. (1999) HAP-Like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. *Fungal Genet Biol* **27**: 243-252.
- Brock, M., Fischer, R., Linder, D., and Buckel, W. (2000) Methylcitrate synthase from *Aspergillus nidulans*: implications for propionate as an antifungal agent. *Mol Microbiol* **35**: 961-973.
- Brock, M. (2001) Zum Wirkungsmechanismus von Propionat als Fungizid in *Aspergillus nidulans*. Doktorarbeit, pp. 180.
- Brock, M., Darley, D., Textor, S., and Buckel, W. (2001) 2-Methylisocitrate lyases from the bacterium *Escherichia coli* and the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*: characterization and comparison of both enzymes. *Eur J Biochem* **268**: 3577-3586.
- Brock, M., Maerker, C., Schütz, A., Völker, U., and Buckel, W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur J Biochem* **269**: 6184-6194.
- Brock, M., and Buckel, W. (2004) On the mechanism of action of the antifungal agent propionate. *Eur J Biochem* **271**: 3227-3241.
- Brock, M. (2005) Generation and phenotypic characterization of *Aspergillus nidulans* methylisocitrate lyase deletion mutants: methylisocitrate inhibits growth and conidiation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5465-5475.
- Broderick, J.B., Henshaw, T.F., Cheek, J., Wojtuszewski, K., Smith, S.R., Trojan, M.R., McGhan, R.M., Kopf, A., Kibbey, M., and Broderick, W.E. (2000) Pyruvate formate-lyase-activating enzyme: strictly anaerobic isolation yields active enzyme containing a [3Fe-4S](+) cluster. *Biochem Biophys Res Commun* **269**: 451-456.
- Cammack, R., Patil, D.S., and Fernandez, V.M. (1985) Electron-spin-resonance/electron-paramagnetic-resonance spectroscopy of iron-sulphur enzymes. *Biochem Soc Trans* **13**: 572-578.
- Claes, W.A., Puhler, A., and Kalinowski, J. (2002) Identification of two *prpDBC* gene clusters in *Corynebacterium glutamicum* and their involvement in propionate degradation via the 2-methylcitrate cycle. *J Bacteriol* **184**: 2728-2739.

- Cornforth, J.W., Redmond, J.W., Eggerer, H., Buckel, W., and Gutschow, C. (1970) Synthesis and configurational assay of asymmetric methyl groups. *Eur J Biochem* **14**: 1-13.
- Deodato, F., Boenzi, S., Santorelli, F.M., and Dionisi-Vici, C. (2006) Methylmalonic and propionic aciduria. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **142**: 104-112.
- Emptage, M.H., Dreyers, J.L., Kennedy, M.C., and Beinert, H. (1983a) Optical and EPR characterization of different species of active and inactive aconitase. *J Biol Chem* **258**: 11106-11111.
- Emptage, M.H., Kent, T.A., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Munck, E. (1983b) Mossbauer and EPR studies of activated aconitase: development of a localized valence state at a subsite of the [4Fe-4S] cluster on binding of citrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**: 4674-4678.
- Fansler, B., and Lowenstein, J.M. (1969) Aconitase from pig heart [EC 4.2.13 Citrate (isocitrate) hydro-lyase]. In *Method Enzym.* Vol. 13, Citric Acid Cycle, pp. 26-30.
- Fogo, J.K., and Popowski, M. (1949) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Anal Chem* **21**: 732-734.
- Gruer, M.J., Artymiuk, P.J., and Guest, J.R. (1997) The aconitase family: three structural variations on a common theme. *Trends Biochem Sci* **22**: 3-6.
- Gütlich, P., Link, R., and Trautwein, A. (1978) *Mössbauer spectroscopy and transition metal chemistry*. Berlin: Springer Verlag.
- Haas, H., Zadra, I., Stoffler, G., and Angermayr, K. (1999) The *Aspergillus nidulans* GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. *J Biol Chem* **274**: 4613-4619.
- Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J.F., Parson, W., Abt, B., Winkelmann, G., and Oberegger, H. (2003) Characterization of the *Aspergillus nidulans* transporters for the siderophores enterobactin and triacetylfusarinine C. *Biochem J* **371**: 505-513.
- Hammelman, T.A., O'Toole, G.A., Trzebiatowski, J.R., Tsang, A.W., Rank, D., and Escalante-Semerena, J.C. (1996) Identification of a new *prp* locus required for propionate catabolism in *Salmonella thyphimurium* LT2. *FEMS Microbiol Lett* **137**: 233-239.
- Huynh, B.H., Moura, J.J., Moura, I., Kent, T.A., LeGall, J., Xavier, A.V., and Munck, E. (1980) Evidence for a three-iron center in a ferredoxin from *Desulfovibrio gigas*. Mossbauer and EPR studies. *J Biol Chem* **255**: 3242-3244.
- Hynes, M.J. (1994) Regulatory circuits of the *amdS* gene of *Aspergillus nidulans*. *Antonie van Leeuwenhoek* **65**: 179-182.



- Jia, Y., Tomita, T., Yamauchi, K., Nishiyama, M., and Palmer, D.R. (2006) Kinetics and product analysis of the reaction catalyzed by recombinant homoaconitase from *Thermus thermophilus*. *Biochem J* **396**: 479-485.
- Johnson, M.K., Bennett, D.E., Morningstar, J.E., Adams, M.W., and Mortenson, L.E. (1985) The iron-sulfur cluster composition of *Escherichia coli* nitrate reductase. *J Biol Chem* **260**: 5456-5463.
- Kadir, F.H., Read, N.M., Dickson, D.P., Greenwood, C., Thompson, A., and Moore, G.R. (1991) Mössbauer spectroscopic studies of iron in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Inorg Biochem* **43**: 753-758.
- Kennedy, M.C., Emptage, M.H., Dreyer, J.L., and Beinert, H. (1983) The role of iron in the activation-inactivation of aconitase. *J Biol Chem* **258**: 11098-11105.
- Kennedy, M.C., Kent, T.A., Emptage, M., Merkle, H., Beinert, H., and Munck, E. (1984) Evidence for the formation of a linear [3Fe-4S] cluster in partially unfolded aconitase
- Kennedy, M.C., and Beinert, H. (1988) The state of cluster SH and S<sup>2-</sup> of aconitase during cluster interconversions and removal. A convenient preparation of apoenzyme. *J Biol Chem* **263**: 8194-8198.
- Kent, T.A., Dreyer, J.L., Kennedy, M.C., Huynh, B.H., Emptage, M.H., Beinert, H., and Munck, E. (1982) Mossbauer studies of beef heart aconitase: evidence for facile interconversions of iron-sulfur clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 1096-1100.
- Kent, T.A., Emptage, M.H., Merkle, H., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Munck, E. (1985) Mossbauer studies of aconitase. Substrate and inhibitor binding, reaction intermediates, and hyperfine interactions of reduced 3Fe and 4Fe clusters. *J Biol Chem* **260**: 6871-6881.
- Krebs, H.A. (1953) The equilibrium constants of the fumarase and aconitase systems. *Biochem J* **54**: 78-82.
- Krüger, M., Sievers, N., and Fischer, R. (2005) Molekularbiologie der Sporenträgerentwicklung des Schimmelpilzes *Aspergillus nidulans*. *Biologie in unserer Zeit* **27**: 375-382.
- Kuhara, T., Ohse, M., Inoue, Y., Yorifuji, T., Sakura, N., Mitsubuchi, H., Endo, F., and Ishimatu, J. (2002) Gas chromatographic-mass spectrometric newborn screening for propionic acidemia by targeting methylcitrate in dried filter-paper urine samples. *J Inherit Metab Dis* **25**: 98-106.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lauble, H., and Stout, C.D. (1995) Steric and conformational features of the aconitase mechanism. *Proteins* **22**: 1-11.

- Lill, R., and Mühlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* **30**: 133-141.
- Lovenberg, W., Buchanan, B.B., and Rabinowitz, J.C. (1963) Studies on the chemical nature of Clostridial Ferredoxin. *J Biol Chem* **238**: 3899-3913.
- Maerker, C. (2001) Der Methylcitratzyklus in *Escherichia coli*: Katalyse und Expression. Diplomarbeit: Marburg, pp. 106.
- Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A.A., and Brock, M. (2005) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *Febs J* **272**: 3615-3630.
- Martius, C. (1937) Über den Abbau der Citronensäure. *Biol Chem Hoppe Seyler*: 104-110.
- Martius, C., and Knoop, F. (1937) Der physiologische Abbau der Citronensäure. *Biol Chem Hoppe Seyler*: 1-2.
- Martius, C. (1938) Der intermediäre Stoffwechsel der Citronensäure. *Biol Chem Hoppe Seyler* **256**: 29-42.
- Miyakoshi, S., Enami, K., Uchiyama, H., and Tabuchi, T. (1987) Role of methylcitric acid cycle in catabolism of amino acids by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric Biol Chem* **51**: 1017-1021.
- Morningstar, J.E., Johnson, M.K., Cecchini, G., Ackrell, B.A., and Kearney, E.B. (1985) The high potential iron-sulfur center in *Escherichia coli* fumarate reductase is a three-iron cluster. *J Biol Chem* **260**: 13631-13638.
- Moura, J.J., LeGall, J., and Xavier, A.V. (1984) Interconversion from 3Fe into 4Fe clusters in the presence of *Desulfovibrio gigas* cell extracts. *Eur J Biochem* **141**: 319-322.
- Mueller, S. (2005) Iron regulatory protein 1 as a sensor of reactive oxygen species. *Biofactors* **24**: 171-181.
- Mühlenhoff, U., and Lill, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 370-382.
- Oberegger, H., Schoeser, M., Zadra, I., Schrettl, M., Parson, W., and Haas, H. (2002) Regulation of *freA*, *acoA*, *lysF*, and *cycA* expression by iron availability in *Aspergillus nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5769-5772.
- Philpott, C.C., Klausner, R.D., and Rouault, T.A. (1994) The bifunctional iron-responsive element binding protein/cytosolic aconitase: the role of active-site residues in ligand binding and regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 7321-7325.

- Plank, D.W., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Howard, J.B. (1989) Cysteine labeling studies of beef heart aconitase containing a 4Fe, a cubane 3Fe, or a linear 3Fe cluster. *J Biol Chem* **264**: 20385-20393.
- Ramsay, R.R., Dreyer, J.L., Schloss, J.V., Jackson, R.H., Coles, C.J., Beinert, H., Cleland, W.W., and Singer, T.P. (1981) Relationship of the oxidation state of the iron-sulfur cluster of aconitase to activity and substrate binding. *Biochemistry* **20**: 7476-7482.
- Ringeling, P.L., Davy, S.L., Monkara, F.A., Hunt, C., Dickson, D.P., G., M.A., and Moore, G.R. (1994) Iron metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. Characterisation of bacterioferritin and formation of non-haem iron particles in intact cells. *Eur J Biochem* **223**: 847-855.
- Robbins, A.H., and Stout, C.D. (1989) The structure of aconitase. *Proteins* **5**: 289-312.
- Rose, I.A., and O'Connell (1967) Mechanism of aconitase action. *J Biol Chem* **242**: 1870-1879.
- Ruzicka, F.J., and Beinert, H. (1978) The soluble "high potential" type iron-sulfur protein from mitochondria is aconitase. *J Biol Chem* **253**: 2514-2517.
- Schloss, J.V., Emptage, M.H., and Cleland, W.W. (1984) pH profiles and isotope effects for aconitases from *Saccharomycopsis lipolytica*, beef heart, and beef liver. alpha-Methyl-cis-aconitate and threo-Ds-alpha-methylisocitrate as substrates. *Biochemistry* **23**: 4572-4580.
- Stryer, L. (1995) *Biochemie*: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Tabuchi, T., and Hara, S. (1974) Production of 2-methylisocitric acid from *n*-Paraffins by mutants of *Candida lipolytica*. *Agr Biol Chem* **38**: 1105-1106.
- Tabuchi, T., Serizawa, N., and Uchiyama, H. (1974) A novel pathway for the partial oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via seven-carbon tricarboxylic acids in yeast. *Agr Biol Chem* **38**: 2571-2572.
- Tabuchi, T., and Uchiyama, H. (1975) Methylcitrate condensing and methylisocitrate cleaving enzymes: evidence for the pathway of oxidation of propionyl-CoA to pyruvate via C7-tricarboxylic acids. *Agr Biol Chem* **39**: 2035-2042.
- Tabuchi, T., Aoki, H., Uchiyama, H., and Nakahara, T. (1981) 2-methylcitrate dehydratase, a new enzyme functioning at the methylcitric acid cycle of propionate metabolism. *Agric Biol Chem* **45**: 2823-2829.
- Tabuchi, T., Umetsu, H., Aoki, H., and Uchiyama, H. (1995) Characteristics of 2-methylisocitrate dehydratase, isolated from *Yarrowia lipolytica*, in comparison with aconitase. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 2013-2017.

- Textor, S., Wendisch, V.F., De Graaf, A.A., Muller, U., Linder, M.I., Linder, D., and Buckel, W. (1997) Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. *Arch Microbiol* **168**: 428-436.
- Tong, C.H., and Draughon, F.A. (1985) Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. *Appl Environ Microbiol* **49**: 1407-1411.
- Uchiyama, H., and Tabuchi, T. (1976) Properties of methylcitrate synthase from *Candida lipolytica*. *Agr Biol Chem* **40**: 1411-1418.
- van Rooyen, J.P., Mienie, L.J., Erasmus, E., De Wet, W.J., Ketting, D., Duran, M., and Wadman, S.K. (1994) Identification of the stereoisomeric configurations of methylcitric acid produced by si-citrate synthase and methylcitrate synthase using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis* **17**: 738-747.
- Voet, D., and Voet, J.G. (1995) *Biochemistry*: John Wiley and sons, Inc.
- Vogel, A.I. (1961) *A text-book of quantitative inorganic analysis including elementary instrumental analysis*: Longmans, London.
- Watson, D., Lindel, D.L., and Fall, R. (1983) *Pseudomonas aeruginosa* contains an inducible methylcitrate synthase. *Curr Microbiol* **8**: 17-21.
- Williams, C.H., Stillman, T.J., Barynin, V.V., Sedelnikova, S.E., Tang, Y., Green, J., Guest, J.R., and Artymiuk, P.J. (2002) *E. coli* aconitase structure reveals a HEAT-like domain with implications for protein-protein recognition. *Nat Struct Biol* **9**: 447-452.
- Yu, J.H., and Keller, N. (2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 437-458.
- Zhang, Y.Q., Brock, M., and Keller, N.P. (2004) Connection of propionyl-CoA metabolism to polyketide biosynthesis in *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **168**: 785-794.
- Zheng, L., Kennedy, M.C., Beinert, H., and Zalkin, H. (1992) Mutational analysis of active site residues in pig heart aconitase. *J Biol Chem* **267**: 7895-7903.

## ANHANG

Anhang A: *acoA*

## Genlocus AN5525.2

GTA CTA ATT CTG GAC CAG CTG TTC GGG ACT CGG GGC **ATG** GCC ACC GTT GCC GAC CTC 0057  
M A T V A D L

GAC AAG AAG GTC GAG ATG TGC AAT CTC GAA AAG *GTGAGCTATTCCTTGTGCTGACTCTATTGTG* 00121  
D K K V E M C N L E K

*GCTAGCCTCGGTTGCTTCGGATGAGTTAGCGATGCTGGACAAACTCCGCTAACGGTCGCATTCTAG* GGC AAC 0193  
G N

TAC ATC AAC TAC AA *GTATGTTTAAAGATCATTGGAGTCTGGAGTCTGGTCTATTGGCGAAGCCAAATGT* 0263  
Y I N Y K

*CGGGAGTTGACTAATATGTTTTTGCAACTTGCAG* G AAG ATG TCC GAG AAC CTG GAC GTT GTT CG 0327  
K M S E N L D V V R

C CGT CGT TTG ACT CGT CCT CTC ACA TAC GCC GAG AAG ATT CTG TAC TCT CAC CTT G 0383  
R R L T R P L T Y A E K I L Y S H L D

AC GAC CCC CAG AAC CAG GAC ATC GAG CGT GGC AAG TCC TAC CTC AAG CTC CGC CCT 0439  
D P Q N Q D I E R G K S Y L K L R P

GAC CGT GTT GCT TGC CAG GAT GCC ACC GCC CAG ATG GCC ATC CTG CAG TTC ATG TCG 0496  
D R V A C Q D A T A Q M A I L Q F M S

GCT GGT ATG CCG TCC GTC GCT ACT CCC ACC ACC GTG CAC TGT GAT CAC TTG ATT GAG 0553  
A G M P S V A T P T T V H C D H L I E

GCT CAG CTT GGT GGT GAG AAG GAT CTT GCT CGC GCG AAC GAG ATC AAC AAG GAG GTC 0610  
A Q L G G E K D L A R A N E I N K E V

TAC GAC TTC CTT GCC TCT TCG ACT GCC AAG TAC AAC ATT GGT TTC TGG AAG CCT GGC 0667  
Y D F L A S S T A K Y N I G F W K P G

TCT GGT ATC ATT CAC CAG ATT ATC CTT GAG AAC TAC GCC TTC CCC GGT GGT CTT ATG 0724  
S G I I H Q I I L E N Y A F P G G L M

ATC GGT ACC GAT TCT CAC ACT CCT AAC GCT GGT GGT CTT GCT ATT GCT GCT ATT GGT 0781  
I G T D S H T P N A G G L A I A A I G

GTT GGT GGT GCC GAT GCC GTC GAT GTC ATG GCT GGC CTT CCT TGG GAA TTG AAG GCT 0838  
V G G A D A V D V M A G L P W E L K A

CCC AAG GTC ATC GGT GTT AGG CTC ACT GGT GAG ATG TCC GGC TGG ACC GCT CCC AAG 0895  
P K V I G V R L T G E M S G W T A P K

G *GTAAGTATCATTATTTACATCTGACCCAAGGCTTGAGGGGAATTGTGCACTAATACTCTCTTAG* AT ATC A 0966  
D I I

TC CTC AAG GTC GCT GGT CTC CTG ACT GTC AAG GGT GGT ACT GGT GCC ATC ATT GAA 1022  
L K V A G L L T V K G G T G A I I E

TAC CAC GGT CCT GGT GTC AAC TCC CTC TCT GCC ACT GGT ATG GCC ACC ATC TGT AAC 1079  
Y H G P G V N S L S A T G M A T I C N

ATG GGT GCT GAG ATT GGT GCC ACC ACC TCT CTC TTC CCC TTC AAC GAC CGT ATG TAC 1136  
M G A E I G A T T S L F P F N D R M Y

Fortsetzung Anhang A: *acoA*

GAC TAT CTG AAG GCT ACC AAG CGT CAG CAG ATT GGT GAC TTC GCC CGC TCC TAC GCC	1193
D Y L K A T K R Q Q I G D F A R S Y A	
AAG GAC CTA CGC GAG GAT GAG GGT GCT GAG TAC GAC CAG CTG ATC GAG ATC AAC CTG	1250
K D L R E D E G A E Y D Q L I E I N L	
TCC GAG CTC GAG CCC CAC ATC AAC GGT CCC TTC ACC CCT GAC TTG GCT ACT CCC ATC	1307
S E L E P H I N G P F T P D L A T P I	
TCT CAG TTC AAG GAG GCT GTC AAG GCC AAC GGC TGG CCC GAG GAG CTC AAG GTC GGT	1364
S Q F K E A V K A N G W P E E L K V G	
TTG ATT GGC TCT TGC ACC AAC TCT TCT TAC GAG GAC ATG TCT CGT GCT GCT TCC ATC	1421
L I G S C T N S S Y E D M S R A A S I	
GCC CAG GAT GCT CTC GAC CAC GGT CTG AAG GCC AAG TCT ATC TTC ACT GTT ACT CCT	1478
A Q D A L D H G L K A K S I F T V T P	
GGT TCC GAG CAG ATT CGC GCT ACC ATT GAG CGT GAC GGT CAG CTC AAG ACC CTT GAG	1535
G S E Q I R A T I E R D G Q L K T L E	
GAG TTC GGT GGT GTC ATC CTG GCC AAC GCC TGC GGT CCT TGC ATT GGA CAG TGG GAC	1592
E F G G V I L A N A C G P C I G Q W D	
CGC AAG GAT GTC AAG AAG GGT ACT CCC AAC TCC ATT GTC TCT TCT TAC AAC CGT AAC	1649
R K D V K K G T P N S I V S S Y N R N	
TTC ACT GGT CGT AAC GAT GCC AAC CCT GCT ACT CAC GCT TTC GTC ACT TCC CCC GAC	1706
F T G R N D A N P A T H A F V T S P D	
CTT GTC GTT GCT CTG AGC ATT GCT GGT ACT CTC AAC TTC AAC CCC CTC ACC GAC ACT	1763
L V V A L S I A G T L N F N P L T D T	
CTC AAG GAC AAG GAT GGC AAG GAG TTC AAG CTT AAG GCC CCT ACT GGT GAC GGT CTC	1820
L K D K D G K E F K L K A P T G D G L	
CCC AGC CGT GGC TAC GAC CCC GGC CGC GAC ACC TAC CAG GCT CCT CCC ACC GAC CGC	1877
P S R G Y D P G R D T Y Q A P P T D R	
AGC AGT GTC GAT GTT GCT GTT TCC CCC TCC AGT GAC CGT CTT CAG CTC CTC GCT GGA	1934
S S V D V A V S P S S D R L Q L L A G	
TTC CAG CCT TGG GAC GGC AAG GAT GCC ACT GGC ATT CCT ATC CTG ATC AAG TGC CAG	1991
F Q P W D G K D A T G I P I L I K C Q	
GGC AAG ACT ACT ACT GAT CAC ATC TCC ATG GCT GGC CCA TGG CTC AAG TAC CGT GGT	2048
G K T T T D H I S M A G P W L K Y R G	
CAC CTT GAC AAC ATC TCT AAC AAC ATG CTG ATC GGT GCC GTC AAC GCT GAG AAC GGC	2105
H L D N I S N N M L I G A V N A E N G	
GAG GCC AAC AAG ATC AAG AAC GTT TTC ACT GGC GAG TAT GGT GCT GTC CCC GCC ACG	2162
E A N K I K N V F T G E Y G A V P A T	
GCT CGT GAC TAC AAG GCT CGT GGT GTT AAG TGG GTT GTT ATC GGT GAC TGG AAC TAC	2219
A R D Y K A R G V K W V V I G D W N Y	
GGT GAG GGT AGC TCT CGT GAG CAC GCT GCC CTT GAG CCC CGC CAC CTT GGC GGT CTC	2276
G E G S S R E H A A L E P R H L G G L	
GCC ATC ATC ACC CGC AGC TTT GCC CGT ATT <i>GTAAGTCTCATGCGTCTCATTTCAGACTAAGTAGTA</i>	2341
A I I T R S F A R I	

Fortsetzung Anhang A: *acoA*

```

TTTGGACTAACAAATATCTCCAG CAC GAA ACC AAC CTT AAG AAG CAG GGT ATG CTT CCC CT 2403
      H E T N L K K Q G M L P L
C ACC TTC TCC GAC CCT GCC GAC TAC GAC CGC ATC CCC CCC GAC GCC ACC GTC GAC C 2459
  T F S D P A D Y D R I P P D A T V D L
TC CTC TGC ACG GAA CTC GCC GTT GAC AAG CCC ATG ACC CTC CGT GTT CAC CCC AAG 2515
  L C T E L A V D K P M T L R V H P K
GAT GGT GCC TCC TTC GAC GTC AAG CTC AGC CAC ACC TTC AAC GAG TCC CAG ATT GAG 2572
D G A S F D V K L S H T F N E S Q I E
TGG TTC AAG GAC GGT TCC GCC CTC AAC ACC ATG GCC CGC AAG TCT GGC AAC TAA 2626
W F K D G S A L N T M A R K S G N *

```

Gen: 2590 Bp

Protein: 759 As

## Anhang B: AcoA

Gemessene Peptide nach Trypsinverdau der angereicherten AcoA.

Hypothetical protein AN5525.2

```

L F G T R G M A T V A D L D K K V E M C N L E K G N Y I N Y K K M S E N L D V V R R
R L T R P L T Y A E K I L Y S H L D D P Q N Q D I E R G K S Y L K L R P D R V A C Q
D A T A Q M A I L Q F M S A G M P S V A T P T T V H C D H L I E A Q L G G E K D L A
R A N E I N K E V Y D F L A S S T A K Y N I G F W K P G S G I I H Q I I L E N Y A F
P G G L M I G T D S H T P N A G G L A I A A I G V G G A D A V D V M A G L P W E L K
A P K V I G V R L T G E M S G W T A P K D I I L K V A G L L T V K G G T G A I I E Y
H G P G V N S L S A T G M A T I C N M G A E I G A T T S L F P F N D R M Y D Y L K A
T K R Q Q I G D F A R S Y A K D L R E D E G A E Y D Q L I E I N L S E L E P H I N G
P F T P D L A T P I S Q F K E A V K A N G W P E E L K V G L I G S C T N S S Y E D M
S R A A S I A Q D A L D H G L K A K S I F T V T P G S E Q I R A T I E R D G Q L K T
L E E F G G V I L A N A C G P C I G Q W D R K D V K K G T P N S I V S S Y N R N F T
G R N D A N P A T H A F V T S P D L V V A L S I A G T L N F N P L T D T L K D K D G
K E F K L K A P T G D G L P S R G Y D P G R D T Y Q A P P T D R S S V D V A V S P S
S D R L Q L L A G F Q P W D G K D A T G I P I L I K C Q G K T T T D H I S M A G P W
L K Y R G H L D N I S N N M L I G A V N A E N G E A N K I K N V F T G E Y G A V P A
T A R D Y K A R G V K W V V I G D W N Y G E G S S R E H A A L E P R H L G G L A I I
T R S F A R I H E T N L K K Q G M L P L T F S D P A D Y D R I P P D A T V D L L C T
E L A V D K P M T L R V H P K D G A S F D V K L S H T F N E S Q I E W F K D G S A L
N T M A R K S G N

```

grau = gemessene Peptide

Abdeckung 24,7 % (189 / 766 Aminosäuren)

Mascot Score: 83.1

## Anhang C: Aconitase 2

*Aspergillus nidulans* FGSC A4 hypothetical protein (AN3894\_2),  
partial mRNA.

Accession XM\_656406

ATGTTGAGGCAGATCGTCTCGCAACGGAGCGCCGACGCAGGCAGCTAATTGATCAGCTTGCGCCATGCCTGCGCCGCGGCCT  
GGCCACCGCTACAGACTCGACTCCACCTCTTCGCGCATGCCTCCCTATTCCAAAATCGTACAAAATCTGAACAAGTTCGCA  
AGGTGCTGGGATCATCTCGGGCCCTTACTCTGGCGGAGAAGATTCTGTACTCTCATCTTGACAATGCGGAGGAGTCACTTTTG  
ACTGGTACGAACAATGGACGCGACATCCGCGGCAAGCCGATCTGAAGCTGAAGCCTGACCGCCTTGCATGCAGGATGCGTC  
TGCACAAAATGGCCCTGTTGCAGTTCATGTCTTGGCGCTTGCCGTCGACCGCAGTTCGCGCCAGTATTCACTGTGACCATATGA  
TTGTGGGTGAGCGCGGTGCCGACACCGATCTGCCAGCGTCGATCCAAGGAAACAAGGAGGTGTTTCGATTTCTTGGAGAGCGCT  
TCAAAGAGATACGGAATTGAGTTCGGCTCCCGGTGCTGGTATCATCCACCAGAGCGTCTTGGAGAATATTCCGCCCTGG  
TCTTATGATGCTGGGAACGGATAGTCATACACCTAACGCCGTGGCTGGGTGCCATTGCCATCGGTGTGGTGGCGCTGATG  
CCGTTGACGCTCTTGTGACGCTCCTTGGGAAGTAAAAGCCCTCGCATCCTCGGTGTCAGACTGGAGGGCAAGCTCCAAGGC  
TGGGCCGCGCCCAAGGATATCATCCTTCACCTCGCTGAAAGCTTACCGTTCGCGGTGGCACCGGCTTTGTTCATCGAATACCA  
CGGCCCGGAGTTGAAACACTCAGCACCACCGGTATGGCGACGATTTGTAACATGGGTGCGGAAGTTGGCGCCACAACCTCCC  
TTTTCCCTTCTCCCCAACCATGTGCCGTACCTGAAGGCGACGAACCGCGCAGATGTCGCCGAGGCAGCGCCCAAGATCGCC  
TCTGCAGGGTCTTCGAGCCTGCTCCGAGCAGACACCAGCGCCGAATACGATGAGCTCATCACGATCGACCTTTCTACCCTAGA  
ACCGCACATCAACGGCCCTTCACGCCGATCTCTCTGTTCCGCTGTGCGCTTCGCTGAAACCGTCCGCAAAAACAACCTGGC  
CGGAGACTTTCAACGCCGGCCTTATTGGCAGCTGCACTAACAGCTCCTATGAAGACATGACACGCGCCGAGCACCTCGTCAA  
CAAGCCAACGCCCGGTCTCAAGCCGAAAGCAGACCTTTTCATCACCCCTGGTAGCGAACAGATCCGCGCCACCCTCGACCG  
TGACCAAACCTCTCCACCTTCTCATCTGCTGGCGGACCGTCCTCGCCAACGCCGCGGTCCCTGCATGGCCAATGGAAGC  
GCACAGACGATGTCCCAAGGGCACCGATAATGCCATCTTCACCTCCTACAACCGCAACTTCCCCGGCCGAATGACGGCAAC  
CGCCGACAATGAACTTCCTCGCTTCTCCGAGCTCGTCACTGCCCTTACCTACGCCGGCTCCACCACCTTCAACCTGTAC  
TGACTCCATCACCCTCCTTCCGGTTCAGAATTCGGCTTTGAACCCCTACCGCCAAAGACTTGCCAGCAAAGGCTTCGAGG  
CCGAAACCCCGCCTTCCAGCCCTCCGCCCTGTGCCTGATTCCAGCGTCGAGGTCAAGGTCTCTCCTACATCTACCCGCTC  
GCTTCTTCGAGCCTTTCGCCCTTTCGCCAACTCCGACCTCCAGAACCTCAGCGTCTCTACAAAGTCAAGGGCCAGTGCAC  
AACGGATAACATTTCCGCTGCCGGACCTTGGCTCAAGTACAAGGGCCACTTGCCCAACATCTCCGCCAACACCCTCATTGGCG  
CTGTGAATGCCGCTACCGGTGAGACGAACGTCGCCCTACGACGAGGCTGGCAAGCAGCACACCATCCCTGATCTTGCTGCACAA  
TGAAAGCCCAGGGCCGCGAGTGGCTCGTCGCTGAAGAGAACTATGGTGAAGGTCCGCTCGTGAACACGCCGCTCTTCA  
GCCACGCTACCTGGGTGGCCGCGTCAATCTCGCCAAGTCTTTCGCTCGTATCCACGAGACCAACCTGAAGAAGCAGGGTGTG  
TTCCCTTGACCTTCGCTGACAAGGCCGACTATGACCGCATTGATGCTTGCGATGTCGTTGCTACCGAGGGCCTGTACGAGACG  
CTGAAGAACGGCGCAAGGGTGAGGTCAAGCTTCGTGTTACGAAGAAGAGTGGCGAGGAGATTGTTATTCCTGTGAAGCACAC  
CTTGAGTGCGGATCAGTCTTCTTTCATCTGCGCGGAGTGCCTTGAACGTGCTTTCCAAGAGGTAG

2391 Bp

MLRQIVSQRSAARRQLIDQLAPCLRRGLATATDSTPTS SRMPYPYSKI VQNLEQVRKVLGSSRALTLAEKILYSHLDNAEESLL  
TGTNNGRDIRGKADLKLKPDVAMQDASAMALLQFMSCLPSTAVPAS IHCDHMIVGERGADTDLPAS IQGNKEVDFDLESA  
SKRYGIEFWPPGAGI IHQSVLENYSAPGLMMLGTDSTPNAGGLGAI AIGVGGADAVDALVDAPWELKAPRILGVRLEGLKQG  
WAAPKDII LHLGKLTVRGGTGFVIEYHGPVETLSTTGMATICNMGAIEVGATTSLFPFSPNHVPYLKATNRADVAEAAKIA  
SAGSSLLRADTSAEYDELITIDLSTLEPHINGPFTPDLSVPLSRFAETVRKNNWPETFNAGLIGSCTNSSYEDMTRAEHLVK  
QANAAGLKPKADLFI TPGSEQIRATLDRDQTLSTFS SAGGTVLANACGFCIGQWKRTDDVPKGTDNAIFTSYNRNFPGRNDGN  
RRTMNF LASPELVALT YAGSTTFNPVTD SITTPSGSEFRFEPTGQDLP SKGFEAGNPAFQPSAPVPDSSVEVKVSPTSTRL  
ALLEPFAPFPNSDLQNL SVLYKVKGQCTTDTI SAAGPWLKYKGHLPNISANTLIGAVNAATGETNVAYDEAGKQHTI PDLAAQ



## Fortsetzung Anhang C: Aconitase 2

WKAQGRELWLVVAEENYGECSAREHAALQPRYLGGRRVILAKSFARIHETNLKKQGVVPLTFADKADYDRIDACDVVATEGLYET  
LKNNGKGEVKLRVTKKSGEEIVIPVKHTLSADQSSFILAGSALNVLSKR

796 As

## Anhang D: Aconitase 3

*Aspergillus nidulans* FGSC A4 hypothetical protein (AN5300\_2), partial mRNA.

Accession XM\_657812

ATGAGTTGGTGGTCCCTCTGGATTACTCCGAATGCATCTCTTTCCGGCGTCGGGTCCGCTCCGCTCGACGAAAAAGTCTGCTCTA  
TTCCTGACCGGTCTAATGCTCTACAGTTTGGCGTCAACTATGCGCGGCAGATTGCAATTTGGAAATCGCGAAACGAGGCT  
CTTCGCGACCGCTAACTTTGACCGAGAACTGTTATACTCTCACCTTATTACCTCTGAGAAAAACACCTGGGATGTGGAGCGC  
ATTGAACGAGGGAAGACTATCCTAGAGCTTCGTCCGGACCGTGTAGCTTGTTCATGATGCCACGGCATCCATGGCCTTGTCTCA  
GTTTCATCAGTGCAGGCTTCCGCGAGTCCGAGTCCCAACGACGGTACATAGCGATCACTTGATCATCTCTAAGAAGGGGGCTG  
AAGAGGATATGCATCGCGCACTTGGAGAGCATGCTGAAGTATACGACTTCCTCAGCAGTGCATCTAGGAAGTATGGCATCGGG  
TTCTGGAAGCCAGGATCGGGTATTATACACACTGTCATTTTCGAGAACTACGCAACACCCCGTGGCCTCATCATCGGTACAGA  
CTCACACACGCCGAATGCTGGCGGCCCTGGGCATGCTCGGAATTGGGGTCCGGTGGCGCAGATGCTGTTGATGCTATGTCCGGAA  
TGCCTTTGGGAGCTTGTGCTCCTAAAGTGGTGGGGTCCGCTTGACAGGCCAGCTACAAGGCTGGAGTTCTACCAAAGACATC  
ATCTGCAGACTTGCAGGTCTGTTGACGGTGTCCGGGGCAAAGGCCGAGTTCATCGAGTTCTTCGGACCGGGAACCCAGACCTT  
GGGAGCGACAGCCATGGCGACTATCTGCAATATGTCCGCGAGAAATAGGATCGACCTCTTCATCTTCCCATATACCGACGCAA  
TGGGCCGATATCTGGAGACCACGCAACGAGCCACGTTATTGAGATGGCCCAGAGAGCGAGGTCTGCGCTTCTCAACGCTGAT  
GAGGGCGCTGACAAGTACTATGATCAAGTTATTGAGCTAGATCTCAGCACACTGGAACCCGACGTCACCGGACCGTTACCCCC  
TGACCTGGCACACCCTATCTCAAAATGAAGACTGCCGTCGCTGCGGAAGATTGGCCTGTGGACTTGAGCCATGCTATGGTCCG  
GCAGTTGTACCAACAGCTCATAACGAGATCTCGATAAACTCGTCAGATCGTTGCACAAGCACGAGCGCCGGGATCACAAAG  
CTCCCCGACACCGTTCTTGTACACCGGGTAGTGAACAGATCCGTGCAACAGCAGAGGCAGATGGCATACTCGACGAACCTTCG  
AGATGCCGGAGCCGTTGTTCTCAGCAGCTCATGCGTCCATGCGTGGATCGTGGGACCGCAAAGATGTGACGCTGAAGGGAA  
AGGAAAAGAAGCTCGGTGATCTCCAGCTTCAATCGCAATTTGTGCGGAAGACATGACAGTAATCCGGCCACACACTCCTTTGTC  
ACCAGCCCAGAAGTAGTGGCTGCGTTCGCCTATGCGGGTGCCTCGATTCAACCCCTGACCGATCCAGTTACCGTGCCCGG  
GGGACCGAGTAAGGAGTTGACTTTAGCCACCTGTAGCCAAGAGCTCCCCATTTCTTTCAAAGCCGGATCAGATACCTTCC  
AAGAACCTTCGCTAGAGGGAACAGACCTCCCTGTGCAAATTCGCCCAGGATCTGACCGGCTGCAACTTCTCCAGCCATTTCTT  
CCCTGGCAGCCGGGTGCGCTGATGGTATGGAATTGCTGATCAAGGTAAAGGGAAAATGCACCACCGACCACATTTCCCCTGC  
TGGACCGTGGTACAAAATACGGGGCCATCTTGAGAACATCTGTAACAACATGCTTACGACCGCCACCAATGCGTTCGTAGGCC  
AAGGTGACCCTCGTCTGCTTGGCCACACTCGCCATCTATAACCTCAAAGTGAAGGCGCTCCGCAGGTGGCAGCGGATCTT  
AAGCAGCGGGGTGTCGGTGGTGTATCGTAGGTGATCAAACTACGGTGAGGGCAGCTCGCGCGAGCACGCAGCCCTCGAAC  
ACGTTATTTGGGCGGGTGGCAGTCATTGCTCGCTCATTGCTCGGATTCACGAAACCAATCTGAAAAAGCAAGGCATGCTTC  
CCCTGACGTTCCGCCACCCGCCACCTATGAGCGCATTGCTGAAGCTGATCGGATCACTTTGATTGGTGTGAAGAAGGTGAG  
CTATGCCCGGGCTCGTCCGTGACGATGCGAGTGCAGCCAGGCGAGGAGGCTTGGGAAGCGGAACAAAGCATAGCTACCA  
CAGCGGGCAGATTCATGGCTTCGCGCTGGGAGTGCCTGAACTACATCAAAGCCACGGCTCTGGCTCAATAG

2397 Bp

MSWSSWITPNASLSASGRSARRKSLLYSLTGRNALQFGVNYARQIRNLEIAKRGSSRPLTLTEKLLYSHLITSEKNTWDVER  
IERGKTIELRPRDVRACHDATASMLLQFISAGLPRVAVPTTVHSDHLIISKGAEDMHRALGEHAEVYDFLSSASRKYGIG  
FWKPGSGI IHTVIFENYATPGGLI IGTDSTPNAGGLGMLGIVGGADAVDAMSGMPWELVAPKVVGVRLTGQLQGWSSTKDI  
ICRLAGLLTVSGGKRVIEFFPGTQTLGATAMATICNMSAEIGSTSCIFPYTDAMGRYLETTQRAHVIEMAQRARSALLNAD  
EGADKYDQVIELDLSTLEPHVNGPFPDLAHPISKLKTAVAAEDWPVDLSHAMVGSCTNSSYEDLDKTRQIVAQARAAGITK  
LPTPFLVTPGSEQIRATAEADGILDELDRDAGAVVLSSSCGPCVGSWDRKDVDVKGKEKNSVISSFNRFVGRHDSNPATHSFV

**Fortsetzung Anhang D: Aconitase 3**

TSPELVAAAFAYAGRLDFNPLTDPVTVPGGPSKELYFSPFVSQELPISFKAGSDTFQEPSLEGTDLVPVQIRFGSDRLQLLQFPF  
 PWQPGCADGMELLIKVKGKCTTDHISPAGPWYKYRGHLENICNNMLTTATNAFVGGQDPRLGLHTRHPITSKVEGAPQVARDL  
 KQRGVRWCIVGDHNYGEGSSREHAALEPRYLGGVAVIARSFARIHETNLKKQGMPLPLTFADPATYERIAEADRITLIGVEEGE  
 LCPGSSVTMRVEPRRGEVWEAELKHSYHSGQIPWLRAGSALNYIKATALAQ

798 As

**Anhang E: Aconitase 4**

*Aspergillus nidulans* FGSC A4 hypothetical protein (AN7642\_2), partial mRNA.

Accession XM\_675819

ATGCTTTTCGCGCATTCTTTGAGGTATATTCGGCGACGCACGCCCTGGGCCATCGCGATGTGGCTACGGCTGCGCTGGGCAG  
 ATTCGAGTCGGACACACAAGTCGACTTCAGCAAATTTAGTAGCAAGATTGGCACCCCTGAGGCGACGGTTGAAGCGCCCTTTGA  
 CGTACGCAGAAAAGGTACTGTACAACCACCTCGATGATGAGTTTGATGGAAACATCGTCCGTGGCCAGACGCAGCTACGATCC  
 AAACCAGTCCGCATCGCTTGCAAGACGCAACTGCTCAGATGGCGCTCATTCAAGACTGCCCCAAGGATATTGGGTGTGCGAC  
 TTCACGGCGAGTTGTCGCGCTGGGCATCGCCGAAAGACATATCAACGAACTTGCAAGGATAAATTCAGTAAAGGGAAGCACAG  
 GATCGATCATTGAGTATTTTGGTCTCGGAGCGCAGACAATTCAGCGACTGGGATGGCTACAGTGTGCAATATGGGGCTGAA  
 TCCGGAGCTACGACTTCCATATTTCCCTACACGGCTCCATGGCAGAGTACTTGCGAGCCAACCGGCGTCTTGACATGGCTGC  
 TGGGTTAGAGACAATTGCATATGAGCTCCGGTCCGATGAGGGCGCCGAATACGACCAGATTATTGATATTGATCTCTCATCAC  
 TGGAGCCGCATATCGATGGCCCCCTTACGCCTGATCTGTCAACGCCCATCTCAAATTTGGGTGAGCAGTTATAGACAATGAG  
 TGGCCGTCGACACTGACCGCCGGCCTTATTGGATCCTGCACGAACTCTTCTTTTCATGACCTCAGCCGCGCATTACTGCTGTC  
 CCCTGGCAGTTTGCAGACCCGAAACACATTGGAGGAGCGGGAATAATGCAGGTGTTTGAAGAAAGCAGGTGCTATCATGTTAC  
 CCAATGCTTGCGGGCCGTGCTGTGGCTCGTGGGATCGTACCGATATACAGAAAGTGAGCCTCACGTAG

981 Bp

MLFAHSLRYIIRRRTPWAHRDVATAALGRFESDTQVDFSKFSSKIGTLRRLKRPLTYAEKVLNHLDDDEFDGNIVRGQTQLRS  
 KPVRIACQDATAQMALIQDCPKDIGCATSRVVALGIAERHINELAGIISVKGSTGSIIEYFGLGAQTI SATGMATVCNMGAE  
 SGATTSIFPYTASMAEYLRANRRPDMAAAVETIAYELRSDEGAEYDQIIDIIDLSSLEPHIDGPFPTDLSTPISKFGSAVIDNE  
 WPSTLTAGLIGSCTNSSFHDLRALLSPGSLQTRNTLEEAGIMQVFEKAGAIMLPNACGPCCGSWDRTDIQKVS LT

326 As

**Anhang F: Aco**

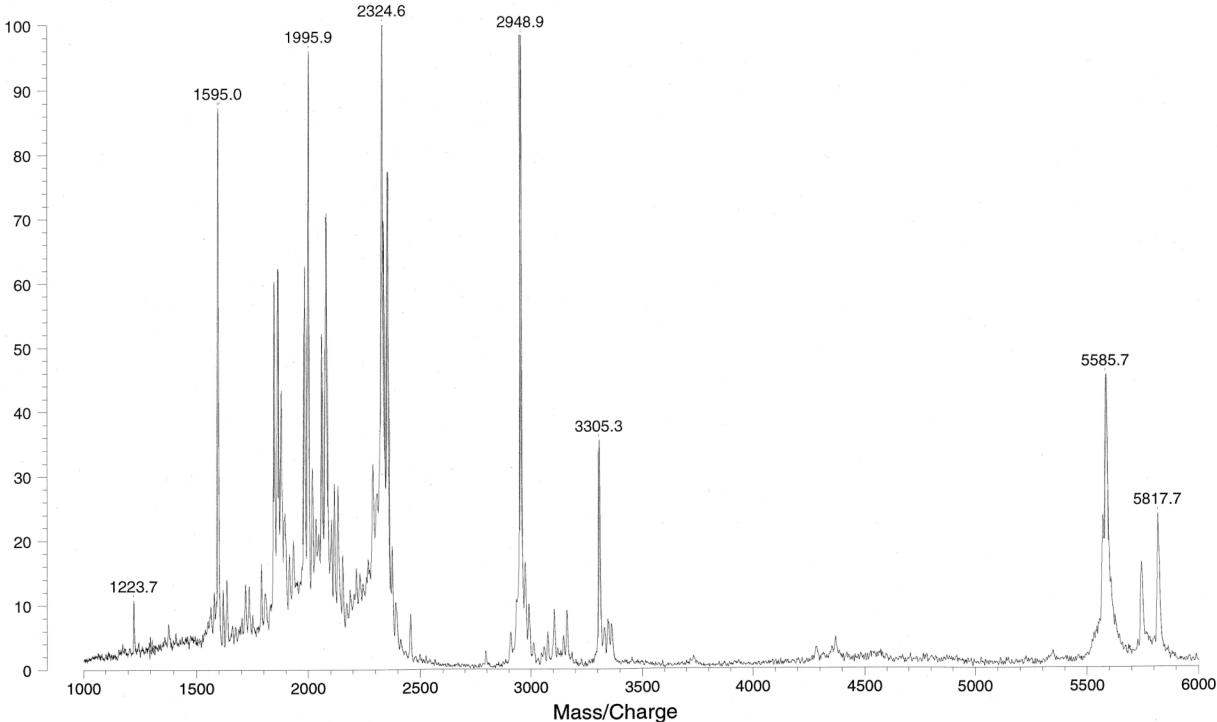
*Aspergillus terreus*, mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein, complete cds.

Accession AF093142

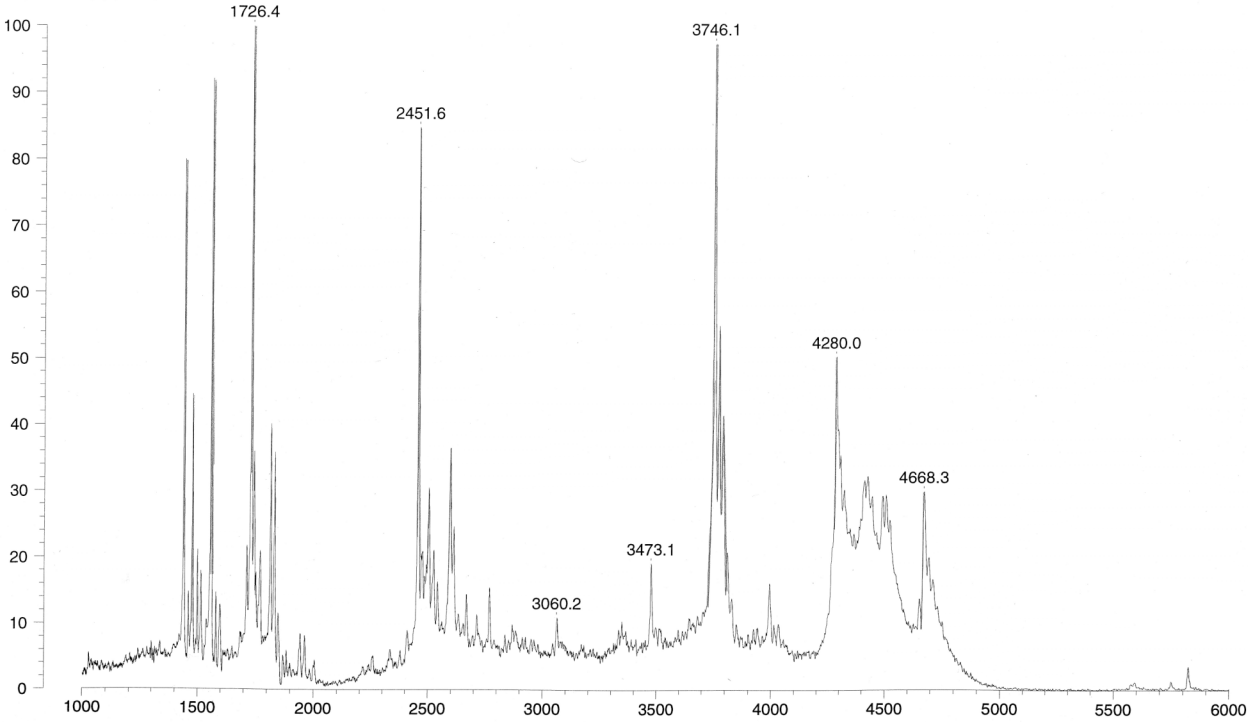
TTATCTACTTTTTACAACAAATATAAAAACCGGTCGACCCACGCGTCCGGCTGTGTCCACCTCGCATAAAGAGCTTCCATCATG  
 ATCTCCACCCGCCTTGCGCGCATGGGTGCGCTGGCCCCAAGTCCCGTCTTCTTCTCGGGACCCGGGTCTGGCCACCGTTGC  
 TGATTCCTCTGACAAAGAAGTCGAGATGACCAACCACGAGAAGGTAACACTACATCAACTACAAGAAGATGTCCGAGAACC  
 TGGACATTGTCGCTCGCCGTCTGAGCCGCCCTCTCACCTACGCCGAGAAGGTTCTCTATCTCACCTTGATGATCCTCATGGT  
 CAGGACATCGAGCGTGGTGTCTTACCTGAAGCTCCGCCCGACCGTGTGCTTGCCAGGATGCTACTGCTCAGATGGCTAT  
 CCTGCAGTTCATGTCCGCTGGCATGCCTTCCGTGCTACCCCCACCACCGTGCCTGCGGACCACTTGATTGAGGCTCAGGTTG  
 GTGGTGAGAAGGATCTTGCTCGTGCACGAGATCAACAAGGAGTCTACGACTTCTTGCCACCCGCCACCGCAAGTACAAC  
 ATCGGTTTCTGGAAGCCCGGTTCCGGTATCATTACCAGATCGTCTGGAGAAGTATGCGTTCCCGGTTGGTCTGATGATCGG



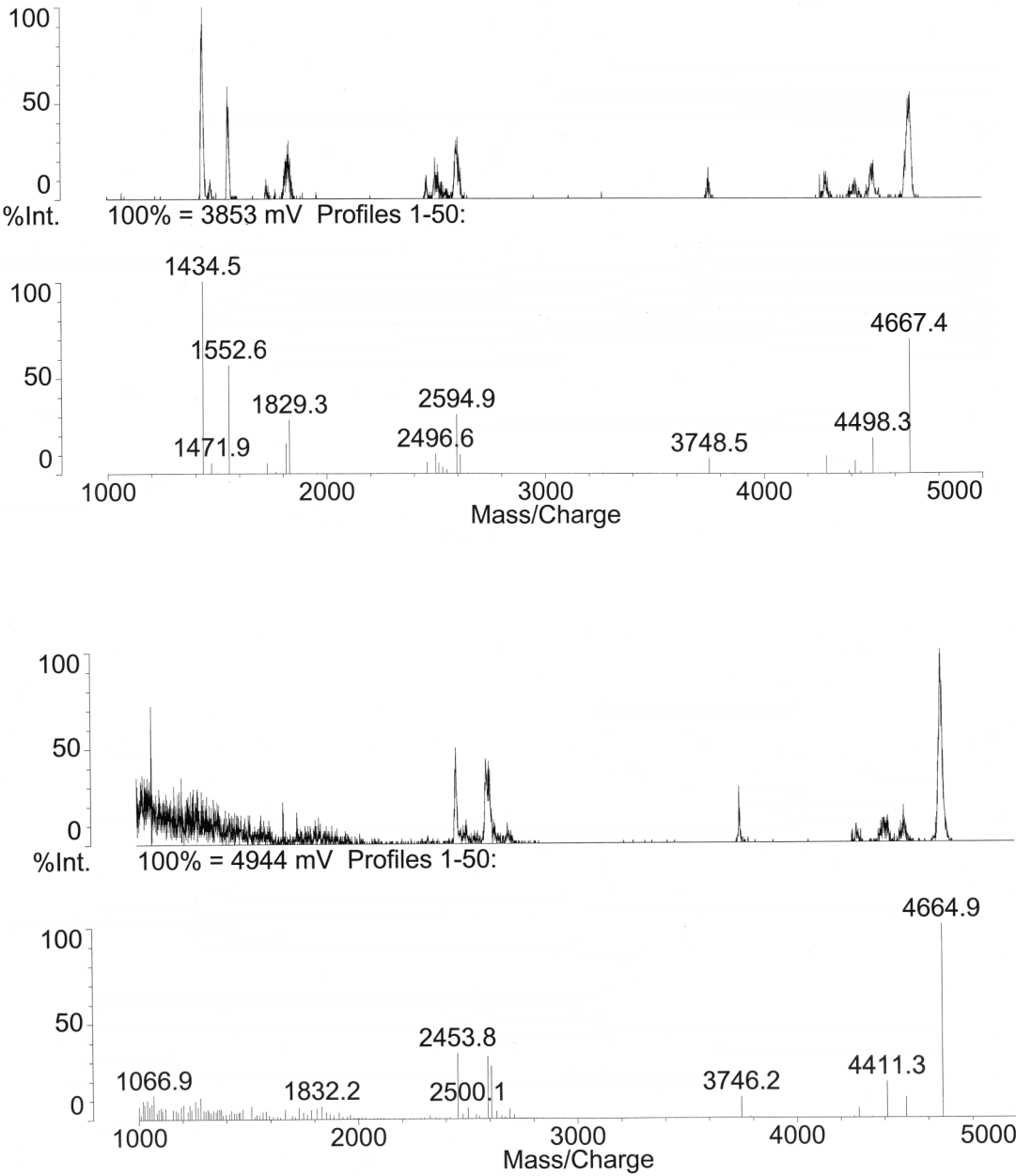
Anhang G: Maldi-Spektrum der Methylcitrat Dehydratase nach Trypsin-Verdau.



Anhang H: Maldi-Spektrum der Midh nach Trypsin-Verdau.



Anhang I und J: Maldi-Spektrum der Aconitase nach Trypsin-Verdau.



**PUBLIKATIONSLISTE**

- Brock, M., Maerker, C., Schütz, A., Völker, U., and Buckel, W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur J Biochem* **269**: 6184-6194.
- Grimm, C., Evers, A., Brock, M., Maerker, C., Klebe, G., Buckel, W., and Reuter, K. (2003) Crystal structure of 2-methylisocitrate lyase (PrpB) from *Escherichia coli* and modelling of its ligand bound active centre. *J Mol Biol* **328**: 609-621.
- Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A.A., and Brock, M. (2005) Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. Propionyl-CoA affects polyketide synthesis, growth and morphology of conidia. *Febs J* **272**: 3615-3630.

## DANKSAGUNG

Ein ganz herzliches Dankeschön an all die Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Matthias Brock danke ich für die Betreuung und kontinuierliche Unterstützung auch über die Distanzen Marburg-Hannover und Hannover-Jena hinweg. Prof. Axel Brakhage danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens und die Möglichkeit, in den jeweiligen Instituten in Hannover und Jena zu arbeiten. Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie in Marburg: Besonders Prof. Buckel für die Unterstützung im ersten Jahr, Dan Darley für die Synthese der Substrate, Antonio Pierik für die Erstellung und Auswertung der EPR-Spektren, Iris Schall für die Präparation der Aconitase und allen Mitarbeitern für die gute Arbeitsatmosphäre. Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie in Hannover, besonders Prof. Auling für die großzügige Regelung in der Übergangszeit, Astrid für die Erledigung aller Formalitäten und die kleinen Schwätzchen zwischendurch, Herrn Plattner für die gewissenhafte Bearbeitung aller Bestellungen, Michael für die Lösung jedes technischen Problems und allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern für die herzliche Atmosphäre. Unserem Ex-S2-Labor mit Judith, Alex, Venelina und Yvonne danke ich für die wirklich lustige Zeit dort, und besonders Yvonne für die Hilfe bei der Ausrichtung der Weihnachtsfeiern. Ebenso danke ich allen Alt-Hannoveranern und Neu-Jenaern für die gute Arbeitsatmosphäre und den Alt-Jenaern für die freundliche Aufnahme. Weiterhin danke ich Veronica Alt vom Institut für Technische Chemie und Frau Töpfer-Petersen vom Institut für Reproduktionsmedizin der TiHo in Hannover für die MALDI-Messungen. Peter P. Schmidt und Eckhard Bill vom MPI für Bioanorganische Chemie in Mülheim danke ich für die Erstellung der EPR- und Mössbauer-Spektren und die Hilfe bei der Auswertung. Hubertus Haas danke ich für den freundlicherweise zur Verfügung gestellten Stamm  $\Delta$ SREA.

Vielen Dank an meine Familie für den mentalen Rückhalt und besonders an meine Mutter für die Unterstützung während des Studiums.

Und schließlich danke ich Thomas für die liebevolle Unterstützung und die Fähigkeit, selbst an einem grauen Himmel noch den Regenbogen zu sehen.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe. Die Dissertation wurde nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet und wurde bisher nicht veröffentlicht.

Hannover, 12.09.06

Claudia Maerker



---

## LEBENS LAUF

Name: Claudia Maerker  
 Geburtsdatum: 26.10.1975  
 Geburtsort: Berlin

### Schulbesuch

1982-1988 Walter Gropius Schule Berlin  
 1988-1995 Albert Schweitzer Gymnasium Berlin

### Studium

10/1995 - 6/1998 Humboldt-Universität zu Berlin, Studiengang Biologie,  
 Vordiplom 10/1997  
 10/1998 - 9/2001 Philipps-Universität Marburg, Studiengang Biologie  
 Diplomprüfung 10/2000  
 11/2000-9/2001 Diplomarbeit „Der Methylcitratzyklus in *Escherichia coli*:  
 Katalyse und Expression“, in der Arbeitsgruppe von Prof. W.  
 Buckel, Institut für Mikrobiologie  
 10/2001 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für  
 Mikrobiologie. Beginn der Arbeiten zur Dissertation unter der  
 Anleitung von Dr. Matthias Brock  
 10/2002 Fortsetzung der Dissertation am Institut für Mikrobiologie  
 (Leitung Prof. A. Brakhage) der Universität Hannover in der  
 Arbeitsgruppe von Dr. M. Brock  
 seit 06/2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für  
 Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. - Hans-  
 Knöll-Institut - Jena, in der Gruppe Biochemie/Physiologie  
 filamentöser Pilze (Dr. M. Brock)