

# 酿酒酵母中 NAD 激酶同功酶对偶数位不饱和脂肪酸 $\beta$ -氧化的影响

## The Effect of NAD Kinase Homologues on the $\beta$ -oxidation of Unsaturated Fatty Acids with the Double Bond at an Even Position in *Saccharomyces cerevisiae*

史 锋<sup>1\*</sup> 李永富<sup>2</sup>

SHI Feng<sup>1\*</sup> and LI Yong-Fu<sup>2</sup>

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

2 江南大学食品学院, 无锡 214036

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2 School of Food Science & Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

**摘 要** ATP-NAD 激酶利用 ATP 催化 NAD 磷酸化生成 NADP, 而 ATP-NADH 激酶则催化 NAD 和 NADH 发生磷酸化。酿酒酵母细胞内存在三种 NAD 激酶同功酶: Utr1p, Pos5p 和 Yef1p, 它们都是 ATP-NADH 激酶, 对细胞内 NAD(PH) 的供应起到重要作用。酵母偶数位双键不饱和脂肪酸的  $\beta$ -氧化依赖于过氧化物酶体基质内的 NADPH。通过构建 NAD 激酶基因的单、双基因缺失株, 并验证它们和对照菌株对不饱和脂肪酸的氧化、利用能力, 证实 NAD 激酶同功酶, 尤其是 Pos5p, 对过氧化物酶体基质内 NAD(PH) 的供应起着重要作用, 并推测 NADP 可以从过氧化物酶体膜外转运至过氧化物酶体基质内。

**关键词** NAD 激酶, NADPH, 偶数位不饱和脂肪酸  $\beta$ -氧化, 过氧化物酶体, 酿酒酵母

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0667-05

**Abstract** ATP-NAD kinase phosphorylates NAD to produce NADP by using ATP, whereas ATP-NADH kinase phosphorylates both NAD and NADH. Three NAD kinase homologues, namely, Utr1p, Pos5p and Yef1p, exist in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, which were all confirmed as ATP-NADH kinases and found to be important to supply NAD(PH) for yeast cells. In *S. cerevisiae*, fatty acid  $\beta$ -oxidation is restricted to peroxisomes and peroxisomal NADPH is required for  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids with the double bonds at even positions. Single and double gene disruption strains of NAD kinase genes, i.e., *utr1*, *pos5*, *yef1*, *utr1 yef1*, *utr1 pos5* and *yef1 pos5* were constructed by PCR-targeting method. The utilization ability of these mutants for unsaturated fatty acids with the double bonds at even or uneven positions was examined, with wild type BY4742 as positive control cell, and fatty-acyl-CoA oxidase gene deletion mutant (*fox1*) and peroxisomal NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes gene deletion mutant (*idp3*) as negative control cells. The results indicated that the NAD kinase homologues, especially Pos5p, were critical for supplying NADP and then NADPH in peroxisomal matrix. NADP, which was supplied mainly by Utr1p, Pos5p and Yef1p, particularly by Pos5p, was proposed to be able to transfer from outside of peroxisome into peroxisomal matrix and then converted to NADPH by Idp3p.

**Key words** NAD kinase, NADPH,  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids with the double bond at an even position, peroxisome, *Saccharomyces cerevisiae*

NAD 激酶利用 ATP 和/或无机多磷酸 poly( P )作为磷酸供体 ,催化 NAD 发生磷酸化 ,生成 NADP ,而 NADH 激酶催化 NAD 和 NADH 发生磷酸化 ,生成 NADP 和 NADPH ,这构成了 NADP 生物合成途径的最后一步<sup>[1]</sup> ,而 NADP 是生物体最重要的辅酶和能量携带体之一 ,并且是生物合成反应和抗氧化自我保护的核心。就磷酸供体而言 ,如果只能利用 ATP ,则为 ATP-NAD 激酶<sup>[2]</sup> ;如果既能利用 ATP ,又能利用 poly( P ) ,则为 poly( P )ATP-NAD 激酶<sup>[3]</sup> 。在模式真核生物酿酒酵母( *Saccharomyces cerevisiae* )细胞内存在三种 NAD 激酶同功酶 ,分别为 Utr1p( 由 *UTR1* 基因编码 ) ,Pos5p( 由 *POS5* 基因编码 )和 Yef1p( 由 *YEF1* 基因编码 ) ,它们都被证实为 ATP-NADH 激酶 ,且对酵母细胞内 NADP( H )的供应起着重要作用<sup>[4-6]</sup> 。

酵母的脂肪酸氧化发生在过氧化物酶体内<sup>[7]</sup> 。不饱和脂肪酸在  $\beta$ -氧化过程中 ,除了需要经历连续的脱氢、水化、二次脱氢和硫解四步外 ,还需要  $\Delta^3$ -顺- $\Delta^2$ -反-烯酯酰 CoA 异构酶的作用 ;对于双键在偶数位的不饱和脂肪酸 ,另外还需要酯酰 CoA 氧化酶( Fox1p ,由 *FOX1* 基因编码 )和 NADPH 依赖的 2 ,4-二烯酯酰 CoA 还原酶的作用。已有研究发现存在于过氧化物酶体基质内的异柠檬酸脱氢酶同功酶( Idp3p ,由 *IDP3* 基因编码 )能够有效地提供过氧化物酶体内的 NADPH ,它和 Fox1p 都会显著影响酿酒酵母细胞内偶数位不饱和脂肪酸的  $\beta$ -氧化<sup>[8]</sup> 。

由于偶数位不饱和脂肪酸的  $\beta$ -氧化需要 NADPH 的参与 ,而细胞内 NADPH 的供应主要是通过以 NAD( P )为辅酶的脱氢酶系和 NAD( H )激酶( 图 1 ) ,通过构建 NAD 激酶基因缺失体 ,包括单缺失体 *utr1*、*pos5*、*yef1* 和双缺失体 *utr1yef1*、*utr1pos5*、*yef1pos5* ,并验证它们在以不饱和脂肪酸作为碳源的培养基中的生长表型 ,就可以了解它们对过氧化物

酶体内 NADPH 的供应能力 ,从而能更好地了解酿酒酵母细胞内 NADPH 的供应和转运途径。

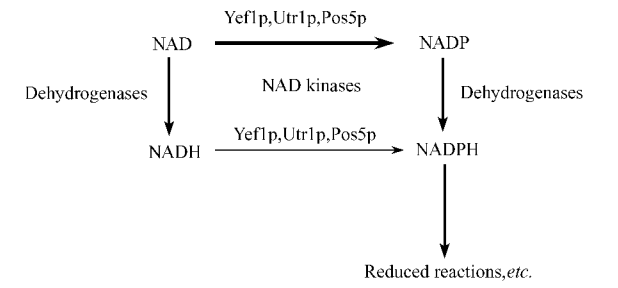


图 1 酿酒酵母内 NAD( H )的合成

Fig.1 Productions of NAD( H ) in *S. cerevisiae*

Bold arrows indicate the predominant functional reaction. Arrows show the weak non-functional reaction.

1 材料和方法

1.1 培养基

预培养基( YPD ) :1% 酵母膏 ,2% 蛋白胨 ,2% 葡萄糖 ,pH5.0 ,0.2mg/mL G418。

不同碳源培养基 :0.3% 酵母膏 ,0.5% 蛋白胨 ,0.5% 磷酸钾缓冲液 ,pH6.0 ,不同碳源( 0.1% 硬脂酸或软脂酸或亚麻酸/0.2% 吐温-40 ,或 2% 葡萄糖 ) ,所需氨基酸。

SD 固体培养基 :0.67% 无氨基酸酵母氮碱 ,2% 葡萄糖 ,2% 琼脂 ,所需氨基酸和抗生素 ,pH5.0。

1.2 酿酒酵母菌株的筛选及培养

实验中所使用的酿酒酵母菌株列于表 1。NAD 激酶基因缺失株的初步筛选采用 SD 选择平板。构建好的各酵母菌株在 YPD 培养基中 30℃ 预培养并洗涤后 ,以终密度  $A_{600} = 0.05$  转移至不同碳源的培养基中培养<sup>[8]</sup> ,并监测其在不同培养时间的生长密度 ,直至达到饱和期。

1.3 NAD 激酶基因缺失株的构建

对照细胞 BY4742 ,NAD 激酶单基因敲除株

表 1 本研究中所用的酿酒酵母菌株

| Table 1 <i>S. cerevisiae</i> strains used in this study |             |               |               |               |               |                     |                   |            |  |
|---|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------------|-------------------|------------|--|
| Strains   |             | Genotypes     |               |               |               |                     |                   | Sources    |  |
| BY4742  | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> |                     |                   | EUROSCARF  |  |
| <i>utr1</i>   | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>utr1::kanMX4</i> |                   | EUROSCARF  |  |
| <i>pos5</i>   | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>pos5::kanMX4</i> |                   | EUROSCARF  |  |
| <i>yef1</i>   | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>yef1::kanMX4</i> |                   | EUROSCARF  |  |
| <i>utr1 yef1</i>  | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>utr1::kanMX4</i> | <i>yef1::HIS3</i> | This study |  |
| <i>utr1 pos5</i>  | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>utr1::kanMX4</i> | <i>pos5::HIS3</i> | This study |  |
| <i>yef1 pos5</i>  | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>yef1::kanMX4</i> | <i>pos5::HIS3</i> | This study |  |
| <i>fox1</i>   | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>fox1::kanMX4</i> |                   | EUROSCARF  |  |
| <i>idp3</i>   | <i>MATa</i> | <i>leu2Δ0</i> | <i>lys2Δ0</i> | <i>ura3Δ0</i> | <i>his3Δ1</i> | <i>idp3::kanMX4</i> |                   | EUROSCARF  |  |

*utr1*、*pos5*、*yef1* 和 *FOX1*、*IDP3* 基因敲除株 *fox1*、*idp3* 来自 EUROSCARK(表 1),NAD 激酶双基因缺失株 *utr1 yef1*、*utr1 pos5*、*yef1 pos5* 采用同源置换法构建<sup>[9]</sup>。以质粒 pFA6a-His3MX6(酿酒酵母基因敲除载体,*HIS3*,氨苄青霉素抗性)<sup>[9]</sup>为模板,*yef1hisf*和 *yef1hisr* 为嵌合引物(表 2),通过 PCR 扩增出两端各带有 *YEF1* 基因上游和下游约 40bp 的嵌合 *HIS3* 基因(*yef1-HIS3*)将此 PCR 扩增产物纯化后转化 *utr1* 细胞<sup>[10]</sup>,以使 *HIS3* 基因置换 *utr1* 细胞染色体上的 *YEF1* 基因,通过 His<sup>-</sup> 平板筛选阳性转化体 *utr1*

*yef1* :*HIS3* ,并经单菌落 PCR 验证后得到双缺失体 *utr1 yef1* ,验证用引物为 *yef1upf*、*pfahis3r*、*pfahis3f* 和 *yef1dnr*(表 2)。用类似的方法,以 pFA6a-His3MX6 为模板,*pos5hisf* 和 *pos5hisr* 为引物(表 2),通过 PCR 扩增出两端各带有 *POS5* 基因上游和下游约 40bp 的嵌合 *HIS3* 基因(*pos5-HIS3*),再分别转化 *utr1* 细胞和 *yef1* 细胞,获得 *utr1 pos5* :*HIS3* 和 *yef1 pos5* :*HIS3* 双缺失体,验证 *POS5* 基因置换的引物为 *pos5upf*、*pfahis3r*、*pfahis3f* 和 *pos5dnr*(表 2)。

表 2 本研究中所用引物  
Table 2 Primers used in this study

| Primers         | Oligo-nucleotide sequences   | Description   |
|-----------------|--|---|
| <i>yef1hisf</i> | 5'-CAATAAATCTGCTTACGTGACATTTTTACT<br>AAAAGAGAAT <b>AT</b> GCCTACGCTGCAGGTCGAC-3' | 41bp upstream of <i>YEF1</i> gene + ATG + 18bp of 5'-MCS of pFA6a-His3MX6   |
| <i>yef1hisr</i> | 5'-GAACCCCTTGACTACGGAAACGCAGGATGTG<br>GGAAATCG <b>TTA</b> ATCGATGAATTCGAGCTCG-3' | 38bp downstream of <i>YEF1</i> gene + TTA + 19bp of 3'-MCS of pFA6a-His3MX6 |
| <i>pos5hisf</i> | 5'-CATAAATAAAAGGATAAAAAGGTTAAGGAT<br>ACTGATTAAAA <b>TG</b> CGTACGCTGCAGGTCGAC-3' | 40bp upstream of <i>POS5</i> gene + ATG + 18bp of 5'-MCS of pFA6a-His3MX6   |
| <i>pos5hisr</i> | 5'-CITAGAGAATCTCATTTGAATCTTTGCATT<br>CAGAGCG <b>TTA</b> ATCGATGAATTCGAGCTCG-3'   | 37bp downstream of <i>POS5</i> gene + TTA + 19bp of 3'-MCS of pFA6a-His3MX6 |
| <i>yef1upf</i>  | 5'-GACTCGCACTTCTGTTTGGACTTATC-3'   | Site of ~ 800bp upstream of <i>YEF1</i> gene                                |
| <i>pfahis3r</i> | 5'-CTGCAGCGAGGAGCCGTAATTTTG-3'   | Site of ~ 200bp downstream of 5'-MCS of pFA6a-His3MX6                       |
| <i>pfahis3f</i> | 5'-GATTCCTGTTTTCAGAAGCTTGTC-3'   | Site of ~ 200bp upstream of 3'-MCS of pFA6a-His3MX6                         |
| <i>yef1dnr</i>  | 5'-CGAATATCTTACATCACAGTTGTTTC-3'   | Site of ~ 800bp downstream of <i>YEF1</i> gene                              |
| <i>pos5upf</i>  | 5'-CGAGCTTTGCCGTATTCTCATTTG-3'   | Site of ~ 800bp upstream of <i>POS5</i> gene                                |
| <i>pos5dnr</i>  | 5'-GGCTCACTTGAATATTATGTGTTTG-3'  | Site of ~ 800bp downstream of <i>POS5</i> gene                              |

The start and stop codons are specified in boldface. The sequence corresponding to the genomic DNA sequence of *S. cerevisiae* is underlined.

2 结果

2.1 突变菌 *fox1* 和 *idp3* 在以脂肪酸作为碳源的培养基中的生长情况

在以葡萄糖、饱和脂肪酸(硬脂酸)、奇数位单不饱和脂肪酸(软脂酸)和偶数位多不饱和脂肪酸(亚麻酸)作为碳源的培养基中,相对于野生型菌株 BY4742,酯酰 CoA 氧化酶基因缺失株 *fox1* 及异柠檬酸脱氢酶同功酶基因缺失株 *idp3* 表现出不同的生长能力,见图 2。

在葡萄糖和硬脂酸培养基中,这两种突变菌都不存在生长缺陷;而在软脂酸培养基中,*fox1* 的生长部分受阻,而 *idp3* 的生长基本正常;在亚麻酸培养基中,*fox1* 菌显示出明显的生长缺陷,表明酯酰 CoA 氧化酶 Fox1p 的缺失造成亚麻酸的  $\beta$ -氧化在其偶数位双键处被迫终止,从而无法有效提供生长所需的碳源;*idp3* 菌也表现出一定的生长缺陷,表明过氧化物酶体基质内的异柠檬酸脱氢酶同功酶 Idp3p 的

缺失,造成过氧化物酶体内 NADPH 的供应量减少,进而影响 NADPH 依赖的 2,4-二烯酯酰 CoA 还原酶活力,使得亚麻酸偶数位双键处的  $\beta$ -氧化速率降低,能量供应减少。

2.2 NAD 激酶基因缺失株在以脂肪酸作为碳源的培养基中的生长情况

在以葡萄糖作为碳源的培养基中,NAD 激酶单基因缺失株 *utr1*、*pos5*、*yef1* 和双基因缺失株 *utr1 yef1*、*utr1 pos5*、*yef1 pos5* 都不存在生长缺陷<sup>[6]</sup>,*fox1* 和 *idp3* 也生长正常(图 2),因此下面我们只验证这六种 NAD 激酶基因敲除株在不同脂肪酸培养基中的生长情况,以 BY4742 作为正对照菌,以 *fox1*、*idp3* 作为负对照菌,结果见图 3。

在硬脂酸培养基中,相对于正负对照菌,六种 NAD 激酶基因缺失株都不存在生长缺陷;在软脂酸培养基中,这六种突变菌的生长也基本正常;但在亚麻酸培养基中,*pos5*、*utr1 pos5*、*yef1 pos5* 菌显示出明显的生长缺陷,甚至低于 *idp3* 菌的生长能力,而快

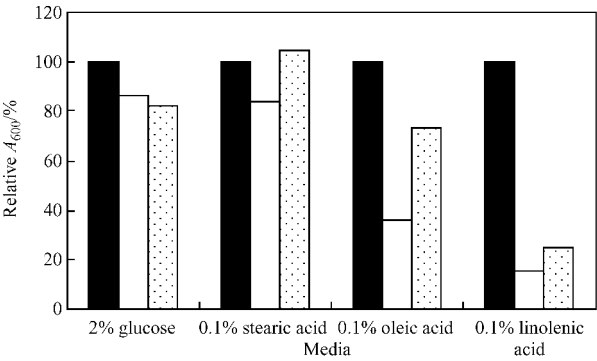


图2 BY4742、*fox1* 和 *idp3* 在不同碳源培养基中生长至饱和态时的相对生长密度

Fig.2 Growth of BY4742, *fox1* and *idp3* cells in different media with indicated carbon sources

BY4742 ( closed bar ), *fox1* ( open bar ) and *idp3* ( dotted bar ) were cultivated in YPD medium to saturation , washed three times in sterilized distill water and inoculated into 3 mL of liquid media with different carbon sources to give an  $A_{600}$  of 0.05. The cells were cultivated aerobically at 30℃ , and their growth was monitored by following  $A_{600}$  . Bars represent the relative  $A_{600}$  ( % ) of the cultures in the stationary phase ( 2% glucose , after 48h ; 0.1% stearic acid , oleic acid , linolenic acid , after 96h ) , taking  $A_{600}$  ( % ) of the BY4742 cell in each medium ( 2% glucose ,  $A_{600}$  of 9.1 ; 0.1% stearic acid ,  $A_{600}$  of 4.4 ; 0.1% oleic acid  $A_{600}$  of 1.9 ; 0.1% linolenic acid ,  $A_{600}$  of 4.9 ) as 100% . Averages of two independent experiments are provided .

接近于 *fox1* 的低水平 , *utr1*、*yef1* 菌没有生长缺陷 ,

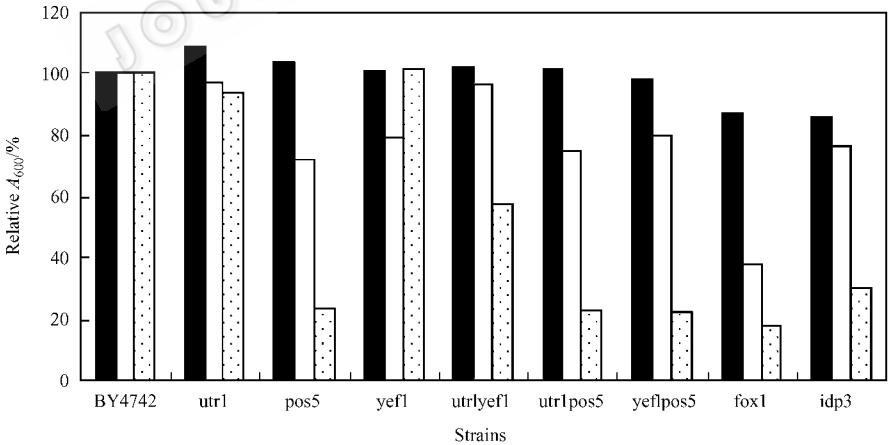


图3 NAD 激酶基因缺失株和对照菌在不同脂肪酸培养基中生长至饱和态时的相对生长密度

Fig.3 Growth of NAD kinase gene deletion mutants and control cells in the media using different fatty acids as the sole carbon sources

NAD kinase gene deletion mutants ( *utr1* , *pos5* , *yef1* , *utr1yef1* , *utr1pos5* and *yef1pos5* ) , positive control cell BY4742 and negative control cell *fox1* and *idp3* were treated and inoculated into 3 mL of liquid media with 0.1% stearic acid ( closed bar ) , 0.1% oleic acid ( open bar ) and 0.1% linolenic acid ( dotted bar ) as the sole carbon sources and then cultivated to follow their  $A_{600}$  as described in Fig.2. Bars represent the relative  $A_{600}$  ( % ) of the cultures in the stationary phase ( 0.1% stearic acid , after 100h ; 0.1% oleic acid , linolenic acid , after 120h ) , taking  $A_{600}$  ( % ) of the BY4742 cell in each medium ( 0.1% stearic acid ,  $A_{600}$  of 4.7 ; 0.1% oleic acid  $A_{600}$  of 2.3 ; 0.1% linolenic acid ,  $A_{600}$  of 5.8 ) as 100% . Averages of two independent experiments are provided .

而 *utr1yef1* 双基因缺失体的生长就有部分受阻。这表明 NAD 激酶同功酶之一——Pos5p 是过氧化物酶体内 NAD( H )的一个重要供应者 ,其对过氧化物酶体基质内 NADPH 的供应能力甚至超过 Idp3p ;而另外两个 NAD 激酶同功酶——Utr1p 和 Yef1p 只能提供部分 NAD( H )给过氧化物酶体 ,它们的单方面缺失不会影响过氧化物酶体内 NADPH 的有效含量 ,但当它们两者都缺失后 ,会使 NAD( H )的供应发生部分障碍。

由于 Pos5p、Utr1p、Yef1p 都不存在于过氧化物酶体内 ,它们催化产生的 NAD( H )分别处于线粒体基质<sup>[5,11]</sup>和胞质内<sup>[6]</sup> ,而酿酒酵母中脂肪酸的氧化和利用发生在过氧化物酶体内 ,即亚麻酸偶数位不饱和和双键的  $\beta$ -氧化需要过氧化物酶体基质内的 NADPH ,因此推测 NAD( H )可以从过氧化物酶体的膜外跨膜进入过氧化物酶体基质内 ,此转运过程可能是直接或者通过膜上的转运蛋白完成的。由于 *idp3* 菌在亚麻酸培养基中存在生长缺陷 ,即即使存在 Pos5p、Utr1p 和 Yef1p ,也不能有效地供应过氧化物酶体基质内的 NADPH ,因此 Pos5p、Utr1p 和 Yef1p 在细胞内主要以 NAD 激酶形式存在 ,其 NADH 激酶活性较弱 ,或者是 NADP 可以跨膜转运 ,而 NADPH 无法有效转运。与此相关的 NAD( H )合成、转运途径推测如图 4 所示。

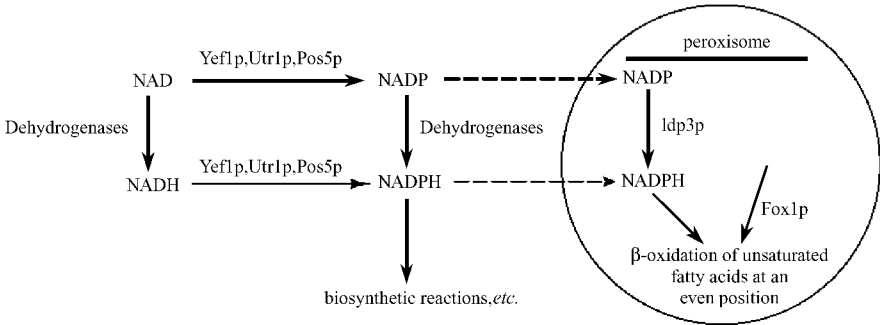


图 4 酿酒酵母内与偶数位不饱和脂肪酸  $\beta$ -氧化相关的 NAD(P)H 的合成和转运途径

Fig.4 Productions and flows of NAD(P)H according to the  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids with the double bond at even position in *S. cerevisiae*

Bold arrows indicate the predominant reaction. Arrows show the weak reaction. Dotted arrows present the putative reactions.

3 结论

酿酒酵母过氧化物酶体基质内 NADPH 的供应主要来自于 NAD 激酶( Pos5p、Utr1p 和 Yef1p ,尤其是 Pos5p 和 Idp3p 的作用 ,前者提供基质内的 NADP ,再经后者产生 NADPH ,而过氧化物酶体基质内的 NADPH 是偶数位不饱和脂肪酸  $\beta$ -氧化所必需的。

REFERENCES( 参考文献 )

[ 1 ] McGuinness ET , Bulter JR. NAD kinase—a review. *Int J Biochem* , 1985 , **17** :1 – 11

[ 2 ] Kawai S , Mori S , Mukai T , Hashimoto W , Murata K. Molecular characterization of *Escherichia coli* NAD kinase. *Eur J Biochem* , 2001 , **268** :4359 – 4365

[ 3 ] Kawai S , Mori S , Mukai T , Suzuki S , Hashimoto W , Tamada T , Murata K. Inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase of *Micrococcus flavus* and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Biochem Biophys Res Commun* , 2000 , **276** :57 – 63

[ 4 ] Kawai S , Mori S , Suzuki S , Murata K. Molecular cloning and identification of UTR1 of a yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a gene encoding an NAD kinase. *FEMS Microbiol Lett* , 2001 , **200** :181 – 184

[ 5 ] Outten CE , Culotta VC. A novel NADH kinase is the mitochondrial

source of NADPH in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* , 2003 , **22** :2015 – 2024

[ 6 ] Shi F , Kawai S , Mori S , Kono E , Murata K. Identification of ATP-NADH kinase isozymes and their contribution to supply of NADP (H) in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* , 2005 , **272** ( 13 ) :3337 – 3349

[ 7 ] Kunau WH , Buhne S , De la Garza MM , Kionka C , Mateblowski M , Schultz-Borchard U , Thieringer R. Comparative enzymology of beta-oxidation. *Biochem Soc Trans* , 1988 , **16** :418 – 420

[ 8 ] van Roermund CWT , Hettema EH , Kal AJ , van den Berg M , Tabak HF , Wanders RJA. Peroxisomal  $\beta$ -oxidation of polyunsaturated fatty acids in *Saccharomyces cerevisiae* : isocitrate dehydrogenase provides NADPH for reduction of double bonds at even positions. *EMBO J* , 1998 , **17** :677 – 687

[ 9 ] Wach A , Brachet A , Alberti-Segui C , Rebischung C , Philippsen P. Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* , 1997 , **13** :1065 – 1075

[ 10 ] Gietz RD , Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/ polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* , 2002 , **350** :87 – 96

[ 11 ] Strand MK , Stuart GR , Longley MJ , Graziewicz MA , Dominick OC , Copeland WC. *POS5* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a mitochondrial NADH kinase required for stability of mitochondrial DNA. *Eukaryot Cell* , 2003 , **2** :809 – 820