



**Identifizierung und Charakterisierung von
Biogeneseproteinen der
NADH:Ubichinon Oxidoreduktase in dem
Hyphenpilz *Neurospora crassa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Veronika Ilona Solotoff
aus Düsseldorf

Düsseldorf, 2011

Aus dem Institut für Biochemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Ulrich Schulte
Koreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.06.2011

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	1
2.1 Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung	1
2.2 Die molekulare Architektur des Komplex I	4
2.3 Assemblierung des Komplex I	11
2.3.1 Assemblierungsfaktoren des Komplex I	15
2.4 Bedeutung von Pentatricopeptid-Repeat-Proteinen für die mitochondriale Biogenese	19
2.5 <i>Neurospora crassa</i> als Modellorganismus	21
2.5.1 Gezielte Geninaktivierung in <i>N. crassa</i>	26
2.5.2 Das mitochondriale Genom von <i>Neurospora crassa</i>	29
2.6 Ziel der Arbeit	31
3 Material und Methoden	33
3.1 Mikroorganismen	33
3.2 Plasmide	33
3.3 Oligonukleotide	33
3.4 Medien und Lösungen	34
3.5 DNA-Präparationen (Isolierung, Restriktion und Ligation)	40
3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	41
3.6.1 Analytische PCR zum Nachweis von DNA-Sequenzen	42
3.6.2 PCR zur Erzeugung der DNA-Matrizen für die radioaktive Markierung.....	43
3.7 Klonierungsstrategie verschiedener DNA-Sequenzen	43
3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.9 Western Blot Analyse	47
3.10 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	48
3.10.1 Transformation von <i>E. coli</i>	49
3.11 Arbeiten an <i>Neurospora crassa</i>	49
3.11.1 Kultivierung von <i>N. crassa</i>	49
3.11.2 Transformation von <i>N. crassa</i>	50
3.11.3 Erzeugung von Mikrokonidien.....	51
3.12 Charakterisierung der <i>Neurospora crassa</i> Deletionsmutanten	51
3.12.1 Mitochondrienisolierung aus <i>N. crassa</i> – kleiner Maßstab	51
3.12.2 Mitochondrienpräparation aus <i>N. crassa</i> – großer Maßstab	52
3.12.3 Proteinbestimmung nach Biuret.....	52
3.12.4 Enzymatische Überprüfung der NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität	53
3.12.5 BlauNativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
3.12.6 Cytochrombestimmung.....	54
3.12.7 Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie	55
3.12.8 Massenspektrometrie	56
3.13 Charakterisierung des RNA-Metabolismus	57
3.13.1 Isolierung von RNA	57
3.13.2 Native RNA-Gelelektrophorese.....	57
3.13.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	58
3.13.4 Northern Blotting	58
3.13.5 Markierung der DNA-Sonden für die Northern Blot-Hybridisierung	59
3.13.6 In-vivo Markierung der mitochondrial kodierten Proteine.....	59
3.13.7 Immunoprecipitation	60

4 Ergebnisse	61
4.1 Eingrenzung und Identifizierung essentieller Proteine für die Komplex I-Biogenese	61
4.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten	65
4.2.1 Erzeugung von Komplementationsmutanten	72
4.2.2 Deletionsmutante 11632.....	77
4.2.3 Deletionsmutante 13958.....	81
4.2.4 Deletionsmutante 13999.....	86
4.2.5 Die Deletionsmutanten 17876 und 19806.....	88
4.2.6 Deletionsmutante 21221.....	93
4.3 Untersuchung der Bedeutung von Pentatricopeptid-Repeat-Proteinen für die Komplex I-Biogenese	96
4.3.1 Die Deletionsmutanten 20112 und 20449.....	98
4.3.1.1 Heterologe Expression der PPR-Genen aus <i>N. crassa</i> in <i>E. coli</i>	101
4.4 Beeinflussung der mitochondrialen Genexpression durch Komplex I-spezifische Biogenesefaktoren	104
4.4.1 Mitochondriale Transkription von Komplex I-Untereinheiten	105
4.4.1.1 Transkript ND4 und ND1.....	105
4.4.1.2 Transkript ND2 und ND3.....	109
4.4.1.3 Transkript ND5 und ND4L	110
4.4.1.4 Transkript COX3 und ND6.....	112
4.4.1.5 Transkript COB und ATP6	113
4.4.2 Detektion mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskette	115
4.4.2.1 Immunopräzipitation der Atmungskettenkomplexe I und III	117
5 Diskussion	120
5.1 Identifizierung von Komplex I-Biogeneseproteinen	120
5.1.1 Differentieller Genomvergleich zur Eingrenzung potentieller Biogeneseproteine.....	121
5.1.2 Identifizierung von Biogenesefaktoren durch Untersuchung der PPR-Proteinfamilie.....	126
5.2 Eignung des Modellorganismus <i>Neurospora crassa</i> für die Identifizierung von Komplex I Biogenesefaktoren	127
5.3 Einfluss der identifizierten Biogeneseproteine auf die NADH:Ubiquinone Oxidoreduktase	130
5.4 Bedeutung der PPR-Proteine für die mitochondriale Proteinsynthese von Komplex I-Untereinheiten	133
5.5 Funktionelle Charakterisierung der Biogeneseproteine	135
5.6 Ausblick	137
6 Literaturverzeichnis	139

1 Zusammenfassung

Die Relevanz einer intakten NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, dem Komplex I der Atmungskette, wurde eindrucksvoll durch die Aufklärung ihrer Rolle in degenerativen Krankheiten bestätigt. Dabei sind nicht nur die Untereinheiten des Enzyms erforderlich, sondern auch Biogenesefaktoren, die nicht Bestandteil des reifen Komplex I sind. Im Vergleich zu den übrigen Atmungskettenkomplexen ist über diese Proteine wenig bekannt und aufgeklärt. In der Literatur sind zwölf Proteine mit einer Funktion für den Komplex I bekannt, jedoch sind aufgrund der hohen Anzahl an Untereinheiten, ihres dualgenetischen Ursprungs und der erforderlichen prosthetischen Gruppen weitere Biogeneseproteine anzunehmen.

Zur Identifizierung solcher Proteine für den Komplex I wurde in dieser Arbeit ein differentieller Genomvergleich zur Eingrenzung potentieller Kandidaten durchgeführt. Hierbei wurde nach Genen gesucht, die mit der Präsenz des Komplex I in verschiedenen Hefen korrelierten. Es war dadurch möglich die Gesamtzahl von 10.000 proteinkodierenden Genen in dem verwendeten Modellorganismus *Neurospora crassa* auf 491 Gene mit einer potentiellen Bedeutung für die Assemblierung des Komplex I einzugrenzen. Die Relevanz dieser Gene für die Biogenese des Komplex I wurde anhand der Auswirkung ihrer Deletion bestimmt. Es wurden 248 Deletionsmutanten untersucht, von denen sieben einen spezifischen Einfluss auf den Komplex I zeigten.

Ergänzend zu diesem Ansatz wurden die Pentatricopeptid-Repeat-Proteine (PPR) in *N. crassa* aufgrund ihrer Relevanz für den RNA-Metabolismus in Organellen untersucht. Von acht Proteinen dieser Proteinfamilie zeigten zwei einen spezifischen Einfluss auf den Komplex I.

Die phänotypische Ausprägung der Gendeletionen stellte sich in einem weitgehenden Verlust eines intakten Komplex I und in der Anreicherung von Assemblierungsintermediaten dar.

Der Verlust von zwei PPR-Proteinen ergab Veränderungen in der Prozessierung mitochondrialer RNA. Anhand von Northern Blots wurde der spezifische Einfluss auf einzelne mitochondrial kodierte Komplex I-Untereinheiten nachgewiesen. Die unterschiedliche Präsenz der sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten im Proteom unterstrich den spezifischen Einfluss beider PPR-Proteine auf die Synthese dieser Proteine und damit der Biogenese des Komplex I.

Summary

The relevance of an intact NADH:ubiquinone oxidoreductase, complex I of the respiratory chain, was confirmed in an impressive way through the clarification of its role in degenerative diseases. Not only the subunits of the enzyme are required to demonstrate this, but also biogenesis factors, which are not part of the mature complex I. In comparison to the other respiratory chain complexes little about this protein is known and clarified. Twelve proteins with a function for complex I are known in literature, but the existence of more biogenesis factors is assumed due to the high number of subunits, their dual genetic origin and the required prosthetic groups.

For the identification of such proteins for complex I a differential comparison of genomes was made in this thesis to localise potential candidates. A screening of genes which correlate with the presence of complex I in different kinds of yeast was performed for this purpose. This process made it possible to reduce the total number of 10.000 protein coding genes in the model organism *Neurospora crassa* down to 491 genes with a potential importance for the assembly of complex I. The relevance of these genes for the biogenesis of complex I was determined by the impact of their knockout. Seven out of a total of 248 knockout mutants studied indicated a specific influence on complex I.

In addition to this approach the pentatricopeptide repeat proteins (PPR) in *Neurospora crassa* were examined due to their relevance to the metabolism of the RNA in organelles. Two of eight proteins of this protein family indicated a specific influence on complex I.

The phenotypical specification of the gene knockouts were characterized by a comprehensive loss of an intact complex I and the accumulation of assembly intermediates.

The loss of two PPR proteins resulted in changes in the processing of mitochondrial RNA. The specific impact on single mitochondrially encoded complex I subunits was demonstrated by means of Northern blots. The difference in the presence of the seven mitochondrially encoded subunits in the proteome emphasized the specific influence of both PPR proteins on the synthesis of these proteins and therefore the biogenesis of complex I.

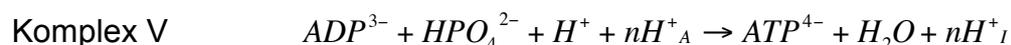
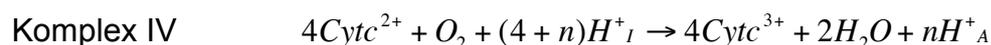
2 Einleitung

2.1 Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung

Die oxidative Phosphorylierung ist der letzte Schritt im abbauenden Stoffwechsel (Katabolismus) aller aeroben Lebewesen und dient der Gewinnung von Adenosintriphosphat (ATP), welches als universeller Energieträger bei vielen zellulären Prozessen notwendig ist. Die in der Glykolyse und Citratzyklus erzeugten Reduktionsäquivalente (hauptsächlich NADH) dienen zur Reduktion von Sauerstoff, wobei Wasser entsteht. Die Energie dieser Reaktion, welche einer Knallgasreaktion entspricht, wird über die Kopplung des exergonen Elektronentransports von NADH zu molekularem Sauerstoff mit der endergonen Translokation von Protonen aus der inneren Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum in einem elektrochemischen Membranpotentials gespeichert. Dieses nutzt die ATP-Synthase, um beim Rückfluss der Protonen durch eine Drehbewegung ATP aus ADP und Phosphat zu generieren (Mitchell 1961; Mitchell 1976; Abrahams, Leslie et al. 1994).

An diesem Prozess beteiligt sind vier Enzymkomplexe, die in der inneren Mitochondrienmembran in Eukaryoten und in der Zellmembran bei Prokaryoten lokalisiert sind. Die ersten drei Komplexe bilden die Atmungskette. Hierzu gehören die Komplexe NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Ubichinol:Cytochrom c-Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV). Die ATP-Synthase oder F_0F_1 – ATP Synthase (Komplex V) bildet den letzten Komplex in der oxidativen Phosphorylierung.

Die katalysierten Reaktionen sind in den folgenden Gleichungen zusammengefasst:



Q_{10} = Ubichinon-10, $Q_{10}H_2$ = Ubichinol-10, Cyt c = Cytochrom c, I = negativ geladene Innenseite der Membran, A = positiv geladene Außenseite der Membran, oberhalb der gestrichelten Linie sind die Reaktionen der Atmungskette aufgeführt, unterhalb die ATP-Synthase durch den Komplex V

Die Anzahl der von der Cytochrom c-Oxidase transportierten Protonen pro umgesetztes Elektron ist bei Eukaryoten variabel (Capitanio, Capitanio et al. 1991; Papa, Capitanio et al. 1991; Frank und Kadenbach 1996; Michel 1999), jedoch im Falle von Prokaryoten konstant $1 \text{ H}^+ / \text{e}^-$ (Solioz, Carafoli et al. 1982).

Die Reduktion von Ubichinon findet auch im Citratzyklus durch die Succinat:Ubichinon-Reduktase (Komplex II) und im Rahmen der β -Oxidation von Fettsäuren durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase statt, jedoch tragen diese Enzyme nicht zum Aufbau des Protonengradienten bei und gehören demnach nicht dem System der oxidativen Phosphorylierung an.

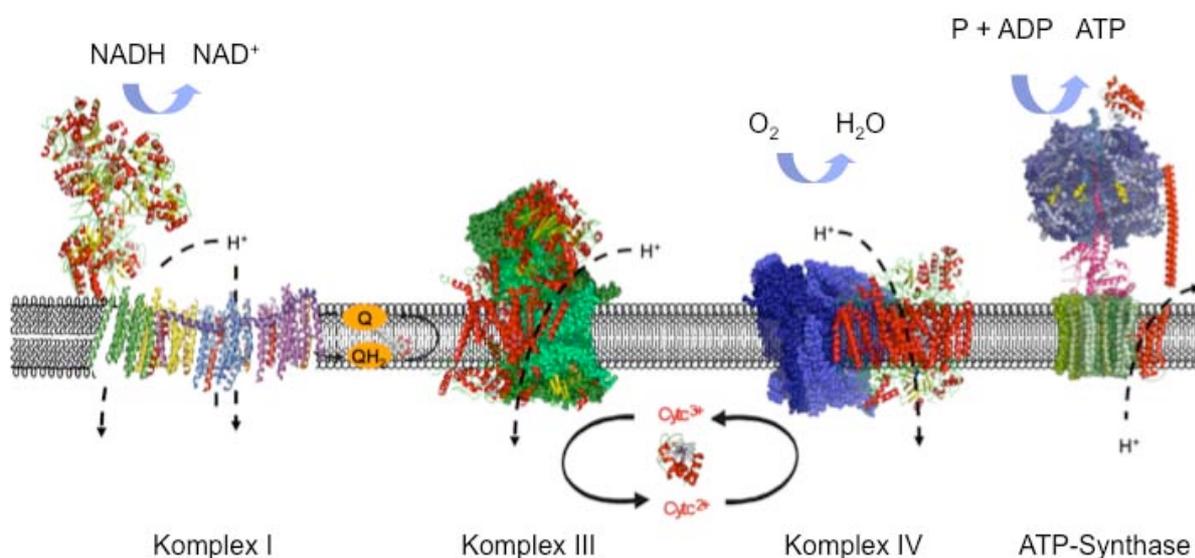


Abb. 2.1: Die Enzymkomplexe und Reaktionen der oxidativen Phosphorylierung. Die Strukturen der Komplexe stammen aus Röntgenbeugungsdaten und sind der Proteindatenbank PDB als Bändermodell entnommen. Im Falle der Dimere Komplex III und IV ist ein Monomer als Bänder-, das andere Monomer als Kugelmodell dargestellt. Die Struktur des Komplex I stammt aus den einzelnen bestimmten Kristallstrukturen des prokaryotischen Membranarms aus *Escherichia coli* (Efremov, Baradaran et al. 2010) und des peripheren Arms aus *Thermus thermophilus* (Sazanov und Hincliffe 2006). Q steht für Ubichinon, QH₂ für Ubichinol und Cyt c für Cytochrom c.

Ein tiefes Verständnis in die Funktionen und molekularen Mechanismen von Proteinen und Proteinkomplexen liefert die Aufklärung der Struktur durch Röntgenbeugung am Proteinkristall. Die Strukturen der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung liegen mittlerweile für den Komplex III (Xia, Yu et al. 1997; Iwata, Lee et al. 1998; Zhang, Huang et al. 1998; Hunte, Koepke et al. 2000), den Komplex IV (Iwata, Ostermeier et al. 1995; Tsukihara, Aoyama et al. 1996) und Komplex V (Abrahams, Leslie et al. 1994; Meier, Polzer et al. 2005) seit mehreren Jahren vor, der pro- und eukaryotische Komplex I folgte begründet auf seiner Größe und der

Schwierigkeit der Kristallanzucht im Jahr 2006 mit der röntgenographischen Auflösung des peripheren Arms (Sazanov und Hinchliffe 2006) und im Jahr 2010 wurden sowohl der Membranarm wie auch der gesamte Komplex I aufgeklärt (Efremov, Baradaran et al. 2010; Hunte, Zickermann et al. 2010).

Die Komplexe der Atmungskette befinden sich nicht frei verteilt innerhalb der inneren Mitochondrienmembran in Eukaryoten bzw. prokaryotischen Zellmembran, vielmehr liegen sie in so genannten Superkomplexen gemeinsam lokalisiert vor. Die Ausbildung dieser Superkomplexe wurde in vielen Organismen nachgewiesen, sowohl in Prokaryoten wie *Paracoccus denitrificans* oder *Corynebacterium glutamicum* (Berry und Trumpower 1985; Niebisch und Bott 2003; Stroh, Anderka et al. 2004) wie auch in Eukaryoten. Als Beispiel lassen sich hier die Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Arnold, Pfeiffer et al. 1998; Cruciat, Brunner et al. 2000), Respirasomen in verschiedenen Pflanzen (Eubel, Heinemeyer et al. 2004; Krause, Reifschneider et al. 2004; Dudkina, Eubel et al. 2005) und ebenfalls *Bos taurus* als Vertreter der Säugetiere nennen (Schagger und Pfeiffer 2000). Demnach ist eine generell konservierte Funktion der Superkomplexe evident.

Die Funktion dieser Akkumulation der Atmungskettenkomplexe soll einen effizienteren Elektronentransport zwischen den Enzymen ermöglichen, welches auch als Substrachannelling bezeichnet wird. Hierbei kann auch von einer Erhöhung der katalytischen Aktivität durch Reduktion der Diffusionsstrecken und -zeiten ausgegangen werden („Catalytic enhancement“) (Schagger 2002; Genova, Bianchi et al. 2003). Weitere spekulative Funktionen können die Stabilität und Assemblierungsunterstützung der einzelnen Atmungskettenkomplexe durch die anderen Komplexe erhöhen, wie es für den Komplex I beobachtet worden ist (Acin-Perez und Bayona-Bafaluy 2004; Diaz, Fukui et al. 2006; McKenzie, Lazarou et al. 2006; Marques, Dencher et al. 2007). Studien in *N. crassa* zeigten sowohl die Existenz von Komplex I-Dimeren wie auch Superkomplexen aus Komplex I/III/IV und Komplex III/IV in verschiedenen stöchiometrischen Zusammensetzungen mit einer Relevanz für die Komplex I-Stabilität (Marques, Dencher et al. 2007). Eine Komplex III – Mangelmutante in *N. crassa* zeigt sowohl einen aktiven Komplex I wie auch IV auf, jedoch mit einer Induzierung der Alternativen Oxidase (AOX). Des Weiteren sind hierbei Komplex I und IV – Dimere und Komplex I/IV - Superkomplexe nachweisbar, welche eine Assoziation mit der AOX demonstrieren. Die Bedeutung dieser

Interaktion lässt sich mit dem heutigen Kenntnisstand nicht eruieren (Duarte und Videira 2009). Die dritte hypothetische Funktion von Superkomplexen kann die Vermeidung beziehungsweise Eliminierung reaktiver Intermediate und Sauerstoffspezies sein (Smeitink, van den Heuvel et al. 2001). Dies scheint aufgrund der Existenz von Ubisemichinon essentiell zu sein, da es sonst bei einer Reaktion mit Sauerstoff zur Bildung von Superoxidradikalen kommt (Kotlyar, Sled et al. 1990). Des Weiteren spielt beispielsweise die ATP Synthase eine Rolle in der Ausbildung der mitochondrialen Morphologie der Cristae, was auch auf Superkomplexe zutreffen kann (Paumard, Vaillier et al. 2002).

Erste Nachweise, dass Superkomplexe wirklich funktionelle und strukturelle Einheiten aus einzelnen Atmungskettenkomplexen darstellen und in Anwesenheit von Ubichinon und Cytochrom c autonom Atmung betreiben können, wurde durch den Nachweis der Reduktion von Sauerstoff bei isolierten Superkomplexen erbracht (Acin-Perez, Fernandez-Silva et al. 2008). In diesem Zusammenhang lassen sich Superkomplexe auch als Respirasomen bezeichnen.

2.2 Die molekulare Architektur des Komplex I

Der erste Komplex der Atmungskette katalysiert die Oxidation des NADH unter Reduktion des Ubichinons mit der Translokation von Protonen über die prokaryotische Cytoplasma- bzw. eukaryotische Mitochondrienmembran. Der Komplex I trägt also zum Aufbau des für die ATP-Synthese notwendigen Protonengradienten bei.

Der Atmungskettenkomplex I kommt in den Membranen von Mitochondrien der meisten Eukaryoten sowie in vielen Bakterien vor. In Archaeobakterien wurde er bislang nicht gefunden. Die Mindestzahl an Untereinheiten für ein funktionsfähiges Enzym beträgt zwischen 13-15 (in Bakterien) und wird in diesen Fällen auch als Minimalform bezeichnet (Yagi und Matsuno-Yagi 2003; Hinchliffe, Carroll et al. 2006); in höheren Organismen (z.B. *Bos taurus*) sind es jedoch bis zu 46 Untereinheiten durch die Existenz zusätzlicher, sogenannter akzessorischer Untereinheiten (Carroll, Fearnley et al. 2003; Hirst, Carroll et al. 2003; Gabaldon, Rainey et al. 2005). Die Bedeutung der akzessorischen Untereinheiten erscheint sehr mannigfaltig. Eine Rolle bei der Vermeidung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch die Bildung eines isolierenden Gerüsts um die Minimalform wird ebenso

vermutet (Robinson 1998) wie die erleichterte Ausbildung von Superkomplexen durch oberflächige Interaktionsstellen (Budde, van den Heuvel et al. 2000). Fehlende akzessorische Untereinheiten führen teilweise zum assemblierten, jedoch inaktiven Komplex I wie im Falle der 40 kDa- Untereinheit, die Homologie zu Reduktase/Isomerasen Familie und ein fest gebundenes NAD(P)H aufweist (Fearnley und Walker 1992; Schulte, Haupt et al. 1999). Regulationsmechanismen für die Aktivität des Komplex I zeigen sich durch die Möglichkeit der Phosphorylierung von Serinen in bestimmten Untereinheiten (Chen, Fearnley et al. 2004; Yadava und Scheffler 2004) und die Möglichkeit der Erleichterung der Assemblierung von FeS-Zentren (Videira 1998; Cardol, Vanrobaeys et al. 2004).

Die Gesamtmasse des Enzyms beträgt je nach Organismus 500-1000 kDa. Damit gehört der Komplex zu den größten bekannten Enzymen. Bekannte Cofaktoren befinden sich im peripheren Arm, wie das Flavinmononukleotid und 7-9 Eisen-Schwefel-Cluster. Der Komplex ähnelt dem Buchstaben "L". Ein Arm des "L" ragt in das Innere der Mitochondrien bzw. Bakterien, der andere Arm liegt in der Membran.

Die molekulare Struktur des Komplex I und dadurch die Möglichkeit nicht nur den Aufbau, sondern auch den Mechanismus dieses diffizilen Proteinkomplexes aufzuklären, erfolgte zunächst nicht für den gesamten Proteinkomplex, sondern die beiden Bereiche des peripheren Arms und des Membranarms wurden getrennt voneinander kristallisiert und die hieraus gewonnenen Informationen für den Vorgang des „molecular replacements“ in die Elektronendichteverteilung für die Aufklärung des prokaryotischen Komplex I aus *T. thermophilus* mit einer Auflösung von 4,5 Å genutzt (Sazanov und Hinchliffe 2006; Efremov, Baradaran et al. 2010; Hunte, Zickermann et al. 2010).

Der periphere Arm konnte hochaufgelöst mit 2,8 Å strukturell aufgeklärt werden, welcher aus dem Prokaryoten *Thermus thermophilus* isoliert wurde und insgesamt mit 14 Untereinheiten zu der Minimalform des Komplex I gezählt werden kann (Sazanov und Hinchliffe 2006). Der periphere Arm besitzt eine Y-förmige Struktur mit einer Höhe von 140 Å und beinhaltet neun sichtbare FeS-Cluster. Der nicht kovalent gebundene Elektronenakzeptor Flavinmononukleotid (FMN) befindet sich in der Nähe einer zugängigen NADH-Bindestelle, von wo der Elektronentransport entlang der FeS-Cluster N3, N1b, N4, N5, N6a, N6b und N2 über eine Gesamtlänge von 84 Å katalysiert werden kann. Der FeS-Cluster N1a könnte in Kooperation mit dem nahe

gelegenen FMN als Radikalfänger für am FMN entstehende reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dienen, hierbei wird davon ausgegangen, dass das zweite Elektron von NADH zunächst auf N1a übertragen wird (Hinchliffe und Sazanov 2005; Sazanov 2007). Des Weiteren liegt N7 zu weit vom postulierten Elektronenweg entfernt, um an diesem Prozess beteiligt sein zu können, da die maximale Distanz für einen physiologischen Elektronentransfer bei 14 Å liegt (Page, Moser et al. 1999). Als mögliche Kontaktstelle zwischen den beiden Armen des Komplex I ließ sich die 25 Å große amphiphatische α -Helix H1 vermuten, welche an der Untereinheit Nqo6 lokalisiert ist (Sazanov und Hinchliffe 2006).

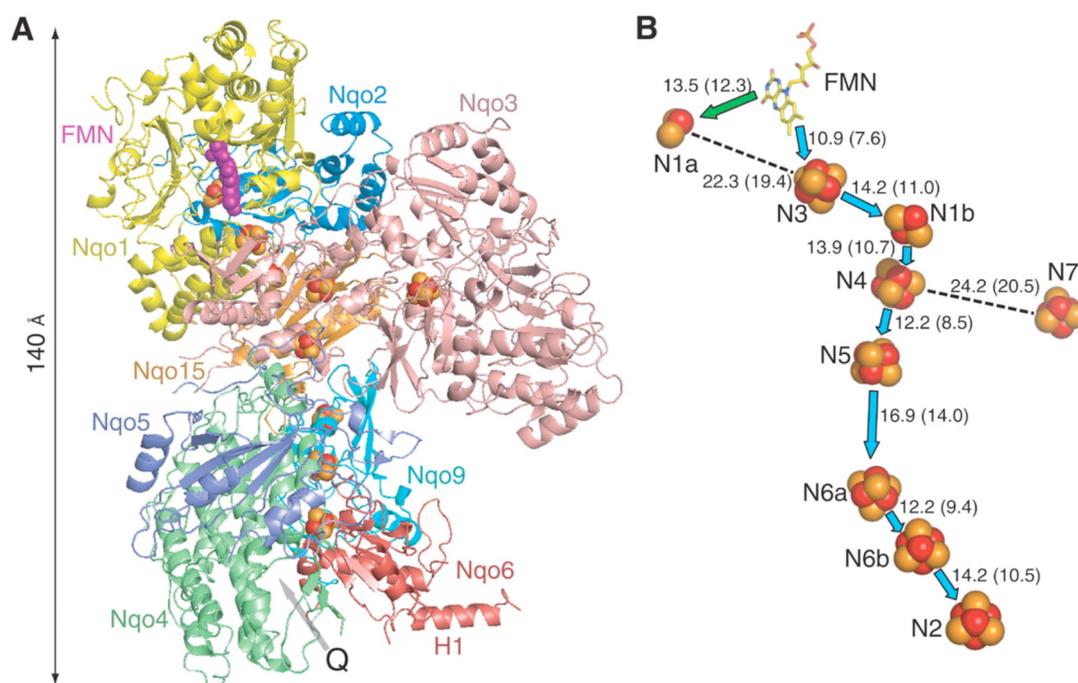


Abb. 2.2: Kristallstruktur und Elektronenweg des peripheren Arms des Komplex I aus *T. thermophilus*. (a) Proteinogene Untereinheiten sind als Bändermodell dargestellt und mit der Bezeichnung der Untereinheiten Nqo1-6, 9 und 15 aus *T. thermophilus* versehen. Das FMN wird als violette, die FeS-Zentren als rot-gelbe Kugeln dargestellt. Die mutmaßliche Ubichinon-Bindestelle ist durch ein Q gekennzeichnet. (b) Anordnung der Redoxzentren. Der Elektronenweg mit den beteiligten Redoxzentren FMN und acht FeS-Zentren ist durch blaue Pfeile gekennzeichnet. Die Distanz zwischen den Zentren ist in Angstrom vom jeweiligen Mittelpunkt (in Klammern von Außenkante zu Außenkante) angegeben (Sazanov und Hinchliffe 2006).

Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen wurde der isolierte Membranarm des Komplex I von *E. coli* mit einer Auflösung von 3,9 Å gelöst. Die Kristallstruktur zeigte

die Anordnung der sechs Untereinheiten NuoL/M/N/A/J/K (NuoH war nicht Bestandteil des Kristalls) mit einer Gesamtmasse von 222kDa und 55 Transmembranhelices. Begründet durch die Auflösung ließen sich Positionen der Helices bestimmen, nicht jedoch ihre Konnektivität zueinander. Demzufolge wurden Strukturannahmen getroffen. Die angrenzende Position der Untereinheiten NuoA/J/K am peripheren Arm ließ sich durch bisherige Untersuchungen annehmen (Kao, Matsuno-Yagi et al. 2004; Kao, Di Bernardo et al. 2005; Kao, Nakamaru-Ogiso et al. 2005). Es zeigte sich ein dreifach wiederkehrendes Muster aus 14 Transmembranhelices, welche den drei Untereinheiten NuoL, NuoM und NuoN zugeordnet werden konnten, da diese sowohl zueinander einen hohen Grad an Homologie als auch zur Proteinfamilie der Antiporter aufweisen. Die Überlagerung der postulierten Strukturen zeigt eine gute Übereinstimmung, vor allem die Existenz von jeweils zwei diskontinuierlicher Helices pro Untereinheit. Sie wurden als relevante Strukturelemente für den Mechanismus der Protonentranslokation postuliert (Efremov, Baradaran et al. 2010).

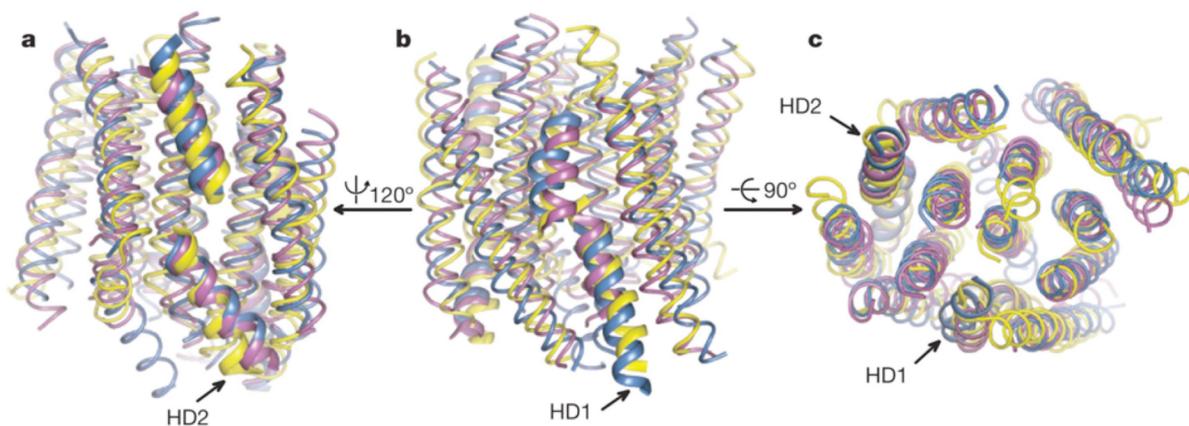


Abb. 2.3: Alignment der Antiporter-homologen Untereinheiten NuoL, NuoM und NuoN aus *E. coli*. NuoN ist gelb, NuoM blau und NuoL violett dargestellt. (a) und (b) zeigen die überlagerten Untereinheiten senkrecht zur Membranebene, oberhalb ist die cytosolische Seite. (c) Blick vom Cytosol in die Membranebene. Die diskontinuierlichen Helices (HD1 ist der Helix HL zugewandt, HD2 ca. 70° hiervon entfernt) sind durch breitere Bänder hervorgehoben (Efremov, Baradaran et al. 2010).

Die übrigen 11 Helices wurden demnach den Untereinheiten NuoA/J/K zugeordnet, jedoch ohne Möglichkeit der weiteren Differenzierung. Auffällig war die Existenz einer Verlängerung der Untereinheit NuoL in die Helix HL, welche als signifikante Strukturbesonderheit bezeichnet werden kann. Die Lage dieser Helix zeigte sich

entlang der Membranebene mit Kontakt zu jeweils einer diskontinuierlichen Transmembranhelix der Untereinheiten NuoL/M/N (Efremov, Baradaran et al. 2010).

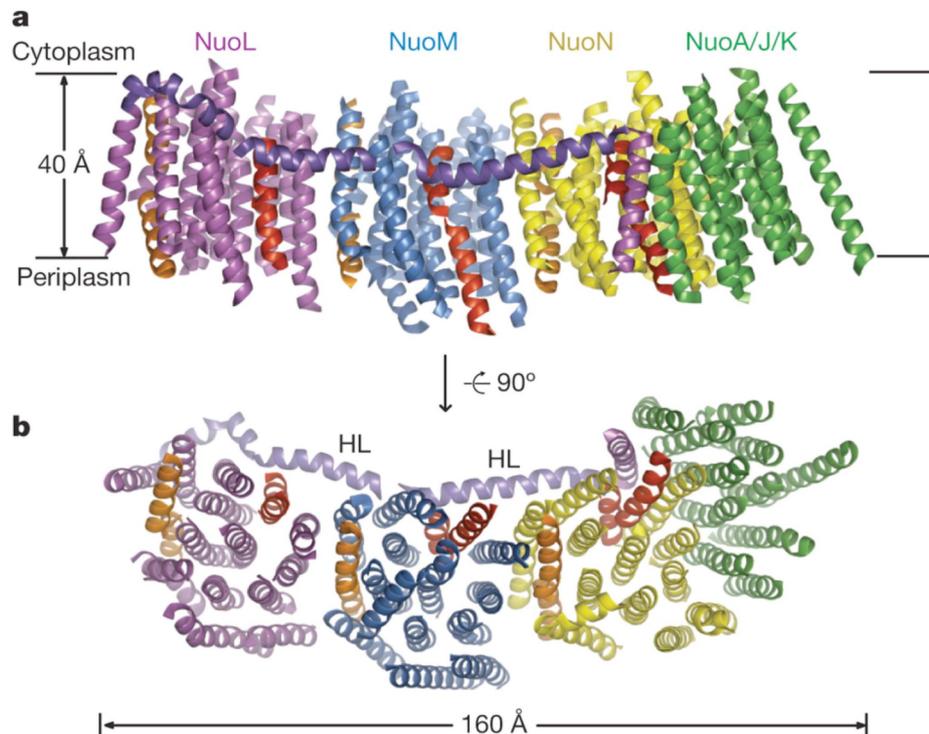


Abb. 2.4: Das α -helikale Modell des Membranarms aus *E. coli*. (a) Seitenansicht senkrecht zur Membranebene. (b) Blick vom Periplasma senkrecht in die Membranebene. Die Farbunterschiede weisen auf unterschiedliche Untereinheiten hin. Die Verlängerung HL der Untereinheit NuoL ist dunkelviolett dargestellt und zeigt eine Lokalisierung entlang der Membranebene senkrecht zu den übrigen Helices. Die diskontinuierlichen Helices der Untereinheiten NuoL, M und N in Kontakt mit der Helix HL sind rot dargestellt, die hiervon abgewandten orange (Efremov, Baradaran et al. 2010).

Inzwischen existiert auch die aufgelöste Struktur des gesamten Komplex I aus *T. thermophilus* mit einer Auflösung von 4,5 Å, welche nicht die hochaufgelöste Molekülstruktur sichtbar machte, jedoch als Basis für die Modellierung der bekannten Struktur des peripheren Arms und des α -helikalen Modells des Membranarms in die sichtbare Elektronendichteverteilung zuließ (Efremov, Baradaran et al. 2010). Die in der Struktur des bestimmten Membranarms fehlende Untereinheit NuoH (in der Nomenklatur von *T. thermophilus* Nqo8) konnte zusammen mit NuoA/J/K als Kontaktbereich mit dem peripheren Arm identifiziert werden, jedoch aufgrund der nicht ausreichenden Auflösung war dieser Bereich nicht weiter charakterisierbar. Die Position der Ubichinon-Bindestelle lässt sich aus den gegebenen Daten nicht final eruieren. Die maximale Distanz zum FeS-Zentrum N2 von 14 Å für einen

physiologischen Elektronentransport (Page, Moser et al. 1999) ist nur durch eine Bewegung des hydrophoben Ubichinons aus der Membran möglich, mutmaßlich entlang einer hydrophoben „Rampe“ im peripheren Arm (Efremov, Baradaran et al. 2010).

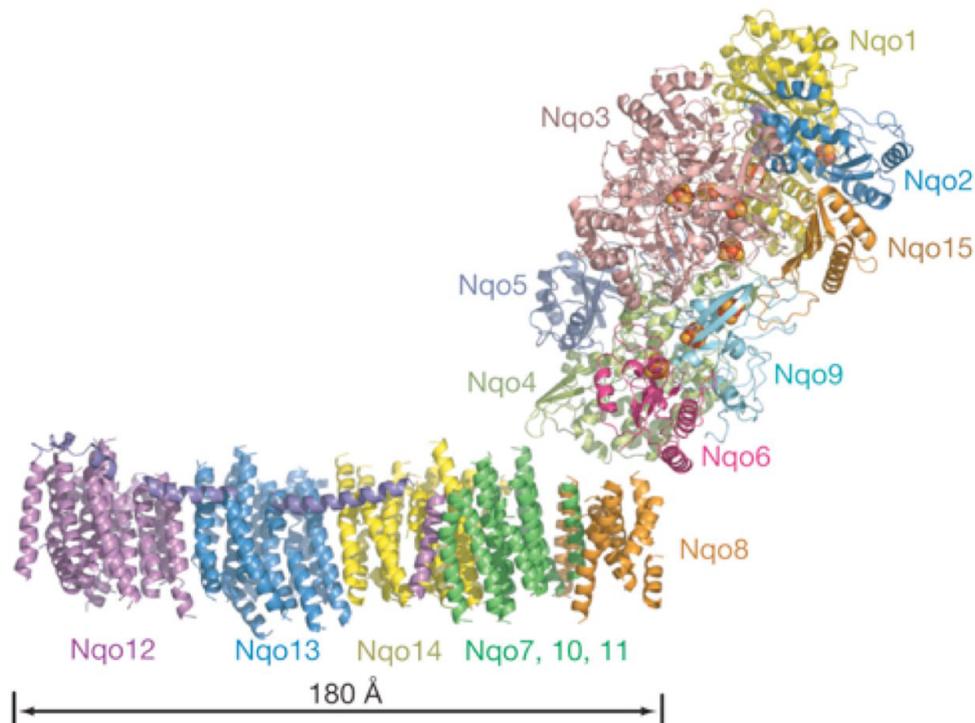


Abb. 2.5: Die Architektur des Komplex I aus *T. thermophilus*. Diese Struktur stammt aus der zuvor bestimmten Kristallstruktur für den peripheren Arm aus *T. thermophilus* (Sazanov und Hinchliffe 2006) und dem α -helikalen Modell für den Membranarm aus *E. coli*. Eingebettet in das Bändermodell sind die Redoxzentren im peripheren Arm, die kugelförmig dargestellt sind. Die Bezeichnung der Untereinheiten erfolgt nach der Nomenklatur in *T. thermophilus* (Efremov, Baradaran et al. 2010).

Erste Bestätigung der Relevanz und Konservierung dieser Struktur fand sich in der Kristallstruktur des mitochondrialen Komplex I aus *Yarrowia lipolytica* mit insgesamt 40 bekannten Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 950 kDa. Diese weist die bekannte L-Struktur des Komplex I mit einem 100° Winkel zwischen peripherem und Membranarm auf. Die Länge des Membranarms ließ sich mit 180 \AA und die des peripheren Arms mit 190 \AA bestimmen. Die gebogene Form des Membranarms ist der Mitochondrienmatrix zugewendet. Der Membranarm zeigte insgesamt 71 Transmembranhelices mit der gleichen strukturellen Besonderheit einer Helix, die entlang der Membranebene lokalisiert ist. Dies deutet auf den gleichen Mechanismus wie der prokaryotische Komplex I hin (Hunte, Zickermann et al. 2010).

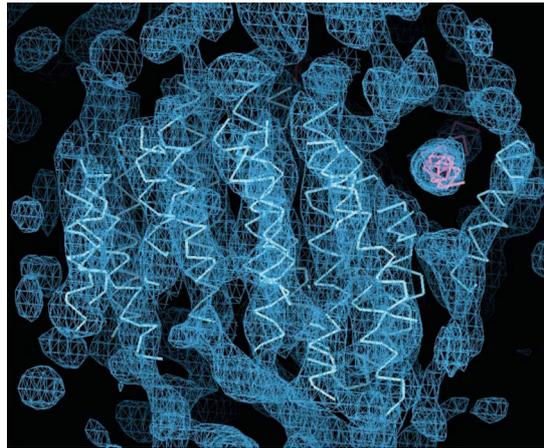


Abb. 2.6: Ausschnitt aus der Kristallstruktur des mitochondrialen Komplex I aus *Y. lipolytica*. Gezeigt ist der Blick in die Membranebene vom äußersten Ende des Membranans parallel zur Helix HL, die entlang der Membranebene lokalisiert ist. Die ersten helicalen Strukturen wurden in die Elektronendichten eingepasst (Hunte, Zickermann et al. 2010).

Der Kopplungsmechanismus der Komplex I zwischen der Redoxreaktion und der Potontentranslokation kann nun auf Basis der Strukturdaten diskutiert werden. Konformationelle Änderungen im Bereich der Untereinheiten NuoA/J/K/H können zu einer Bewegung der Helix HL führen. Diese wiederum kann aufgrund ihrer Lage zu den diskontinuierlichen Helices der Antiporter-ähnlichen Untereinheiten NuoL/M/N eine Translokation von mutmaßlich 3 Protonen durch eine Bewegung hervorrufen. Hierbei können negativ geladene Untereinheiten innerhalb der diskontinuierlichen Helices eine Rolle spielen. Durch diesen Mechanismus kann die Translokation von drei Protonen erklärt werden, das vierte Proton bei dem bestimmten $4 \text{ H}^+ / 2 \text{ e}^-$ -Verhältnis ist bisher nicht offensichtlich.

Analog zu der bildhaften Bezeichnung der ATP Synthase als Turbine kann der Komplex I mit der Helix HL, welche allegorisch als Kupplungsstange bezeichnet werden kann, als Dampfmaschine betitelt werden (Efremov, Baradaran et al. 2010; Ohnishi 2010). Der Mechanismus lässt eine Translokation durch konformationelle Änderungen für zumindest drei Protonen postulieren, welche in der Vergangenheit auch aufgrund der K^+/H^+ - oder Na^+/H^+ -Antiporter Homologien der NuoL/M/N Untereinheiten angenommen wurde (Fearnley und Walker 1992; Mathiesen und Hagerhall 2003; Ohnishi und Salerno 2005). Für das vierte Proton lässt sich ein direkter, redoxgetriebener Kopplungsmechanismus vermuten (Friedrich 2001; Kashani-Poor, Zwicker et al. 2001; Sazanov und Hinchliffe 2006)

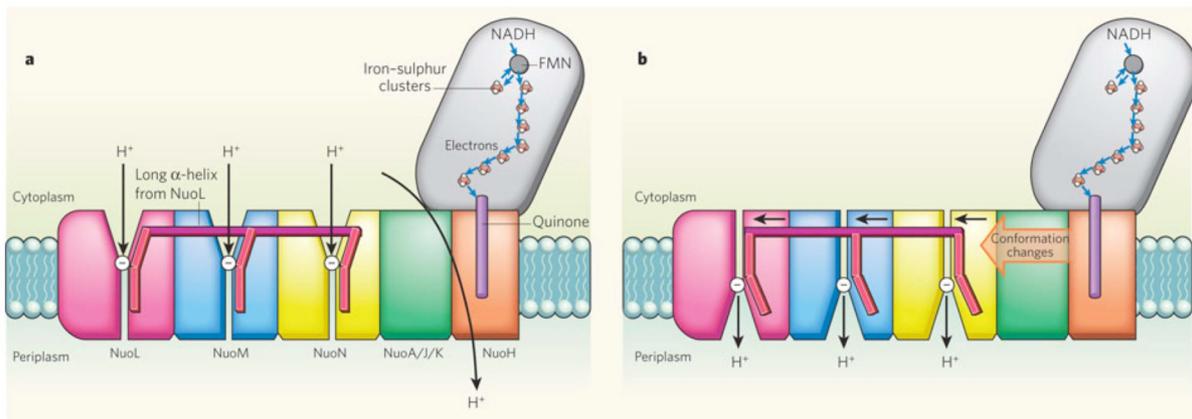


Abb. 2.7: Postulierter Mechanismus des Komplex I. Der periphere Arm ist grau dargestellt mit den eingebetteten Redoxzentren und dem Elektronentransfer. Die Untereinheiten NuoL/M/N sind in hellpink, blau und gelb mit den orange dargestellten diskontinuierlichen Helices und negativ geladenen Aminosäuren dargestellt. Die Ubichinonbindestelle ist dunkelviolett. Die verlängerte Helix HL der Untereinheit NuoL ist pink markiert. (a) Die zum Cytoplasma geöffneten Antiporter-ähnlichen Untereinheiten ermöglichen die Bindung von Protonen durch negativ geladene Aminosäuren. (b) Eine Konformationsänderung in der Nähe des peripheren Arms bewirkt eine Bewegung der Helix HL, wodurch die Antiporter-ähnlichen Untereinheiten durch Interaktion mit den diskontinuierlichen Helices sich zum Periplasma öffnen und hierbei die Protonen entlassen werden (Ohnishi 2010).

2.3 Assemblierung des Komplex I

Die Assemblierung des Komplex I bestätigt zum heutigen Kenntnisstand die modulare Evolutionstheorie (Friedrich und Weiss 1997), da unabhängig vom jeweils betrachteten Organismus die Assemblierung über die Kombination größerer Vorstufen modulartig verläuft und keine einzelne Addition von Untereinheiten erfolgt. Hierbei wird von den drei postulierten Funktionen des Komplex I ausgegangen, dem Dehydrogenasemodul (zur Elektronenaufnahme), dem Hydrogenasemodul (für den Elektronentransport) und dem Transportmodul für die Translokation der Protonen über die Membran (Friedrich und Weiss 1997). Jedoch zeigten sich in den untersuchten Organismen bisher unterschiedliche Zwischenstufen in der Assemblierung, deren Bedeutung bislang als noch nicht aufgeklärt erscheinen.

Die ersten Studien zur Assemblierung des Komplex I wurden in *Neurospora crassa* durchgeführt. Die Verwendung von Deletionsmutanten und *pulse-chase*-Markierungen führten zu der Erkenntnis, dass der periphere Arm unabhängig vom Membranarm assembliert und abschließend zum reifen Komplex I zusammengebaut wird. Der Membranarm seinerseits entsteht aus einer großen und kleinen Membranarmvorstufe (Tuschen, Sackmann et al. 1990; Nehls, Friedrich et al. 1992;

Schulte, Fecke et al. 1994). Hierbei traten im Assemblierungsintermediat des großen Membranarms zwei Hilfsproteine auf, welche im reifen Komplex I nicht mehr nachweisbar waren. Ihre Bezeichnungen CIA30 und CIA84 beziehen sich auf ihre molekulare Masse und ihre Funktion als *complex I intermediate associated protein* (Kuffner, Rohr et al. 1998).

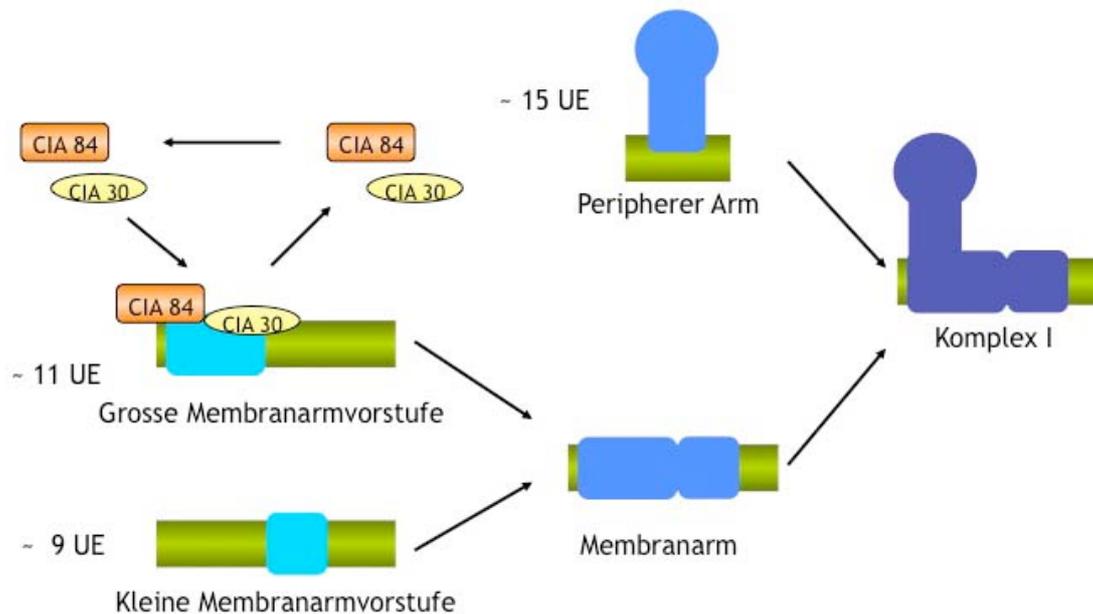


Abb. 2.8: Assemblierungsmodell des Atmungskettenkomplex I in *N. crassa*. Die unabhängige Bildung des Membranarms aus zwei Vorstufen und des peripheren Arms mit der finalen Zusammenführung zum Komplex I ist schematisch dargestellt (Schulte 2001).

Mit Ausnahme der fünf Untereinheiten mit 51 kDa, 40 kDa, 24 kDa, 21 kDa und 21.3b kDa (nachfolgend als Deletionsmutante mit der Bezeichnung ihres Molekulargewichtes in Kombination mit *nuo* für NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase genannt) führen Defekte in Untereinheiten zu einer Akkumulation des jeweils anderen Arms. Die Mutanten *nuo51*, *nuo40*, *nuo24*, *nuo21* und *nuo21.3b* zeigen einen vollständig assemblierten Komplex I unter Mangel der jeweiligen Untereinheit bei vollständiger NADH-Oxidase-Aktivität mit Ausnahme der inaktiven Mutanten *nuo51* und *nuo21.3b* (Alves und Videira 1994; Fecke, Sled et al. 1994; Ferreirinha, Duarte et al. 1999; Schulte, Haupt et al. 1999). Eine Ausnahme bilden die Untereinheiten 9.6 kDa des peripheren Arms und der 9.8 kDa Untereinheit des

Membranarms. Hier zeigt sich ebenfalls eine Beeinträchtigung bei der Assemblierung des anderen Arms (Schneider, Massow et al. 1995; Marques, Duarte et al. 2003).

Im Widerspruch hierzu steht das 2003 anhand von Patienten mit klinisch manifestiertem Komplex I Defekt entwickelte Modell, welches aufgrund detektierbarer Komplex I Fragmente postuliert wurde. Das Assemblierungsmodell beschreibt hierbei die Assemblierung von zwei Modulen des peripheren Arms und eine frühzeitige Verankerung eines Moduls des peripheren Arms mit Teilen des Membranarms. Zusammenfassend zeigten sich sieben Intermediate, die eine Kombination aus Untereinheiten des peripheren und des Membranarms aufweisen (Antonicka, Ogilvie et al. 2003). Den Assemblierungsweg mit funktionalen Modulen ähnlich dem Modell in *N. crassa* zeigte eine Studie mit humanen Zelllinien unter Inhibierung der mitochondrialen Proteinsynthese und Verfolgung der Assemblierungsintermediate (Ugalde, Vogel et al. 2004). Die mit dem GFP-Protein (Grün fluoreszierendes Protein) fusionierte humane Untereinheit NDUFS3 (homolog zur Untereinheit nuo28.6 in *N. crassa*) zeigte sechs Intermediate in der Assemblierung des kompletten Komplex I mit einer eindeutigen Abhängigkeit von der Existenz mitochondrialer Untereinheiten im dritten Schritt. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Membranverankerung des Assemblierungsintermediates mit membranständigen Untereinheiten postuliert (Vogel, Dieteren et al. 2007).

Der aktuelle Konsens zur Assemblierung des Komplex I umfasst die frühe Verankerung eines Assemblierungsintermediates des peripheren Arms (sogenanntes Q Modul) mit der mitochondrial kodierten und membranständigen ND1 Untereinheit unter Beteiligung einiger ebenfalls membranständiger Untereinheiten. Hieran erfolgt die Expansion sowohl des Q wie auch des P Moduls durch den Anbau weiterer Untereinheiten oder Assemblierungsintermediate. Als einer der finalen Schritte erscheint die Addition des N Moduls an das distale Ende des peripheren Armes. Ein Austausch bereits assemblierter Untereinheiten gegen neu synthetisierte war detektierbar und dient vermutlich der Reparatur von Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (Lazarou, McKenzie et al. 2007; Lazarou, Thorburn et al. 2009).

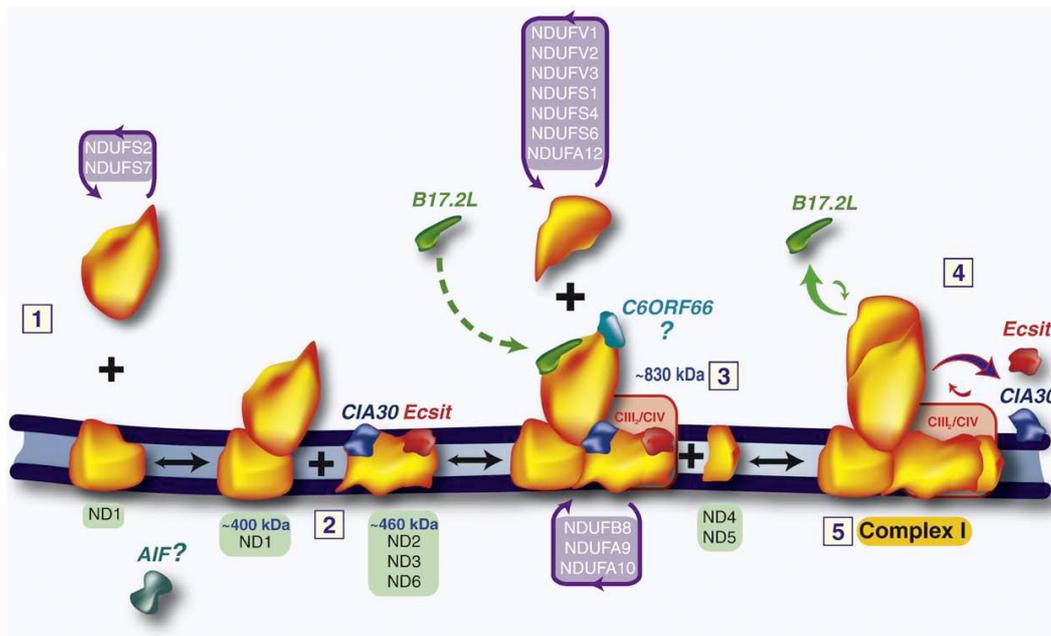


Abb. 2.9: Assemblierungsmodell des Atmungskettenkomplex I in *H. sapiens*. Der modulare Aufbau aus verschiedenen Intermediaten unter Beteiligung bisher bekannter Assemblierungsfaktoren wird dargestellt. Die Eintrittspunkte verschiedener Untereinheiten sind markiert (Lazarou, Thorburn et al. 2009).

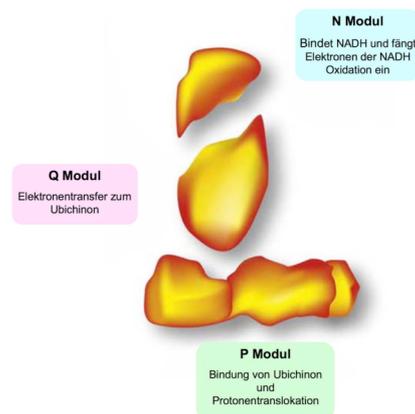


Abb. 2.10: Bezeichnung der Module N, Q und P mit ihren Funktionen in *H. sapiens*. Die Darstellung wurde verändert und übersetzt übernommen aus (Lazarou, Thorburn et al. 2009).

Bestätigung findet das postulierte Assemblierungsmodell in der Nachverfolgung der Eintrittspunkte der mitochondrial kodierten Untereinheiten in die Assemblierungsintermediate in Zelllinien von *M. musculus*. Als erste war die Untereinheit ND1 (in einem Intermediat mit einer molekularen Masse von ~400-kDa und Untereinheiten des peripheren Arms) detektierbar, gefolgt von ND2, ND3 und ND4L im nächsten Schritt (~460-kDa). Hiernach ließ sich ND4 detektieren, gefolgt von ND6 und als fünften und finalem Eintrittspunkt der mitochondrial kodierten Untereinheiten ND5 (Perales-Clemente, Fernandez-Vizarra et al. 2010).

Der modulare Aufbau des Komplex I lässt sich in allen Spezies bestätigen, jedoch sind Unterschiede feststellbar. Hierbei tritt besonders hervor, dass die vollständige Assemblierung jeweils des peripheren Arms und des Membranarms mit einer abschließenden Fusion sich nur in *N. crassa* zeigte. Studien im Menschen und anderen Säugetieren wiesen eine frühe Verankerung eines Intermediats des peripheren Arms mit Teilen des Membranarms auf, wonach die weitere zumeist modulare Assemblierung anschließt. Die Ursache ist unklar, wobei auch die Validität der Assemblierungsmodelle für verschiedenste Organismen in Frage gestellt werden muss. Letztendlich stellt sich die Frage, ob die Evolution dieses Enzyms und seiner Assemblierung einmalig manifestiert wurde und nur noch in Details verändert worden ist, oder ob man von einer limitierten Übertragbarkeit aufgrund evolutionärer Divergenzen zwischen den Organismen ausgehen muss.

2.3.1 Assemblierungsfaktoren des Komplex I

Bis zum heutigen Tage konnte eine Fülle von verschiedenartigen Assemblierungsfaktoren für den Komplex I in diversen Organismen identifiziert werden.

Die Chaperone CIA30 und CIA84 wurden als essentielle Assemblierungsfaktoren für die Formation der großen Membranarmvorstufe in *N. crassa* entdeckt (Kuffner, Rohr et al. 1998; Schulte 2001). Die Konservierung der Funktion dieser Chaperone nicht nur in Pilzen, sondern ebenfalls in der Assemblierung des Komplex I in Säugetieren wurde nicht nur *in vitro* sondern auch durch die klinische Relevanz des zum CIA30 homologen menschlichen NDUFAF1 nachgewiesen (Vogel, Janssen et al. 2005; Dunning, McKenzie et al. 2007). Ein homologes Protein zum CIA84 Protein aus *N. crassa* im Menschen wurde postuliert, jedoch noch nicht durch *in vivo* oder *in vitro* Studien belegt (Gabaldon, Rainey et al. 2005).

In der Hefe *Yarrowia lipolytica* führt die Deletion des Ind1 Gens zu einem deutlich reduzierten Komplex I Gehalt der Mitochondrien. Eine Sequenzähnlichkeit zu bekannten Fe-S-Cluster Assemblierungsproteinen wie Nbp35 lässt die Erfordernis dieses Proteins für die Vielzahl an Fe-S-Clustern im peripheren Arm annehmen, welche in menschlichen HeLa Zelllinien verifiziert werden konnten und damit die Konservierung dieser Funktion in einer Vielzahl an Komplex I nutzenden Organismen annehmen lässt (Bych, Kerscher et al. 2008; Sheftel, Stehling et al. 2009).

Anhand eines Genomvergleichs verschiedener Hefen wurden durch Subtraktion der Genome von Hefen mit und ohne Komplex I Gene ausgesucht, die mit der Präsenz des Atmungskettenkomplex I korrelierten. Hierbei wurde das zur Komplex I Untereinheit B17.2 paraloge B17.2L Protein sowohl identifiziert wie auch in seiner essentiellen und spezifischen Bedeutung für die Komplex I Assemblierung in vivo charakterisiert (Ogilvie, Kennaway et al. 2005; Vogel, van den Brand et al. 2007).

Eine Ausweitung des Genomvergleichs führte zur Bestimmung des Proteins C8orf38 als möglichem Assemblierungsfaktor. Hiernach ließ sich die klinische Relevanz in einem Patienten bestätigen. Die Identifizierung einer möglichen Phytoene-Synthase Domäne lässt Spekulationen über eine Bedeutung dieses Proteins im Metabolismus verzweigter Lipide zu (Pagliarini, Calvo et al. 2008).

Die Identifizierung relevanter Biogenesefaktoren für den Komplex I lieferten in den vergangenen 5 Jahren vermehrt Patienten mit isolierten Komplex I-Defekten, in deren Genom eine Mutation in bisher unbekannt Genen verifiziert werden konnte. Hierbei aufzuführen sind die Gene C20orf7, C6orf66 und C3orf60.

Die klinische Relevanz des menschlichen Proteins C20orf7 für die Assemblierung des Komplex I manifestierte sich in einem Patienten, dessen defektes C20orf7 Protein nachweislich in einem Assemblierungsschritt mit der mitochondrial kodierten ND1 Untereinheit einer Membranarmvorstufe involviert ist. Die genaue Funktionsweise dieses Proteins ist nicht aufgeklärt, jedoch lässt eine vorhersagbare S-Adenosyl-Methionin abhängige Methyltransferase-Domäne eine Relevanz in einem Methylierungsschritt mutmaßen (Sugiana, Pagliarini et al. 2008).

Das Protein C6orf66 (NDUFAF4 Bezeichnung in *H. sapiens*) zeigte sich spezifisch für den Komplex I Defekt in Patienten verantwortlich, welche keine Beeinträchtigungen der anderen Atmungskettenkomplexe aufwiesen. Bemerkenswert bei diesem Protein sind die nachweisbar erhöhten Expressionsraten in invasiven Brustkrebszellen, welche zum heutigen Kenntnisstand in keinem bekannten Zusammenhang mit der Funktion für die Komplex I-Assemblierung zu stehen scheinen (Saada, Edvardson et al. 2008).

C6orf66 interagiert mit dem Assemblierungsfaktor C3orf60 (NDUFAF3 Bezeichnung in *H. sapiens*), dessen Relevanz für den Komplex I in betroffenen Patienten evident wurde. Hierbei wird von einer Beteiligung in frühen Stadien der Translation von mitochondrial kodierten Komplex I Untereinheiten oder ihrer Assemblierung ausgegangen, des Weiteren zeigte sich eine Interaktion mit den Untereinheiten

NDUFS2 (nuo49) und NDUFS3 (nuo30), welche in einem frühen Assemblierungsintermediat vorliegen (Saada, Vogel et al. 2009).

Proteine mit bekannten zusätzlichen Funktionen wie der Assemblierung von Atmungskettenkomplexen zeigten sich für die AIF, Ecsit und Prohibitin.

Das Flavoprotein AIF (*Apoptose-inducing factor*) transloziert bei der Induktion der Apoptose vom Mitochondrium zum Nukleus und interagiert mit der DNA. Hierbei ist es nachweislich für die Chromatin Kondensation und Chromatinolyse mitverantwortlich, welches Apoptose auslösende Prozesse sind. Die Spezifität von AIF für den Komplex I zeigte sich sowohl in vitro wie auch in vivo in Mäusen, jedoch mit einer Beschränkung auf bestimmte Organe (Hirn und Retina). Hier ist eine deutliche Reduktion des Komplex I Gehaltes detektierbar. Eine zelluläre Aufklärung der Bedeutung des AIF Proteins auf den Komplex I steht weiterhin aus (Vahsen, Cande et al. 2004).

Das Protein Ecsit (*Evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway*) spielt in der Immunantwort über einen Einfluss auf die Toll-like-Rezeptoren Signalkaskade und im BMP (bone morphogenetic protein) Signalweg der Embryogenese für die Mesodermausbildung in *Mus musculus* eine nachweisbare Rolle. Zusätzlich konnte seine Interaktion mit dem humanen CIA30 Protein nachgewiesen und damit die Bedeutung für die Komplex I-Assemblierung aufgezeigt werden. Die zielgerichtete Abschaltung von Ecsit über RNA-Interferenz offenbarte eine deutliche Abnahme an humanem CIA30 und Komplex I mit einer Akkumulierung an Assemblierungsintermediaten (Vogel, Janssen et al. 2007).

Die bisher bekannten Funktionen der hochkonservierten membranständigen Proteine der Prohibitin Proteinfamilie bezogen sich auf Regulationsaufgaben in der Zellproliferation (sowohl positive wie negative Regulationseffekte wurden in verschiedenen Zelltypen und Organismen nachgewiesen) und Tumorsuppression. Die Bedeutung für die Komplex I Assemblierung war durch die Assoziierung des Prohibitin Proteins in einem Komplex I Subkomplex mit den Untereinheiten 23, 30 und 49 kDa evident. Die Funktionsweise als Chaperon für die Assemblierung beruht auf Spekulationen und benötigt weitere experimentelle Verifizierungen (Bourges, Ramus et al. 2004).

Die Acyl-CoA Dehydrogenase 9 (ACAD9) weist nach der gezielten Abschaltung durch RNA-Interferenz in HEK293 Zellen einen spezifischen Komplex I Mangel bei gleichzeitig intakten übrigen Komplexen der oxidativen Phosphorylierung auf.

Zusätzlich wurde eine Abnahme der detektierbaren Proteinmenge der beiden Komplex I Hilfsproteine Ecsit und NDUFAF1 festgestellt. Entgegen der Annahme, dass aufgrund der Homologie zu dem humanen Protein VLCAD (very long-chain acyl-CoA dehydrogenase) eine Funktion für den Stoffwechsel langkettiger Fettsäuren anzunehmen ist, zeigen die ACAD9 Mutanten einen normalen β -Oxidation Fettsäurestoffwechsel. Dieses Beispiel zeigt die Möglichkeit auf, dass trotz eines hohen Homologiegrades zwischen Proteinen eine Divergenz in deren molekularen Funktionen möglich ist (Zhang, Zhang et al. 2002; Nouws, Nijtmans et al. 2010).

Tab. 2.1: Identifizierte Proteine mit Einfluss auf die Assemblierung des Komplex I.

Bezeichnung Protein	Alternative Bezeichnung <i>H. sapiens</i>	Erste Identifikation	Funktionsweise	Literatur
CIA30	NDUFAF1	<i>N. crassa</i>	Assoziation am Assemblierungsintermediat der großen Membranarmvorstufe, klinische Relevanz bestätigt	(Kuffner, Rohr et al. 1998; Vogel, Janssen et al. 2005; Dunning, McKenzie et al. 2007)
CIA84	(PTCD1)	<i>N. crassa</i>	Assoziation am Assemblierungsintermediat der großen Membranarmvorstufe	(Kuffner, Rohr et al. 1998)
B17.2L	NDUFAF2	<i>H. sapiens</i>	Assoziation an spätem Assemblierungsintermediat	(Ogilvie, Kennaway et al. 2005)
C3orf60	NDUFAF3	<i>H. sapiens</i>	Interaktion mit C6orf66, Einfluss auf mitochondrial kodierte Untereinheiten oder ihre Assemblierung	(Saada, Vogel et al. 2009)
C6orf66	NDUFAF4	<i>H. sapiens</i>	Interaktion mit C3orf60, Notwendigkeit in frühem Assemblierungsschritt	(Saada, Edvardson et al. 2008)
C20orf7		<i>H. sapiens</i>	Interaktion in Assemblierungsschritt unter Beteiligung von ND1, SAM-Methyltransferase Domäne	(Sugiana, Pagliarini et al. 2008)
C8orf38		<i>H. sapiens</i>	Einfluss auf Komplex I Gehalt, mögliche Phytoene-Synthase Domäne	(Pagliarini, Calvo et al. 2008)
AIF		<i>M. musculus</i>	Deutliche Reduktion des Komplex I Gehaltes	(Vahsen, Cande et al. 2004)
Ecsit		<i>H. sapiens</i> (HEK293 und HeLa Zellen)	Interaktion mit humanem CIA30	(Vogel, Janssen et al. 2007)
Ind1		<i>Y. lipolytica</i>	Einfluss auf Komplex I Gehalt, mögliche Funktion in FeS-Cluster Assemblierung	(Bych, Kerscher et al. 2008; Sheffel, Stehling et al. 2009)
Prohibitin		<i>H. sapiens</i> (CRL8303 Zellen)	Assoziation mit Assemblierungsintermediat	(Bourges, Ramus et al. 2004)
ACAD9		<i>H. sapiens</i> (HEK293 Zellen)	Einflussnahme auf Proteingehalt an Ecsit, NDUFAF1 und Komplex I	(Nouws, Nijtmans et al. 2010)

2.4 Bedeutung von Pentatricopeptid-Repeat-Proteinen für die mitochondriale Biogenese

Die posttranskriptionellen Prozesse in Organellen werden häufig rigide und genspezifisch von nuklear kodierten Faktoren kontrolliert. Hierbei kommt den sogenannten *Pentatricopeptide repeat domain* (PPR) Proteinen eine besondere Bedeutung zu. Die molekularen Funktionen von Proteinen mit PPR Domänen sind bis ins letzte Detail noch nicht verstanden, da bei vielen der postulierten Aktivitäten der direkte biochemische Nachweis fehlt (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Demzufolge sind weitere -auch indirekte- Aufgaben bei der Wirkungsweise der Proteine dieser Klasse denkbar, jedoch ist die besondere Bedeutung in direkten RNA-Wechselwirkungen zu betonen.

Die PPR Domäne kann in bis zu dreißigfacher Ausführung in einem einzelnen Protein wiederholt werden und weist ein 35 Aminosäuren umfassendes degeneriertes Motiv auf. Diese charakteristischen Sequenzwiederholungen, welche zumeist in Tandemanordnungen anzutreffen sind, zeigen sich für die Namensgebung dieser Familie verantwortlich (Small und Peeters 2000).

Die Proteine wurden im Jahre 2000 durch ihre signifikante Präsenz in terrestrischen Pflanzen im Rahmen der Sequenzierung von *Arabidopsis thaliana* identifiziert und liegen in diesem Organismus mit beispielsweise 450 Proteinen vor. Hierbei war auffällig, dass diese bis dato unbekannte Proteinfamilie gehäuft mitochondriale und plastidäre Präsequenzen aufweist (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Trotz der vorherrschenden Dominanz dieser Proteine für Pflanzen sind einige PPR Proteine ebenfalls in anderen Eukaryoten nachweisbar. In *Homo sapiens* lassen sich anhand der Sequenz sechs, in *Saccharomyces cerevisiae* fünf und in *Neurospora crassa* acht PPR Proteine identifizieren (Lurin, Andres et al. 2004; Lightowlers und Chrzanowska-Lightowlers 2008).

Die bisher bekannten Funktionen dieser Proteine lassen sich ausschließlich dem RNA-Metabolismus in Organellen zuordnen, demnach sind sie in Eukaryoten in Mitochondrien und in Pflanzen zusätzlich in Chloroplasten anzutreffen (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Hier sind sie verantwortlich für vier umfassende Aufgaben in der RNA Reifung.

- (1) Durch Bindung an das untranslatierte 5'-Ende einer Prä-mRNA können PPR Proteine die Translation initiieren. Bekannt ist dieser Vorgang für das

- crp1 Protein aus *Zea mays* (Schmitz-Linneweber, Williams-Carrier et al. 2005) und ppr336 aus *Arabidopsis thaliana* (Uyttewaal, Mireau et al. 2008).
- (2) Spezifisches Editing durch die Bindung von PPR Proteinen an cis-Elemente oberhalb des Bereichs, in dem die C-zu-U Prozessierung vonstatten geht, ist beispielsweise für die clb19 (Okuda, Nakamura et al. 2006) und crr4 (Wang, Zou et al. 2006; Okuda, Myouga et al. 2007) Proteine in *A. thaliana* bekannt.
 - (3) PPR Proteine können für den Splicing-Vorgang bestimmter Introns notwendig sein. Hierbei sei neben den Vertretern in Pflanzen -wie das hcf152 (Meierhoff, Felder et al. 2003) und otp43- auch das Protein cya-5 aus *N. crassa* zu betonen (Coffin, Dhillon et al. 1997), welches das erste charakterisierte PPR Protein in diesem Organismus war und homolog zu dem Protein PET309 aus *S. cerevisiae* ist (Manthey und McEwen 1995). Das PPR Protein otp43 zeigt eine hohe RNA-Spezifität gegenüber dem nad1 Intron 1 und ist verantwortlich für das trans-Splicing dieser Komplex I Untereinheit in *A. thaliana* (de Longevialle, Meyer et al. 2007).
 - (4) Sowohl für die Stabilität wie auch für den Abbau von RNA konnten PPR Proteine identifiziert werden. Durch spezifische RNA-Bindung kann einerseits die Spaltung der RNA durch Rekrutierung von Endonukleasen ermöglicht bzw. beschleunigt werden, wie es im Fall des PPR Proteins RF1b in *Oryza sativa* (Wang, Zou et al. 2006) nachgewiesen werden konnte. Andererseits hindert die RNA-Bindung die Zugänglichkeit der RNA gegenüber Endonucleasen wie das PPR Protein mca1 in der einzelligen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (Loiselay, Gumpel et al. 2008). Dieses bindet an die ersten 21 Nukleotide der 5'-UTR der petA-RNA und verhindert die 5'->3' Degradation.

Durch ein weites Spektrum an RNA-bindenden Aufgaben der PPR Proteine kann die Reifung und Prozessierung des RNA-Metabolismus in Organellen sichergestellt werden (Schmitz-Linneweber und Small 2008). In der nachfolgenden Abbildung sind diese Aufgaben graphisch dargestellt.

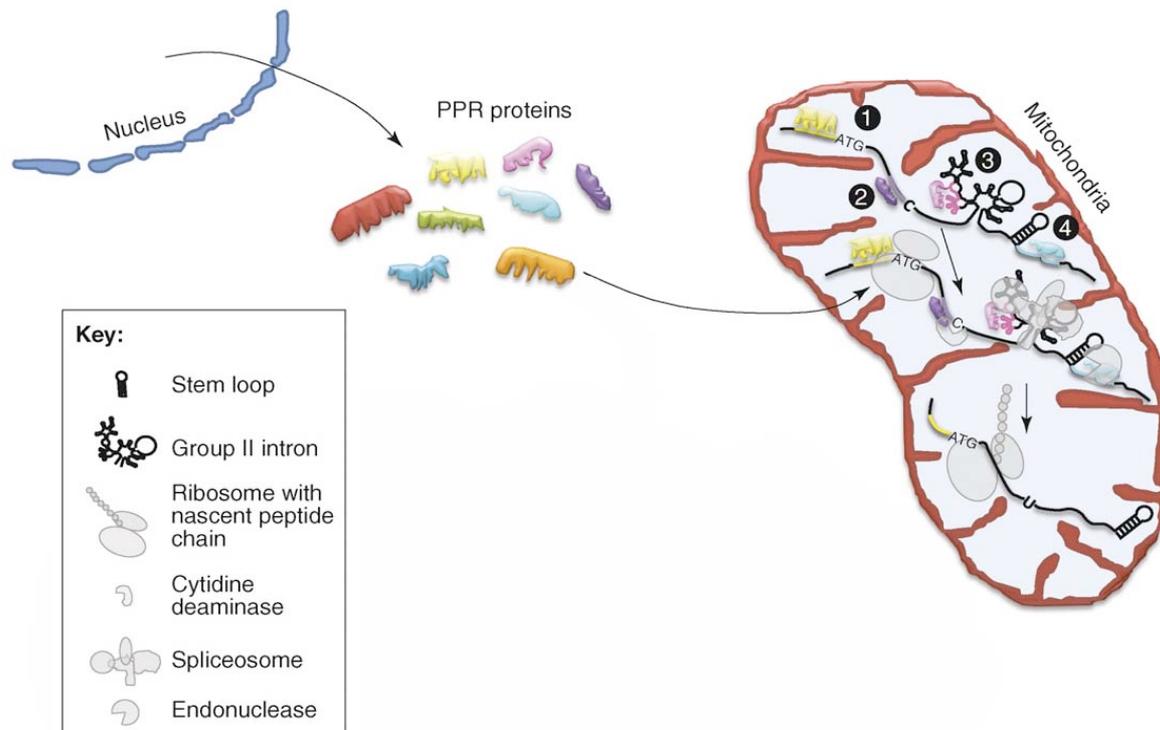


Abb. 2.11: Molekulare Funktionen von PPR Proteinen in Mitochondrien. Die Darstellung ist dem Review von Schmitz-Linneweber entnommen und modifiziert worden. Die angegebenen Zahlen entsprechen den Zahlen im Text.

Die Struktur von PPR Proteinen ist bisher noch nicht aufgeklärt worden, jedoch ist aufgrund einer Ähnlichkeit des Motives zu Tetratricopeptide Repeat Proteinen (TPR), welche als Mediatoren und Wirkungsverstärkern bei Protein-Protein Interaktionen bekannt sind, von einer Helix-turn-Helix Struktur auszugehen. Die in den TPR bekannten anti-parallelen α -Helices bilden in ihrer Tandemanordnung einen Zwischenraum, welche als Protein-Bindestelle postuliert wird (Das, Cohen et al. 1998; Small und Peeters 2000). Vorhergesagt wird für PPR Proteine eine ähnliche Struktur mit der Existenz einer α -helicalen Bindetasche für RNA-Stränge (Small und Peeters 2000).

2.5 *Neurospora crassa* als Modellorganismus

Viele Assemblierungsfaktoren und ein allgemeines Verständnis für die Atmungskette wurden anhand von Studien an der eukaryotischen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* aufgedeckt. Aufgrund eines Mangels am Komplex I der Atmungskette in *S. cerevisiae* müssen zur Erforschung dieses ersten Komplexes andere Organismen

genutzt werden (Nosek und Fukuhara 1994; Friedrich und Weiss 1997). Der apathogene Hyphenpilz *Neurospora crassa*, welcher der Klasse der Ascomyceten zuzuordnen ist, zeichnet sich hier in besonderer Weise durch die einfache Anzucht und Handhabung aus (Perkins und Davis 2000). In den 80 Jahre seit dem ersten wissenschaftlichen Fachartikel zu *N. crassa* (Shear und Dodge 1927), wurde ein umfassendes Repertoire zur wissenschaftlichen Bearbeitung und Charakterisierung dieses Hyphenpilzes geschaffen. Hervorzuheben sind die frühen Arbeiten Beadles, Lederbergs und Tatums, welche durch Arbeiten an *N. crassa* die heute noch modifiziert gültige These „Ein-Gen-ein-Enzym“ aufstellten. 1958 haben sie hierfür den Nobelpreis¹ für Medizin erhalten (Beadle und Tatum 1941; Raju 1999). Des Weiteren wurde durch die vollständige Sequenzierung des Genoms von *N. crassa* die molekularbiologische Arbeit an diesem Organismus weiter simplifiziert, da die vollständigen genetischen Informationen in allgemein zugängigen Datenbanken^{2,3} zur Verfügung gestellt wurden (Galagan, Calvo et al. 2003; Mannhaupt, Montrone et al. 2003). *N. crassa* verfügt insgesamt über mehr als 40 Mb auf sieben Chromosomen, welche jeweils eine Größe zwischen 4-10 Mb aufweisen. Das Genom umfasst über 10.000 Gene mit einer geringen Anzahl von 396 paralogen Genen, was einem Anteil von 3,6% entspricht. Diese geringe Redundanz des Genoms im Vergleich zu anderen Organismen wie *S. cerevisiae* (1139 Paraloge bei 6449 Genen, 17,7%) oder *Arabidopsis thaliana* (11283 Paraloge bei 25000 Genen, 45,1%) weist *N. crassa* als besonders geeignet aus, um Effekte von ausgeschalteten oder defekten Genen auf Stoffwechselfvorgänge zu untersuchen (Mannhaupt, Montrone et al. 2003). Diesem Aspekt Folge leistend kommt dem Beitrag des *Neurospora Genome Projects*⁴ eine besondere Bedeutung zu, welches sich zum Ziel gesetzt hat, alle Gene in *N. crassa* gezielt einzeln auszuschalten und die daraus resultierenden Knockout-Mutanten über das Fungal Genetic Stock Center⁵ den jeweiligen interessierten Forschern verfügbar zu machen (Colot, Park et al. 2006; Dunlap, Borkovich et al. 2007). Die Methodik ist im nachfolgenden Kapitel 2.5.1 erläutert.

¹ "The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1958". Nobelprize.org. 13 Mar 2011
http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1958/

² MNCDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/>

³ BROAD Institute, *Neurospora crassa* Database;
<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>

⁴ Der Hauptsitz des *Neurospora Genome Projects* ist in Dartmouth, USA lokalisiert.
<http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/>

⁵ Fungal Genetic Stock Center, <http://www.fgsc.net/>

Der typische und bevorzugte Lebensraum dieses heterotrophisch lebenden Organismus sind feuchte und warme Gebiete. Demnach ist er auf feuchten, faulenden Pflanzenteilen, aber auch an Orten wie Bäckereien zu finden. Der Notwendigkeit der Hitzeaktivierung der Ascosporen Rechnung tragend findet sich dieser Schimmelpilz häufig als einer der ersten Kolonialisten nach Waldbränden auf organischem Material (Davis 2000).

Der apathogene, saprophytische Organismus *Neurospora crassa* ist den Schlauchpilzen (Ascomyceten) zuzuordnen und weist eine vegetative und generative Vermehrung auf (Davis 2000; Perkins und Davis 2000). Der Begriff des Ascus, der diesem Organismus seine Zuteilung zu den Ascomyceten verlieh, ist das typische Fortpflanzungsorgan der heterothallischen Schlauchpilze und beinhaltet die jeweils acht generativ gebildeten Ascosporen. Diese Sporen bilden sich infolge einer sexuellen Kreuzung zwischen den beiden Kreuzungstypen A und a und müssen durch Hitzeeinwirkung aktiviert werden. Am vegetativen Mycel bildet bei der generativen Vermehrung eine Ascogone, welche eine „Empfängnishyphe“, die Trichogyne ausbildet. Diese wiederum kann mit einer Konidie oder dem Mycel eines Stamms des entgegengesetzten Kreuzungstyp verschmelzen, infolge dessen ascogone Hyphen ausgebildet werden. Diese beinhalten jeweils einen Kern des Kreuzungstyp A und a (in der Abb. 2.12 rot und gelb dargestellt). Über den Zwischenschritt der Bildung eines Vorfruchtkörpers, des sogenannten Protoperithezium, wird final der Fruchtkörper des Peritheziums ausgebildet. Über meiotische und mitotische Prozesse im Inneren des Peritheziums reifen acht Ascosporen pro Ascus aus. (Davis 2000; Nowrousian 2007) Der Prozess der vegetativen Vermehrung umfasst sowohl die Bildung der Hyphen, welche zusammengenommen als verzweigte, tubuläre Filamente das Myzel bilden, und die Sporulation der mehrkernigen Makro- und einkernigen Mikrokonidien (Davis 2000). Die durch ihre orange Färbung und Häufigkeit markanten 4-7 µm großen Makrokonidien bilden sich an den Lufthyphen und tragen signifikant zur Verbreitung des Pilzes bei (Lowry, Durkee et al. 1967). Die unauffälligen und lediglich in geringen Mengen vorhandenen Mikrokonidien hingegen weisen eine Größe von 2,5-3,5 µm auf und verbleiben nach ihrer Germination an den Hyphen (Fincham und Day 1979). Die Abbildung 2.12 zeigt den generativen und vegetativen Lebenszyklus von *N. crassa* mit der Sporulation der beiden Konidienarten (Nowrousian 2007).

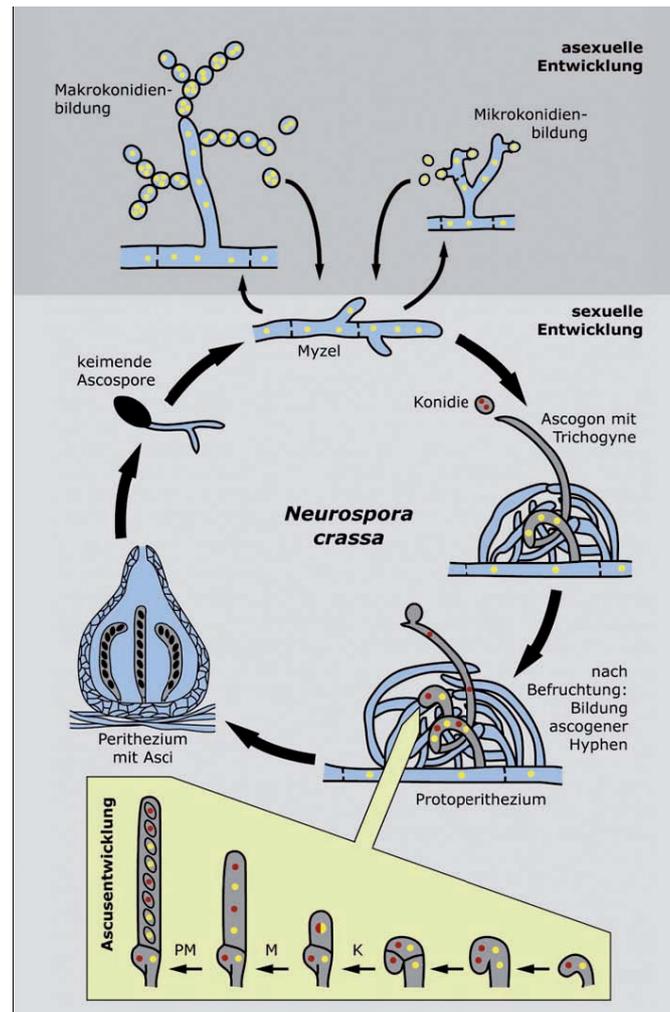


Abb. 2.12: Generativer und vegetativer Lebenszyklus von *N. crassa* (Nowrousian 2007). Hierbei ist die Sporulation von Mikrokonidien und Makrokonidien in der vegetativen Vermehrung (asexuelle Entwicklung) durch die dunkelgraue Hintergrundfärbung hervorgehoben, die generative Vermehrung (sexuelle Entwicklung) ist mit hellgrauer Färbung hinterlegt. Die Ascosporenenentwicklung in den Protoperithezien wurde hellgrün hinterlegt..

Besonders hervorzuheben ist die Rolle von *N. crassa* in der Verwendung als Modellorganismus für die Aufklärung der Assemblierungsvorgänge in der Atmungskette. Anders als Säugetiere weisen viele Pflanzen und Pilze eine verzweigte Atmungskette auf, ebenso *N. crassa* (Douce und Neuburger 1989). Diese führt beispielsweise bei Mutationen oder Deletionen einzelner Atmungskettenkomplexe zu nicht letalen Effekten -anders als beispielsweise in Säugetieren (Nehls, Friedrich et al. 1992). Die ausschließlich kernkodierte und im Vergleich zu den Atmungskettenkomplexen signifikant kleineren alternative NADH-Dehydrogenasen und Ubichinol-Oxidasen (zwischen 43-65 kDa mit einer singulären Polypeptidkette) tragen nicht zum Aufbau des elektrochemischen Potentials zur ATP-Synthese bei, da sie keine Protonen translozieren (Schwitzgubel und Palmer 1982;

Moller 2001). Spekulationen zur evolutionären Bedeutung der Proteine der alternativen Atmungskette lassen Möglichkeiten bei der Vermeidung der Bildung von Sauerstoffradikalen und als Adaptionen an variable Umweltbedingungen zu (da Silva, Alves et al. 1996; Finnegan, Whelan et al. 1997; Simons, Millenaar et al. 1999; Moller 2001; Svensson und Rasmusson 2001; Michalecka, Svensson et al. 2003; Escobar, Franklin et al. 2004; Fernie, Carrari et al. 2004). Hierbei ist bemerkenswert, dass die Substrataffinität der alternativen Enzyme in *N. crassa* nur 10 % der protonenpumpenden Komplexen beträgt und damit eine eventuelle Bedeutung als Überlaufventile für überschüssige Reduktionsäquivalente möglich ist (Raghavendra und Padmasree 2003). Dennoch lassen sich Beispiele aufführen, in denen Organismen vollständig auf einen energetisch aufwändig zu assemblierenden Atmungskettenkomplex verzichten und eine alternative, nicht protonenpumpende Dehydrogenase nutzen wie beispielsweise ND1 aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (de Vries und Marres 1987; de Vries und Grivell 1988; Melo, Bandejas et al. 2004).

In *N. crassa* existieren fünf Enzyme der alternativen Atmungskette, drei externe NADH-Dehydrogenasen setzen das NADH aus dem Cytosol um (Melo, Duarte et al. 2001; Carneiro, Duarte et al. 2004; Carneiro, Duarte et al. 2007), die interne NADH-Dehydrogenase ND1 oxidiert NADH in der mitochondrialen Matrix (Melo, Duarte et al. 1999; Duarte, Peters et al. 2003) und eine Ubichinol Oxidase, welche Ubichinol durch Sauerstoff oxidiert (Schwitzguebel und Palmer 1982).

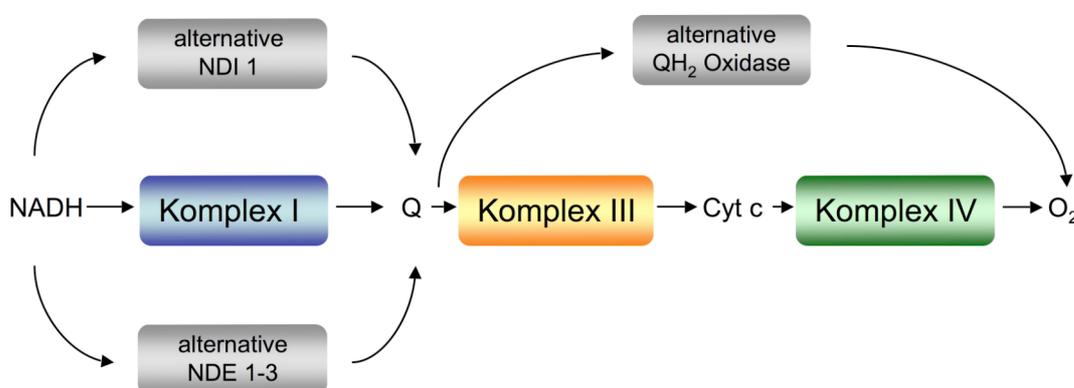


Abb. 2.13: Verzweigte mitochondriale Atmungskette in *N. crassa*. Die nicht protonenpumpenden Enzyme sind grau dargestellt. NDI 1 ist die interne NADH-Dehydrogenase, NDI 1-3 die externen NADH-Dehydrogenasen, QH₂ steht für Ubichinol, Cyt c für Cytochrom C (Darstellung nach (Douce und Neuburger 1989)).

Ein interessanter möglicher Anwendungsaspekt der Enzyme der verzweigten Atmungskette zeigte sich in der Verwendung in Säugetierzellen als Komplementation von Defekten der Atmungskettenkomplexe (Yagi, Seo et al. 2001; Park, Li et al. 2007). Insbesondere zeichnete sich hier die Anwendung der alternativen Dehydrogenase NDI1 der Hefe *S. cerevisiae* aus, welche sowohl nach Einschleusung des NDI1-Gens in Retinazellen in *R. norvegicus* optische Defekte durch Manifestierung des LHON Syndroms zu lindern (Marella, Seo et al. 2010) wie auch in *D. melanogaster* die postulierten Effekte des Komplex I auf die Apoptose und Produktion von ROS durch eine verlängerte Lebensspanne aufzuheben vermag (Sanz, Soikkeli et al. 2010). Des Weiteren wurden Komplex I Defekte erfolgreich in *C. elegans* durch Expression des NDI1 gezeigt (DeCorby, Gaskova et al. 2007). Spekulativ werden zukünftige Einsatzperspektiven der NDI1 bei Parkinson Patienten diskutiert, da eine Dysfunktion des Komplex I mit Abnahme des ATP-Levels und Zunahme der ROS Produktion unter Beschädigung der dopaminergen Neuronen bekannt ist, jedoch unter Annahme einer klinischen Etablierung der Gentherapie (Marella, Seo et al. 2009). Erste Möglichkeiten zeigten auf diesem Gebiet in vivo Studien an Mäusen mit manifestiertem Morbus Parkinson und der erfolgreichen Komplementation durch NDI 1 (Seo, Nakamaru-Ogiso et al. 2006).

2.5.1 Gezielte Geninaktivierung in *N. crassa*

Eine erfolgreiche Gendeletionsstrategie ist in *N. crassa* durch die signifikant niedrige Rate der homologen Rekombination bei der Transformation von Fremd-DNA von unter 10% erschwert (Colot, Park et al. 2006). Dieser Schwierigkeit Rechnung tragend werden für das Hochdurchsatz-Verfahren zur gezielten Geninaktivierung der annähernd 10.000 Gene zwei Mutanten verwendet, Δ mus-51 und Δ mus-52 (Ninomiya, Suzuki et al. 2004; Ishibashi, Suzuki et al. 2006). Diese Proteine sind verantwortlich für den sogenannten Vorgang der Nicht-homologe Endverknüpfung (*nonhomologous end-joining* -NHEJ), also dem Reparaturmechanismus im Falle eines DNA-Doppelstrangbruches, der durch einfache Ligation der DNA-Enden unabhängig von homologen Sequenzen der jeweiligen DNA-Bereiche erfolgt. Dies führt selbst bei exogener DNA, die mit ausgedehnten Bereichen homologer DNA-Sequenzen versehen ist, zum Ereignis der ektopischen Integration der DNA in das Genom. Dem gegenüber stehen Proteine, welche eine homologe Rekombination

ermöglichen, also einen Doppelstrangbruch durch die Anlagerung von homologen DNA-Bereichen reparieren. Der letztgenannte Mechanismus ermöglicht im Falle der Einführung von Fremd-DNA in das Genom eines Organismus die homologe Rekombination und findet im Organismus *S. cerevisiae* bevorzugt statt. Hierfür sind die Gene RAD51, RAD52 und RAD54 zuständig, deren Homologe in *N. crassa* nachweislich die gleiche Rolle spielen (namentlich mei-3, mus-11 und mus-25), jedoch eine viel geringere Aktivität aufweisen (Hatakeyama, Ishii et al. 1995; Handa, Noguchi et al. 2000; Sakuraba, Schroeder et al. 2000). Die Verwendung von Knockout-Mutanten, in denen entweder das Gen mus-51 oder mus-52 ausgeschaltet worden ist, weisen zwar keine erhöhte Rate bei dem Vorgang der homologen Rekombination auf, jedoch erleichtert die völlige Abwesenheit der heterologen Rekombination beim Vorgang der Transformation mit Fremd-DNA die Selektion der selten auftretenden Mutanten, die durch homologe Rekombination entstehen (Colot, Park et al. 2006).

Zur Erzeugung der DNA-Deletionskassetten für das Hochdurchsatz-Verfahren zur Transformation von *N. crassa* wird die hohe Rate der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* genutzt. Zu diesem Zweck werden die angrenzenden Bereiche des auszuschaltenden Gens per PCR amplifiziert und mit dem Gen für den Selektionsmarker und einem linearisierten Hefeshuttlevektor in *S. cerevisiae* transformiert. Im Falle des *Neurospora Genome Projects* ist das hph-Gen (Hygromycin B Phosphotransferase), welches dem Organismus die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B aus dem Bakterium *Streptomyces hygroscopicus* verleiht, der gewählte Selektionsmarker (Staben, Jensen et al. 1989). Hygromycin B inhibiert sowohl in eukaryotischen wie auch prokaryotischen Zellen die Proteinsynthese (Gonzalez, Jimenez et al. 1978; Singh, Ursic et al. 1979). Der Wirkmechanismus der durch das hph-Gen kodierten Kinase beruht auf der Inaktivierung des Aminoglycosids Hygromycin B durch Phosphorylierung sowohl bei der Nutzung in eukaryotischen wie prokaryotischen Zellen (Rao, Allen et al. 1983). In Abbildung 2.15 ist das Verfahren dargestellt. Durch eine Amplifizierung der 3'- und 5'-flankierenden Bereiche um das auszuschaltende Gen mit den Primer 5f und 5r für den 5'-Bereich und den Primern 3f und 3r für den 3'-Bereich werden die homologen DNA-Abschnitte für die spätere homologe Transformation generiert. Jeweils die von außen nach innen gerichteten Primer (5f, 3r) weisen an ihrem 5'-Ende homologe Bereiche zum linearisierten Hefeshuttlevektor auf. Die vom Gen nach außen

weisenden Primer tragen an ihrem jeweiligen 5'-Ende homologe Bereiche zum Selektionsmarker. Durch homologe Rekombination in *S. cerevisiae* wird ein zirkuläres Konstrukt erzeugt, das als Vorlage für die Amplifikation der Deletionskassette mit den Primern 5f und 3r dient. Diese wird im Anschluss für die Transformation des Δ mus-51 oder Δ mus-52 Stammes in *N. crassa* verwendet (Colot, Park et al. 2006).

Bis zum 29. Oktober 2010 wurden mit dieser Strategie 7456 Gene gezielt ausgeschaltet. Jedoch befanden sich hierunter 1296 heterokaryonte Mutanten, bei welchen die erfolgte Deletion des Gens zu einem mutmaßlich letalen Effekt in *N. crassa* führte und demnach der Gen-Knockout nur gemischerterbig in Kombination mit Wildtyp-Nuclei vorliegt. Es lassen sich also 6160 homokaryonte Mutanten über das FGSC bestellen. Des Weiteren liegen von den 7456 Mutanten 3387 Mutanten sowohl im Kreuzungstyp A und a vor. Insgesamt hat das *Neurospora Genome Project* bis zum genannten Stichtag 10823 Mutanten erzeugt, die mutmaßlich fehlenden 2500 Mutanten der noch ausstehenden ORF's (open reading frames) werden in wenigen Jahren den *Neurospora crassa* – Forschern zur Verfügung stehen⁶.

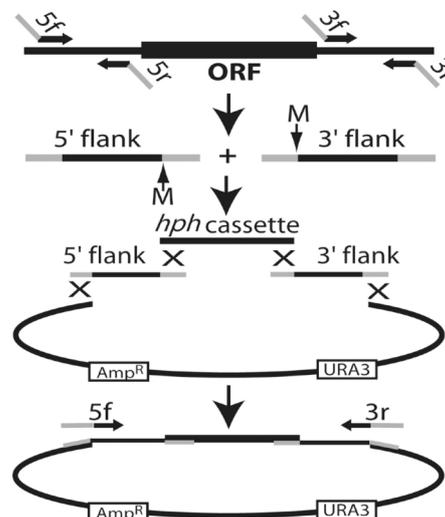


Abb. 2.14: Strategie zur Erzeugung der DNA-Deletionskassetten für das *N. crassa* Knockout-Hochdurchsatzverfahren. Durch Amplifikation mit den Primern 5f, 5r, 3f und 3r werden die den ORF (open reading frame) flankierenden Sequenzen amplifiziert und mit einer hph Kasette (hph = Hygromycin Resistenz Gen) durch homologe Rekombination in einen Hefe-Shuttle-Vektor in *S. cerevisiae* zusammengefügt. Homologe Sequenzbereiche sind durch ein schematisches X dargestellt. Abschließend wird mit den Primern 5f und 3r die DNA-Deletionskassette amplifiziert. URA3 bezeichnet die Uracil-Auxotrophie Sequenz und Amp^R die Ampicillin Resistenz Sequenz im Hefevektor.

⁶ Die Daten wurden der Internetseite des *Neurospora Genome Project* entnommen <http://www.dartmouth.edu/~neurosporagenome/>

2.5.2 Das mitochondriale Genom von *Neurospora crassa*

Das ~65 kb umfassende mitochondriale Genom von *N. crassa* beinhaltet die genetische Information von mehreren zentralen Untereinheiten der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung. Die sieben Untereinheiten ND1-6 und ND4L des Komplex I sind mitochondrial kodiert, ebenso die Untereinheit cob (Cytochrom b) des Komplex III, die drei Untereinheiten cox1-3 des Komplex IV und drei Untereinheiten der ATP Synthase, ATP6, ATP8 und ATP9. Die Funktion der Mitochondrien ist jedoch abhängig von der Expression und dem anschließenden Import in die Mitochondrien von der Vielzahl nukleär kodierter Proteine. Zusätzlich enthält das mitochondriale Genom alle notwendigen 27 tRNA's und zwei rRNA, die große und kleine mitochondriale rRNA. Die tRNA- und rRNA- Bereiche sind in einem Viertel clusterartig angeordnet. Die große rRNA (23S) beinhaltet ein Intron der Guppe I, welches seinerseits das Gen für das mitochondriale S5 Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit enthält (Griffiths 1995).

Die bekannten Promotoren wurden durch in vitro Transkription identifiziert. Drei Promotoren weisen die 15 Basenpaar Konsensus-Sequenz 5'-TTAGARAKGKARTRR-3' und zwei die geringer konservierte 11 Basenpaar Konsensus-Sequenz 5'-TTAGARRKRKA-3' auf (mit R = A oder G und K = G oder T). Drei dieser Promotoren liegen in der Nähe der kleinen rRNA (19S rRNA), ein Promotor direkt am Gencode der großen rRNA (23S rRNA) und der fünfte auf diese Weise identifizierte Promotor lag 730 bp vom 5'-Ende des cob – Gens entfernt (Kennell und Lambowitz 1989; Kubelik, Kennell et al. 1990). Zwei zusätzliche Promotoren wurden durch Northern Hybridisierung und Primer Extension für die Transkriptionsinitiierung der mRNA von COX1 und dem Gencluster ATP8-ATP6-ATP9-COX2 identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass das Gen ND1, welches das nächstgelegene Gen am 3'-Ende des COX1 Gen ist, nicht Bestandteil eines gemeinsamen mRNA-Transkripts ist (Kleidon, Plesofsky et al. 2003).

Des Weiteren ist bei der mitochondrialen Transkription hervorzuheben, dass die Primärtranskripte zumeist mehrere Gene beinhalten. Diese sind im anschließenden Reifungsprozess der mRNA sowohl Splicing- und Spaltungsprozessen unterworfen, bevor die vollständig prozessierte reife mRNA der einzelnen Gene vorhanden ist. Diese polycistronischen mRNA-Transkripte sind für mehrere Gene untersucht worden. Das Gencluster ATP8-ATP6-ATP9-COX2 wird gemeinsam transkribiert und in fünf nachweisbaren Splicing-Schritten prozessiert (Bittner-Eddy, Monroy et al.

1994). Die Untereinheiten ND4L und ND5 sind in dicistronischen Prätranskripten nachweisbar (Nelson und Macino 1987). Die Gene COX1 und COB werden einzeln transkribiert (Kleidon, Plesofsky et al. 2003). Spekulativ kann davon ausgegangen werden, dass die benachbarten Gene ND2-ND3 und ND1-ND4 ebenfalls als dicistronische Prätranskripte mit Promotersequenzen am 5'-Ende der Primärtranskripte vorliegen, jedoch wurden diese Bereiche nicht weitergehend untersucht.

Als notwendiger Transkriptionsfaktor für die Reifung der COX1-mRNA konnte das zum Pet309p aus *S. cerevisiae* homologe Protein *cya-5* nachgewiesen werden, welches der Familie der Pentatricopeptide-Repeat-Proteine zuzuordnen ist (Coffin, Dhillon et al. 1997). Die Vielzahl notwendiger Prozessierungsschritte für die erfolgreiche mitochondriale Proteinsynthese erscheint für die Notwendigkeit weiterer Transkriptionsfaktoren evident.

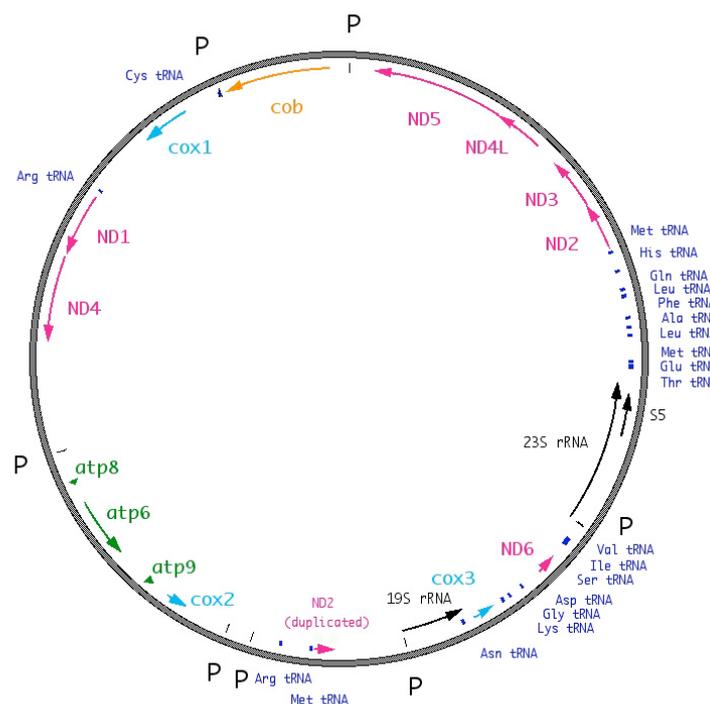


Abb. 2.15: Das mitochondriale Genom von *N. crassa*. Die DNA ist zirkulär und weist 64.5 kb auf. Die sieben Untereinheiten des Komplex I (ND1-6, ND4L) sind pink dargestellt, das Apocytochrom b (*cob*) des Komplex III orange, die drei Untereinheiten des Komplex IV (COX1-3) in hellblau und die drei Untereinheiten des Komplex V (*atp6*, *atp8*, *atp9*) grün. Die große (23S) und kleine (19S) rRNA und das ribosomale Protein S5 in schwarz. Der Pfeil gibt die Transkriptionsrichtung an. Bekannte Promotorsequenzen sind außerhalb der Genomsequenz mit einem „P“ markiert, ebenso die 27 tRNA Sequenzen in dunkelblau.

2.6 Ziel der Arbeit

Die oxidative Phosphorylierung als wesentlicher Prozess der Energiegewinnung vom Einzeller bis zu höheren Organismen kann trotz umfassender und langjähriger Erforschung nicht in allen Aspekten als aufgeklärt bezeichnet werden. Ein Hauptaugenmerk liegt in jüngster Vergangenheit in der Aufklärung von Struktur und Biogenese des größten Komplexes der Atmungskette, der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase.

In dieser Arbeit sollten essentielle und bislang unbekannte Biogenesefaktoren des Komplex I identifiziert und charakterisiert werden. Die Bedeutsamkeit der Identifizierung weiterer Faktoren zeigt sich in der klinischen Manifestierung von Komplex I-Defekten in verschiedenen Krankheiten, welche einen eindeutigen Bezug zu Mutationen in Genen von Biogeneseproteinen aufweisen (Dunning, McKenzie et al. 2007; Pagliarini, Calvo et al. 2008; Saada, Edvardson et al. 2008; Sugiana, Pagliarini et al. 2008; Saada, Vogel et al. 2009; Nouws, Nijtmans et al. 2010).

Zur geeigneten Eingrenzung potentieller Gene wurde ein differentieller Genomvergleich verschiedener Hefen angewendet. Gesucht wurden Gene, die ausschließlich in Hefen mit einem Komplex I vorhanden sind, aber in Hefen ohne Komplex I fehlen (Ogilvie, Kennaway et al. 2005).

Zusätzlich sollte eine genomweite Analyse von Proteinen mit einer Pentatricopeptid-Repeat-Domäne durchgeführt werden, da diese spezifische Rollen im RNA-Metabolismus in Organellen ausführen.

Die tatsächliche Relevanz der gefundenen Gene für den Komplex I sollte durch Gendeletionen untersucht werden. Dazu wurde der Hyphenpilz *Neurospora crassa* gewählt. Dieser Modellorganismus zeichnet sich durch seine vollständige Atmungskette inklusive des Komplexes I, sein etabliertes Methodenspektrum und der vollständigen Genomsequenzierung aus. Die Quantifizierung des Komplex I ist durch die Messung der NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität und der spezifischen Komplex I-Färbung in BlauNativ-Gelen möglich. Die Präsenz der Komplexe III und IV kann anhand der Bestimmung des Cytochromgehaltes überprüft werden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die fraglichen Genprodukte allgemeine Aufgaben bei der Biogenese der Atmungskette besitzen. Als Bestätigung der Relevanz der Gendeletion für die Präsenz des Komplex I sollte über eine Komplementierung der Defekte dieser eindeutig bestätigt werden.

Die Funktion der PPR-Proteine mit Einfluss auf den Komplex I sollte bei der Transkription und Prozessierung mitochondrial kodierter Untereinheiten des Komplex I untersucht werden, wofür als Prozessierungsanalyse das Verfahren der Northern Blots gewählt wurde.

3 Material und Methoden

3.1 Mikroorganismen

<i>N. crassa</i>	Wildtyp SL 74-OR23-1A (FGSC 987) Mutante <i>nuo20.9</i> (Krüll 1995) siehe Tabelle 4.1 (tabellarische Zusammenfassung aller überprüften Deletionsmutanten von <i>N. crassa</i>)
<i>E. coli</i>	XL-1 Blue [®] (Stratagene) XL10-Gold [®] (Stratagene) BL21 (DE3) (Novagen) DH5 α (Invitrogen)

3.2 Plasmide

<i>E. coli</i>	pJET1.2/blunt (Fermentas) pET-28b (Novagen) pET-16b (Novagen)
<i>N. crassa</i>	pMYX2 (Campell, Enderlin et al. 1994)

3.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in der nachfolgenden Tabelle 3.1 zusammengefasst. Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Eurofins MWG GmbH (ehemals MWG Biotech AG) bezogen und nach Herstellerangaben auf eine Endkonzentration von 100 pmol/ μ l eingestellt.

Hierbei ist zwischen Oligonukleotiden zu unterscheiden, die in Polymerasekettenreaktionen (PCR) zur Überprüfung von *E. coli* – Kolonien dienen oder der Erzeugung der Plasmidkonstrukte für die Expression in *E. coli* oder zur Komplementierung in *N. crassa*. Des Weiteren sind die Oligonukleotide aufgelistet, die zur Erzeugung der Sonden für die Northern-Blots verwendet worden sind.

DNA Probenpuffer	10 mM EDTA 445 mM Tris-Borat, pH 8,2 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
1,0 % Agarose-Gel	10 g/l Agarose 70 µl/l Ethidiumbromid-Lösung in 0,5-fach TBE-Puffer
Spurenelementlösung (Davis und de Serres 1970)	50 g/l Citronensäure 50 g/l ZnSO ₄ *7H ₂ O 2,5 g/l CuSO ₄ *5H ₂ O 0,5 g/l H ₃ BO ₃ 10 g/l Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ *6H ₂ O 0,5 g/l MnSO ₄
50-fach Vogelsmedium (Vogel 1956)	150 g/l Natriumcitrat 250 g/l KH ₂ PO ₄ 100 g/l NH ₄ NO ₃ 10 g/l MgSO ₄ *7H ₂ O 5 g/l CaCl ₂ *2H ₂ O 5 ml/l Spurenelementlösung 0,25 mg/l
Biotin Kultivierungsagar	16 g/l Agar 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 0,5 mg/l Benomyl (nach Autoklavieren) ggf. mit 1,2 g/l Basta
Agarböden	18 g/l Agar 10 g/l Glycerin 10 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 2,5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Caseinhydrolysat 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Mikrokonidienplatten (Westergaard et al., 1947)	0,1 g/l KNO ₃ 70 mg/l K ₂ HPO ₄ 50 mg/l KH ₂ PO ₄ 50 mg/l MgSO ₄ *7H ₂ O 10 mg/l NaCl 0,5 µg/l Biotin-Lösung 10 µl/l Spurenelementlösung 150 mg/l Saccharose 16 g/l Agar 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 10 mg/l CaCl ₂ *2H ₂ O (nach Autoklavieren) 1 mM Iodacetat (nach Autoklavieren)

Sorboseagar	16 g/l Agar 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 15 g/l L(-)-Sorbose ggf. mit 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 ggf. 150 mg/l Hygromycin
Flüssigmedium	15 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Elektroporationslösung	1 M Sorbit 10 g/l PEG 4.000
Regenerationslösung	1 M Sorbit 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 20 g/l Saccharose 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Topagarose	7 g/l Low Melting Agarose 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 182 g/l Sorbit 15 g/l L(-)-Sorbose 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 0,4 g/l Basta (nach Autoklavieren)
Isolationspuffer	50 ml/l 1 M Tris-Acetat, pH 6,8 150 g/l Saccharose 2 ml PMSF-Lösung (0,1 M)
Aktivitätspuffer	0,05 % (v/v) Triton X-100 50 ml/l 1M Tris-HCl, pH 7,5 50 ml/l 1M NaCl-Lösung
Biuret-Reagenz	5 g/l Kaliumtartrat 3 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l Kaliumiodid 8 g/l NaOH
Zuckergradientenlösung	75 bzw. 250 g/l Saccharose 0,05 % (v/v) Triton X-100 50 ml/l 1M Tris-HCl, pH 7,5 50 ml/l 1M NaCl-Lösung
Lysispuffer, pH 8,0	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat 1 % (w/v) SDS

4-fach Protein-Probenpuffer	1 M Saccharose 200 mM Tris-Acetat, pH 6,8 5 mM EDTA 7 mM Dithioerythrol (DTE) 5 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Coomassie Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R-250
Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
10x BlauNativ – Puffer	500 mM BisTris 500 mM Tricine
4x BlauNativ – Probenpuffer	200 mM BisTris 24 M HCl 200 mM NaCl 40 % (w/v) Glycerin 0,004 % (w/v) Ponceau S
20x BlauNativ – Kathodenpuffer	0,4 % Coomassie®G-250
Solubilisierungspuffer (Marques, Dencher et al. 2007)	50 mM NaCl 50 mM Imidazol-HCl, pH 7,0 10 % (v/v) Glycerin 5 mM 6-Aminocaprinsäure
Komplex I – Färbelösung	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 768 mM Glycin 0,04 % (w/v) 4-Nitrotetrazolium-Blau 0,1 mM NADH
Komplex IV – Färbelösung	0,5 mg/ml 3,3'-Diaminonezidine-Tetrahydrochlorid 50 mM Natriumphosphat, pH 7,4 20 U/ml Katalase 0,5 mg/ml Cytochrom c 75 mg/ml Saccharose

Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) – großes System mit anschließendem Tank - Blotting

4 %-iges Sammelgel	1,1 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid 0,44 ml 1M Tris-Acetat, pH 6,8 66 µl 10 %-ige SDS auf 6,7 ml mit bidest. Wasser auffüllen 44 µl TEMED 22 µl APS
--------------------	--

16 %-iges Trenngel	18,75 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid 4,86 ml 1M Tris-Acetate, pH 8,8 350 µl 10 % SDS auf 35 ml mit bidest. Wasser auffüllen 17,5 µl TEMED 100 µl APS
Kammerpuffer	2 M Glycerin 0,25 M Tris-HCl, pH 8,3 0,5 % (w/v) SDS
PBS	130 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM K ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBST	PBS 0,1 % (v/v) Tween-20
Antikörper-Lösung	1,5 g BSA 50 ml PBST 0,1 - 0,2 % der entsprechenden Antikörper
Färbelösung	10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4 18 mg DAB 9 mg CoCl ₂ 9 mg NiSO ₄
Puffer für SDS-PAGE – kleines System mit anschließendem Semi-Dry - Blotting	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,85 4 g/l SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 4 g/l SDS
10x Laufpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 8,3 10 g/l SDS 1,9 M Glycin
Blotpuffer	10x Laufpuffer 20% (v/v) Methanol
TBS	20 mM Tris-HCl, pH 8,0 250 mM NaCl
TBST	TBS 0,1 % (v/v) Tween [®] 20
Blockpuffer	TBST 7 % (w/v) Milchpulver 0,05 % (w/v) NaN ₃

Puffer für Arbeiten mit RNA

RNA – Isolierungspuffer (autoklaviert)	330 mM Sorbit 200 mM Tris-HCl, pH 9,0 300 mM NaCl 10 mM EGTA 10 mM EDTA 2 % (w/v) SDS
Natriumacetat – Lösung (autoklaviert)	3 M Natriumacetat / Essigsäure, pH 6,0
Borat – Puffer (autoklaviert)	80 mM Tris/Borat, pH 8,0 5 mM EDTA
LiCl – Lösung (autoklaviert)	8 M LiCl
10x MOPS – Puffer (autoklaviert)	0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, pH 7,0 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
denat. Agarosegel (steriles ddH ₂ O)	1x MOPS – Puffer 1,8 % (v/v) Formaldehyd (37 %) 1,2 % (w/v) Agarose
20x SSC (steriles ddH ₂ O)	3 M NaCl 0,33 M Natriumcitrat, pH 7,0
Methylenblau – Lösung (steriles ddH ₂ O)	0,3 M Natriumacetat, pH 5,2 0,03 % (v/v) Methylenblau
20X SSPE (steriles ddH ₂ O)	175 g/l NaCl 27,6 g/l NaH ₂ PO ₄ 74,4 g/l EDTA, pH 7,4
Entfärbelösung (steriles ddH ₂ O)	1 x SSPE 1 % (w/v) SDS
5x RNA – Auftragungspuffer	6 % (v/v) gesättigte Bromphenolblau – Lösung 5 mM EDTA, pH 8,0 7,2 % (v/v) Formaldehyd (37%) 0,02 % (v/v) Glycerin 3,084 % (v/v) Formamid 4x MOPS - Puffer
Lösungen für Northern Blots	
Hybridisierungspuffer	250 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2 7 % (w/v) SDS 2,5 mM EDTA

Lösungen für Immunopräzipitation

Lysispuffer	140 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 20 mM Tris-HCl, pH 7,6 1 mM PMSF 1 % (v/v) Triton X-100
Waschpuffer B	0,15 M NaCl 10 mM Tris-HCl, 7,6 2 mM EDTA 0,2% (v/v) Triton X-100
Waschpuffer C	Waschpuffer B mit 0,5 M NaCl
Waschpuffer D	10 mM Tris-HCl, pH 8,0
IP - Auftragungspuffer	80 mM Tris-HCl, pH 6,8 5 mM EDTA 34 % (w/v) Saccharose 0,05 % (w/v) Bromophenol-Blau 3,2 % (w/v) SDS 40 mM DTT

Lösungen für Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie

Resuspensions- /Waschpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 0,1 % (v/v) Triton X-100
Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 0,1 % (v/v) Triton X-100
Niedrigsalzpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 % (v/v) Triton X-100
Hochsalzpuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 M NaCl 0,1 % (v/v) Triton X-100

3.5 DNA-Präparationen (Isolierung, Restriktion und Ligation)

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde kommerzielle Isolierungskits der Firma Qiagen verwendet. Entsprechend der Herstellervorschrift wurde im *Minimaßstab* Plasmide aus 4 ml Übernachtskultur (QIAprep Spin Miniprep Kit) isoliert, bei der Verwendung von 100 ml Übernachtskultur entsprechend das Protokoll für die *Midiprep* angewendet (QIAGEN Plasmid Midi Kit).

Nach der Anzucht von Hyphen in 100 ml Flüssigkultur erfolgte die Isolierung genomischer DNA aus *N. crassa* mittels einer Phenol-/Chloroformextraktion entsprechend der Methode von Al-Samarai für 0,03 g gefriergetrocknetes Mycel (Al-Samarai und Schmid 2000), oder alternativ durch Verwendung von 0,3 g Mycel. In beiden Fällen erfolgte eine Homogenisierung durch Mörsern des Mycels in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde das Zellpulver mit 1 ml Lysispuffer und 10 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) versetzt, geschüttelt und mit 1 ml äquilibriertem Phenol invertiert (0,1 M Tris-HCl pH 8,0). Anschließend wurde durch einen fünfminütigen Zentrifugationsschritt die organische von der wässrigen Phase getrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1 ml äquilibriertem Phenol versetzt und die Zentrifugation wiederholt. Hiernach wurde die wässrige Phase mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 14/1) versetzt, sanft geschüttelt und erneut durch Zentrifugation die wässrige von der organischen Phase getrennt. Zur Präzipitation der genomischen DNA wurde die wässrige Phase mit einem Volumen Isopropanol versetzt, vorsichtig vermischt und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend konnte die knäuelartig ausgefällte DNA mit einem sterilen Zahnstocher in ein frisches 1,5 ml – Reaktionsgefäß überführt und für ca. 30 Minuten getrocknet werden. Die DNA wurde je nach Ausbeute in 100-250 µl 5 mM Tris-HCl (pH 7,8) gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Gemäß Herstellerangaben (NEB, Fermentas, Roche) wurden die analytischen und präparativen Restriktionsansätze mit den entsprechenden Puffern versetzt und inkubiert. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgt mittels Agarosegelen oder bei präparativen Ansätzen wurde die Isolierung der DNA über QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen) oder über eine präparative Agarosegeleextraktion durchgeführt.

Im Falle einer gewünschten Ligation von DNA-Molekülen wurden die 3'-Hydroxylgruppe und der 5'-Phosphatrest mit dem Enzym T4 DNA Ligase zu einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Entsprechend Herstellervorgaben wurden die DNA-Präparationen inkubiert und dabei im Falle einer Insert-in-Vektor Ligation im molaren Verhältnis von 3:1 zusammengegeben.

3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die in vitro Amplifikation definierter DNA-Sequenzen für analytische und präparative Zwecke wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion / *Polymerase Chain Reaction* (PCR) durchgeführt. Die Anwendung dieser Methode erstreckte sich bei dieser Arbeit

vom analytischen Nachweis bestimmter Sequenzen innerhalb einer DNA über die Amplifizierung und Mutation bestimmter DNA-Sequenzen für die Modifikation und Klonierung in *E. coli* und *N. crassa* bis hin zu der Erzeugung von DNA-Matrizen für die radioaktive Markierung von DNA-Sonden bei den durchgeführten Northern Blots. Für alle Zentrifugationsschritte bei der Probenvorbereitung wurde eine Tischzentrifuge (Eppendorf 5415C) verwendet.

3.6.1 Analytische PCR zum Nachweis von DNA-Sequenzen

Zur Überprüfung von erfolgreich transformierten Kolonien in *E. coli* wurde die Kolonie-PCR durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und abhängig von der Koloniegröße in 20-40 µl sterilem bidest. Wasser in einem sterilen 1,5 ml-Reagiergefäß suspendiert. Direkt im Anschluss wurde die Kolonie auf einer LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen, markiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um die Kolonie zu erhalten. Die Plasmid – DNA wurde durch eine fünfminütige Inkubation in einem kochenden Wasserbad aus den Zellen freigesetzt und anschließend unlösliche Zellbestandteile durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 Upm sedimentiert. Jeweils 10 µl des Überstandes wurden für einen 25 µl PCR – Reaktionsansatz verwendet. Weitere Bestandteile des Reaktionsansatzes waren 2,5 µl ThermoPol-Puffer (NEB), 1 µl dNTPs (10mM), jeweils 0,5 µl der beiden zu verwendeten Primer, 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (NEB) und 10,3 µl bidest. Wasser.

Im Falle der Überprüfung von DNA-Sequenzen in isolierten Plasmiden wurde anstelle des Überstandes der Kochlyse zwischen 10-200 ng DNA eingesetzt und mit bidest. Wasser auf das Endvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Entsprechend der kalkulierten Annealingtemperatur der Primer und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments (hierfür Annahme von 1000 bp pro Minute Elongationszeit) wurde die PCR nach folgender Tabelle 3.2 durchgeführt.

Tab 3.2: PCR – Bedingung bei Verwendung der Taq – Polymerase.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	2.00	1
Denaturierung	94	0.30	39
Annealing	Primerspezifisch	0.30	
Elongation	72	1min pro 1kb	
Elongation	72	7.00	1
Abkühlung	4	∞	1

3.6.2 PCR zur Erzeugung der DNA-Matrizen für die radioaktive Markierung

Die Amplifikation der DNA-Matrizen für die radioaktive Markierung der Sonden für die Northern Blots erfolgt mit dem Einsatz von isolierter genomischer DNA von *N. crassa*. Für jeden Reaktionsansatz wurde das entsprechende Volumen von 200 ng isolierter DNA verwendet, eine Isolierung der mitochondrialen DNA war hierfür unnötig, da in der Isolierung der Gesamt – DNA ausreichend mitochondriale DNA vorhanden war. Der 25 µl PCR – Reaktionsansatz bestand neben der DNA-ösung aus 2,5 µl ThermoPol-Puffer (NEB), 1 µl dNTPs (10mM), 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (NEB), jeweils 0,5 µl der beiden Primern zur Amplifizierung des entsprechenden DNA-Abschnitts und wurde mit bidest. Wasser auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt. Hierbei wurden die entsprechend 5'- und 3'- Primer miteinander kombiniert. In der Tabelle 3.1 entweder mit „for“ und „rev“ oder „5“ und „3“ bezeichnet. Anschließend erfolgte eine standardisierte PCR mit den genannten Bedingungen in der Tabelle 3.3.

Tab 3.3: PCR-Bedingung bei Verwendung der Taq-Polymerase zur Erzeugung der DNA-Sonden.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	2.00	1
Denaturierung	94	0.30	39
Annealing	58	0.30	
Elongation	72	0.45	
Elongation	72	7.00	1
Abkühlung	4	∞	1

3.7 Klonierungsstrategie verschiedener DNA-Sequenzen

Für die Klonierung von *N. crassa*-Genen in Plasmide wurden verschiedene Strategien verwendet. Das Ziel war entweder eine heterologe Expression der jeweiligen Proteine in *E. coli*, wofür die Integration in den Expressionsvektor pET-28b oder pET-16b durchgeführt wurde. Oder durch eine ektopische Integration des modifizierten Gens in das Genom von *N. crassa*-Deletionsmutanten sollte der Defekt komplementiert werden. Hierfür wurde das Gen modifiziert in den pMYX2-Vektor inseriert. Dieser Vektor beinhaltet sowohl die notwendigen Sequenzen für eine Klonierung in *E. coli* wie auch ein Resistenzgen gegen das Fungizid Benomyl als Selektionsmarker für die Verwendung in *N. crassa*. Benomyl ist ein

Carbaminsäurederivat, welches an das β -Tubulin bindet und dadurch den Aufbau von Mikrotubuli hemmt. Das Benomylresistenzgen unterscheidet sich vom β -Tubulin des Wildtyps in einer Base, so dass vermutlich eine Strukturveränderung des β -Tubulins die Wirkung von Benomyl verhindert (Orbach, Porro et al. 1986; Niini und Raudaskoski 1993). Des Weiteren beinhaltet der pMYX2-Vektor einen chinaäureinduzierbaren Promoter des qa-Genclusters (Patel, Schweizer et al. 1981; Baum und Giles 1985; Giles, Case et al. 1985; Giles, Geever et al. 1991; Campell, Enderlin et al. 1994) und einen trpC-Terminator. Über eine singuläre Schnittstelle wird das Plasmid für eine einfachere Insertion in das Genom linearisiert.

Die Amplifizierung von Genen aus der genomischen DNA von *N. crassa* erfolgte mit der *Phusion*[®] DNA-Polymerase (Finnzymes) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Die Wahl fiel auf diese Polymerase, da ihre effiziente 3'-5'-Exonuklease Aktivität die Fehlerquote zufälliger Mutationen minimiert. Die Primer waren teilweise an ihrem 5'-Ende modifiziert, um Schnittstellen für nachfolgende Klonierungsschritte oder homologe Bereiche zum Klonierungsvektor nach dem *In-Fusion*[®] PCR Cloning System (Clontech) entsprechend der Herstellervorschrift zu ermöglichen.

Die Strategien zur Deletion der Introns in den Genen ncu02937, ncu00183, und ncu02565 erfolgte durch die Verwendung von Primern, die in einer Fusions-PCR die zuvor einzeln amplifizierten Exons zusammenfügen (Al Chab 2009; Biemann 2009) oder durch eine vom Intron weggerichtete PCR entsprechend dem QuickChange[®] II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) die Introns deletierten. Nach der erfolgreichen Erzeugung der Intron-freien Sequenzen wurden die Gene in den *E. coli* Expressionsvektor pET-28b oder pET-16b umgesetzt. Hiervon ausgehen wurde über die Ligation mit der AscI-Schnittstelle im pMYX2-Vektor oder dem *In-Fusion*[®] Protokoll das Gen in den Shuttlevektor zur ektopischen Insertion in das Genom von *N. crassa* umgesetzt.

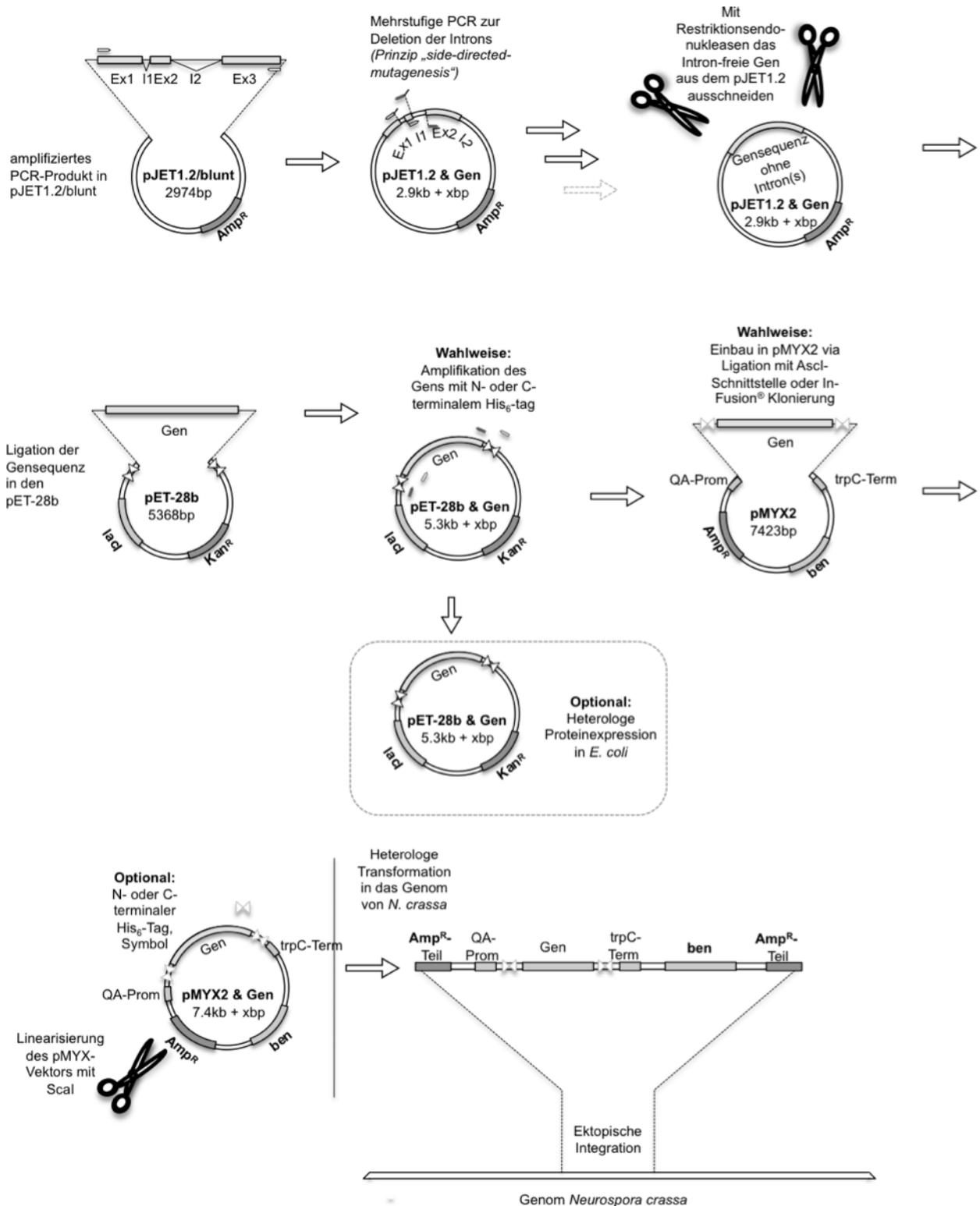


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der Klonierung von Plasmiden für die heterologe Expression in *E. coli* oder Transformation in *N. crassa*. Die relevanten Bereiche wurden nicht maßstabsgetreu in die Plasmide eingezeichnet. Amp^R, Kan^R und ben sind die Resistenz-vermittelnden Genbereiche gegen Ampicillin, Kanamycin und dem Fungizid Benomyl. QA-Prom steht für den Chinasäure-induzierbaren Promoter, trpC-Term für den Tryptophan C-Terminator. Der Hexahistidin-tag wurde schematisch als zwei zueinander gerichtete Dreiecke dargestellt.

Diese Strategie ist in der obenstehenden schematischen Abbildung 3.1 exemplarisch dargestellt und verdeutlicht die Möglichkeit sowohl die Plasmide für die heterologe Expression in *E. coli* wie zur ektopischen Integration in *N. crassa* zu nutzen.

In der nachfolgenden Tabelle 3.4 wurden die verschiedenen Primerkombinationen zur Erzeugung der unterschiedlichen Plasmide aufgeführt. Die zu den Primern gehörenden Sequenzen sind in der Tabelle 3.1 angegeben.

Tab. 3.4: Primerkombinationen zur Klonierung verschiedener Plasmide. Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in der Tabelle 3.2 ersichtlich.

Klonierung Gen ncu02937	
Amplifikation des Gens	
ncu02937 NdeI nP	ncu02937 out
Deletion des Intron nach Prinzip SDM	
13_Ex2_li	13_Ex1_rev_comp
Amplifikation des Gens für den pMYX	
C-terminaler His-tag via In-Fusion	
13+His-for-InFu	13+His-rev-InFu
N-terminaler His-tag via Ligation	
13-16-Asc-for	13-16-Asc-rev

Klonierung Gen ncu02565	
Amplifikation des Gens	
ncu02565 NdeI	ncu02565mS NotI
Fusions-PCR zur Verknüpfung der Exons	
Amplifikation des Exons 1	
ncu02565 NdeI	ncu19Ex2CP
Amplifikation des Exons 2	
ncu02565mS NotI	nc19Ex1FP
Amplifikation für die Klonierung in pMYX via Ligation	
19-pET28Asc-for	19-pET28Asc-rev
Amplifikation für die Klonierung in pMYX via In-Fusion	
19+His-for-InFu	19+His-rev-InFu

Klonierung Gen ncu00183	
Amplifikation des Gens	
ncu00183 NdeI nP	ncu00183 out
Fusions-PCR zur Verknüpfung der Exons	
Amplifikation des Exons 1	
17_Ex1_NdeI	17_Ex1_rev_comp
Amplifikation des Exons 2	
17_Ex2_li	17_Ex2_rev_comp
Amplifikation des Exons 3	
17_Ex3_li	17_Ex3_rev_comp
Amplifikation des Exons 4	
17-Ex4-li-neu	17-Ex4-rev
Umsetzung modifizierte Gene in pMYX2	
N-terminaler His-tag	
His+17-for	His+17-rev
C-terminaler His-tag	
17+His-for	17+His-rev

Klonierung Gen ncu20711 in pET-28b	
N-terminaler His-tag	
20a-for+Nde	20a-rev+mS+Hind
N- und C-terminaler His-tag	
20a-for+Nde	20a-rev+oS+Hind

Klonierung Gen ncu07684 in pET-28b	
N-terminaler His-tag	
20b-for+Nde	20b-rev+mS+Hind
N- und C-terminaler His-tag	
20b-for+Nde	20b-rev+oS-Hind

3.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unter Verwendung von diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Natriumdodecylsulfat (SDS) wurde hierbei für die Entfaltung und gleichmäßige Maskierung der Proteinladung verwendet, da es proportional zur Proteingröße durch Assoziation an die Peptidkette die Proteinladungen auszugleichen vermag. Die Proteinwanderung im elektrischen Feld wurde hierdurch ausschließlich von der Proteingröße bestimmt.

Es wurden zwei verschiedene Gelsysteme verwendet. Für Gele im großen Maßstab wurde das Hoefer-Gelsystems für die Arbeiten mit Proteinen aus *N. crassa* angewendet und die Elektrophorese bei 10 mA für 16 Stunden durchgeführt. Das kleine Gelsystem wurde für die Expressionsstudien in *E. coli* und Proteinanreicherungen und –aufreinigungen nach chromatographischen Trennverfahren eingesetzt.

Die Proteinlösungen wurden mit der entsprechenden Menge 4x Auftragungspuffer versetzt und die Taschen entsprechend beladen.

Die Färbung der Proteinbanden der SDS-PAGE erfolgte durch die Anwendung der Coomassie-Färbelösung. Bei beiden Gelsystemen wurde die SDS-PAGE für eine Stunde in der Färbelösung bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend der ungebundene Farbstoff durch wiederholtes Schwenken in Entfärbelösung herausgewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Hintergrund vollständig entfärbt war, so dass zwischen 2-18 Stunden vorsichtig geschüttelt wurde.

3.9 Western Blot Analyse

Die Methode des Western Blots diente dem immunochemischen Nachweis der Proteine nach vorhergegangener Auftrennung in einer SDS-PAGE. Hierbei kamen zwei Methoden zum Einsatz. Für den Nachweis der Komplex I-Untereinheiten wurde die SDS-PAGE im großen Maßstab (Hoefer-Kammer) durchgeführt und der Vorgang des Elektroblots vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran in einer Tankblotapparatur durchgeführt. Hierbei wurde ein Strom von 350 mA für drei Stunden bei 4 °C verwendet. Nach einem kurzen Waschschrift mit PBS-Lösung wurde die Membran zur Visualisierung eines erfolgreichen Blotvorgangs für 2-3 min mit einer 0,1 %-igen Ponceau S in 1 %-iger Essigsäure gefärbt und die nicht durch Proteine besetzte Membran durch Waschen mit einer 1 %-igen Essigsäure entfärbt. Die Hintergrundabdeckung erfolgte durch eine 45 minütigen Inkubation mit 50 ml

Magermilch-Lösung (1,5 g Magermilch in 50 ml PBS). Anschließend wurde mit 50 ml PBST bei Raumtemperatur für fünf Minuten gewaschen und die Antikörper-Lösung für 14-18 Stunden bei 4 °C mit der Membran geschwenkt. Hieran schlossen sich vier fünfminütige Waschschrte mit jeweils 50 ml PBST-Lösung bei Raumtemperatur und anschließend eine einstündige Inkubation mit 2µl Protein-A-Meerrettichperoxidase (1 mg/ml) in 30 ml PBST. Die Membran wurde jeweils zweimal mit 50 ml PBS-Lösung und 50 ml 10 mM Na₂HPO₄-Lösung (pH 7,4) gewaschen. Die Färbung der markierten Proteine erfolgte durch die Anwendung von 30 ml Färbelösung und 100 µl 5%-iger H₂O₂-Lösung. Abschließend wurde die Färbereaktion durch intensives Waschen mit Wasser gestoppt und der Blot fotografiert oder eingescannt.

Die SDS-PAGE im kleinen Maßstab dagegen wurde im Halbtrockenverfahren (*semi-dry-method*) auf eine Methanol - aktivierte PVDF-Membran transferiert. In der Blotapparatur wurde die Übertragung der Proteine bei 0,1 A / Blot für 1 Stunde 15 Minuten durchgeführt. Die Hintergrundabdeckung erfolgte mit Blockpuffer für mindestens 30 Minuten. Der Antikörper α-HIS wurde in einer 1:1000 Verdünnung in TBS-Puffer mit 3 % BSA eingesetzt und nach der einstündigen Inkubation durch zweimaliges Waschen mit TBST- und einmalig mit TBS-Lösung wurde die Membran gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem Zweit-Antikörper für 45 Minuten inkubiert (α-Maus-Meerrettichperoxidase 1:20000 in TBS mit 10% Milchpulver). Nach vier zehnminütigen Waschschrten mit TBST wurde die Detektion der Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL Advanced Kits (GE Healthcare) entsprechend der Herstellervorschrift durchgeführt.

3.10 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* Zellkulturen erfolgt in LB-Medium mit dem Zusatz des jeweiligen Antibiotikums entsprechend der verwendeten Plasmidresistenz. Zum Inokulieren der Medien wurde entweder eine Einzelkolonie verwendet, die durch Ausstreichen der Stammkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum und 18-stündiger Inkubation bei 37 °C angezogen wurde oder direkt von einer Stammkultur. Flüssigkulturen für die Plasmidisolierung wurden bei 37 °C und 180-200 Upm für 12-18 Stunden in einem Schüttelinkubator angezogen. Für die heterologe Expression von Proteinen wurden 2 I-Medien verwendet. Zur dauerhaften

Lagerung von Bakterienstämmen wurden Stammkulturen angesetzt. Hierzu wurden 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl einer 50 %-igen sterilen Glycerinlösung versetzt und bei -70 °C gelagert.

3.10.1 Transformation von *E. coli*

Für die Plasmid - Transformation von *E. coli* wurden entweder Zellen kommerziellen Ursprungs oder selbst hergestellte Zellen verwendet. Die Erzeugung chemisch – kompetenter Zellen erfolgte entsprechend dem Hanahan-Protokoll nach der RbCl₂-Methode (Hanahan 1983). Zur Transformation wurden 100 µl Aliquots auf Eis aufgetaut und mit der entsprechenden Plasmidmenge zwischen 10 ng-1000 ng versetzt und 10-30 Minuten auf Eis inkubiert. Hieran schloss sich ein Hitzeschock von 45-55 Sekunden entsprechend den Herstellerprotokollen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis 1 Minute inkubiert und mit 1 ml LB- oder SOC-Medium versetzt. Die Regeneration erfolgte bei 37 °C für 1 Stunde und leichtem Schütteln bei 140 – 180 Upm. Vor dem Ausstreichen auf die LB-Agarplatte wurden die Zellen durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 4000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C) sedimentiert und in 100 µl LB- oder SOC-Medium resuspendiert. Die Agarplatten wurden für 16-18 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.11 Arbeiten an *Neurospora crassa*

3.11.1 Kultivierung von *N. crassa*

Für die Kultivierung sowohl des Wildtyps wie auch der Deletionsmutanten wurden Schrägagarröhrchen mit den Hyphen der entsprechenden Stämme angeimpft und mehrere Tage unter konstantem Lichteinfluss bei 28 °C angezogen (Sebald, Neupert et al. 1979). Bei der Benötigung größerer Mengen an Makrokonidien wurden die Hyphen der Schrägagarröhrchen auf mehreren Agarböden angezogen. Hierbei erfolgte zunächst eine zwei- bis dreitägige Anzuchtphase bei 20 °C ohne Lichteinfluss. Bei sichtbarem Wachstum der Hyphen wurde die Kultivierung für mehrere Tage unter konstantem Lichteinfluss bei 24 °C fortgesetzt. Die Hyphen des Agarboden wurden durch Schütteln mit ca. 20-30 ml sterilem Wasser geerntet.

Die Anzucht von 2-4 g Hyphen erfolgte in 100 ml Flüssigmedien in Erlenmeyerkolben. Hierfür wurden die Konidien und Hyphen eines bewachsenen Schrägagarröhrchens mit 1,5 ml sterilem Wasser resuspendiert und das Medium inokuliert. Anschließend wurden die Medien für 24-36 °C in einem Schüttelinkubator bei 28 °C und 180 Upm inkubiert und das gewachsene Mycel zur Ernte filtriert und bei -20 °C tiefgefroren.

3.11.2 Transformation von *N. crassa*

Zur Komplementierung der Defekte der Deletionsmutanten wurden diese auf Agarböden angezüchtet und mit ca. 20-30 ml sterilem Wasser geerntet und die Hyphen von den Makrokonidien durch Filtration über sterile Glaswolle abgetrennt. Die Makrokonidien wurden durch einen zehnmütigen Zentrifugationsschritt bei 4000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C) sedimentiert und in 1 M Sorbit – Lösung resuspendiert. Die Konidienzahl wurde mit Hilfe einer Thomazählkammer bestimmt und auf $6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt. Die Herstellung von Protoplasten erfolgte durch die zweistündige Inkubation mit 24 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma Aldrich 1-1412) bei 28 °C und leichtem Schütteln. Anschließend wurden diese durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 2000 Upm und 4 °C die Konidien sedimentiert und zweimal mit jeweils 1 ml der 1 M Sorbit-Lösung und einmal mit der Elektroporationslösung gewaschen. Die Konidienkonzentration wurde auf $6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ eingestellt und jeweils 400 µl der Suspension mit 4 µg der jeweiligen linearisierten Plasmid-DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Hierauf folgte die Transformation der Konidien durch drei Elektroporationsvorgänge bei 1200 V für 350 µs im Abstand von jeweils einer Minute. Im direkten Anschluss wurde der Elektroporationsansatz auf zwei sterile Reagenzgläser verteilt und mit jeweils 1 ml Regenerationslösung für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Konidien bei 28 °C für mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln regeneriert. Jeder Transformationsansatz wurde mit ca. 10 ml auf 30 °C abgekühlter Topagarose versetzt und auf große Sorboseplatten durch Schwenken verteilt.

Nach vier bis zehn Tagen konnten die Transformanten mit Hilfe steriler Zahnstocher auf Schrägagarröhrchen übertragen werden.

3.11.3 Erzeugung von Mikrokonidien

Die Erzeugung von Mikrokonidien erfolgte unter Luftausschluss auf Mikrokonidienplatten (Pandit und Maheshwari 1993). Hierbei wird das Agarmedium mit einer sterilen, gequollenen Cellophanfolie luftdicht abgedeckt und ein Loch in die Mitte der Folie mit einer sterilen Nadel oder ähnlichem gestochen. Diese Stelle wurde mit wenigen Sporen der entsprechenden Makrokonidien angeimpft und bei 25 °C im Dunkeln zehn Tage inkubiert. Anschließend wurde die Folie mit einer sterilen Pinzette entfernt und die Platte erneut für 24 Stunden bei 25 °C im Dunkeln inkubiert. Die gebildeten Mikrokonidien wurden durch wiederholtes Waschen mit 2 ml sterilem, bidest. Wasser von der Platte gewaschen und zur reinen Gewinnung von Mikrokonidien durch einen sterilen Einmalfilter mit der Porengröße 5 µm (Millipore) filtriert. Unterschiedliche Voluminaliquots wurden auf Sorboseplatten ausplattiert und einzeln gewachsene Kolonien auf Schrägagarröhrchen überführt und angezüchtet.

3.12 Charakterisierung der *Neurospora crassa* Deletionsmutanten

3.12.1 Mitochondrienisolierung aus *N. crassa* – kleiner Maßstab

Nach Anzucht von 2-4 g Hyphen (Feuchtmasse) in 100 ml Flüssigmedium bei 28 °C wurden diese durch Filtration geerntet und bei -20 °C eingefroren. Die Hyphen wurden in einem Mörser mit Pistill und 5-10 ml eiskaltem Isolationspuffer fein zerrieben, bis eine möglichst homogene Hyphensuspension entstanden ist. Das Volumen wurde beim Mörsern allmählich auf ein Volumen von 40 ml gebracht. Anschließend wurden die Proben in mit ca. 1/6 Volumen Glasperlen gefüllte 70 ml – Kugelmühlengefäße überführt und auf ein finales Endvolumen von 60 ml gebracht. In dem Zellhomogenisator (B. Braun, Melsungen AG) wurden die Zellen durch starkes Schütteln für 12 Sekunden aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Hyphenreste wurden in zwei zehnminütigen Zentrifugationsschritten bei 7000 Upm und 4 °C in einem SS-34 Rotor sedimentiert und abschließend die Mitochondrien durch Zentrifugation des Überstandes bei 18000 Upm als Sediment gewonnen. Sie wurden mit 200 µl zuckerfreiem versetzt, resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Zuvor wurde für die Proteinbestimmung nach Biuret jeweils 2 Aliquots mit 10 µl abgenommen.

3.12.2 Mitochondrienpräparation aus *N. crassa* – großer Maßstab

Die interessanten Deletionsmutanten wurden in mit Pressluft belüfteten 7,5 l Flüssigmedium angezüchtet. Die Inokulation erfolgt durch die Verwendung von 2 – 3 Agarböden und nach 2 Tagen wurde das Mycel durch Filtration über einen Büchnertrichter geerntet und bei -70 °C gelagert. Zwischen 80 und 300 g der Hyphen wurden grob zerschlagen und mit 500 – 750 ml Isolationspuffer in einem Mixer (Rotor GT800, Rotor) homogenisiert. Anschließend wurde die Hyphensuspension in eine Korundmühle (Eigenbau) gegeben und die Zellen aufgeschlossen. Die Schwebepartikel wurden durch eine zehnmündige Zentrifugation des Homogenisats bei 4500 Upm (Rotor H6000A, Zentrifuge RC 3B Plus Sorvall) und 4 °C sedimentiert. Zur Gewinnung der Mitochondrien wurde der Überstand für 105 Minuten bei 7500 Upm (Rotor SLC-6000) zentrifugiert und das Pellet in wenig Flüssigkeit und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator resuspendiert. Die Mitochondrien wurden in einem finalen Zentrifugationsschritt bei 19000 Upm (Rotor SS-34) sedimentiert und in 5 – 20 ml zuckerfreiem Isolationspuffer entsprechen der Größe des Pellets aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

3.12.3 Proteinbestimmung nach Biuret

Die Konzentrationsbestimmung wurde nach der Biuret Methode durchgeführt (Beisenherz, Boltze et al. 1953). Als Standard diente Serumalbumin vom Rind (bovine serum albumin, BSA) in unterschiedlichen Verdünnungen (jeweils 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µl einer 10 mg/ml BSA-Lösung). Von der jeweiligen Mitochondriensuspension wurden 10 µl Aliquots abgenommen und ebenso wie die Standardreihe mit 1 ml einer 6 %-igen Trichloressigsäure-Lösung zur Proteinfällung versetzt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die präzipitierten Proteine wurden durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14000 Upm (Tischzentrifuge Eppendorf 5415C) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur stark geschüttelt. Anschließend wurde unter den zuvor genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Extinktion der Lösung wurde bei 546 nm gemessen. Anschließend wurde zur Bestimmung der Extinktion der Hintergrund verursachenden Trübung die Proben durch die Zugabe von 40 µl einer stark gesättigten Lösung an KCN entfärbt, erneut zentrifugiert und die Extinktion ebenfalls bei 546 nm gemessen. Zur Berechnung der

Proteinkonzentration wurde die Differenz der beiden Messwerte mit der Standardreihe in Beziehung gesetzt.

3.12.4 Enzymatische Überprüfung der NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität

Das entsprechende Volumen von 4 – 10 mg Protein der entsprechenden Mitochondriensuspension wurden mit dem halben Volumen 20 %-igem (v/v) Triton X-100 versetzt, um die Proteine zu solubilisieren. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine zehnmütige Zentrifugation bei 4 °C und 14000 Upm sedimentiert und der Überstand auf einen Saccharosegradienten gegeben. Dieser wies ein Gesamtvolumen von 4 ml auf und der Konzentrationsgradienten umfasste 7,5 – 25 % Saccharose. Die Proteine werden entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten durch eine 16-stündige Zentrifugation bei 30000 Upm (TST 41.14 Rotor) aufgetrennt. Nach der Verteilung des Gradienten in 16 Fraktionen wurde die Aktivität des Komplex I anhand der NADH / Ferricyanid – Redoxaktivität und der Lokalisation der höchsten Aktivität bestimmt (Friedrich, Hofhaus et al. 1989). Zur Messung der Aktivität bei 410 nm wurde ein Photometer der Firma Thermo (Helios δ) verwendet. In die Messküvette wurde 1 ml Aktivitätspuffer, 10 μ l $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung (100mM) und 15 μ l NADH (0,1 mM) vermischt und kurz vor der Messung mit 5 – 15 μ l Probe versetzt. Hierbei wurde die Oxidation von NADH photometrisch durch die Reduktion von Kaliumhexacyanoferrat ($K_3[Fe(CN)_6]$) vermessen, welches einen molaren Extinktionskoeffizienten von $1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ aufweist (Friedrich, Hofhaus et al. 1989).

Um die Ergebnisse zu verifizieren wurde der enzymatische Test im großen Maßstab für interessante Deletionsmutanten wiederholt. Hierfür wurden Saccharosegradienten mit 12 ml Gesamtvolumen verwendet und aus der großen Mitochondrienpräparation (siehe 3.12.2) 40 mg Protein entsprechend obiger Vorschrift solubilisiert und auf die Gradienten aufgetragen. Die Zentrifugation erfolgte in einem TST41.14 Rotor bei 34000 Upm für 16 Stunden und der Gradient wurde in 24 Fraktionen geteilt. Die Messung der NADH / Ferricyanid – Redoxaktivität erfolgte analog zur obigen Beschreibung.

3.12.5 BlauNativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Komplex I-spezifischen Anfärbung des Komplex I in den BlauNativ-Gelen konnte die Existenz bzw. Abwesenheit des Enzyms verifiziert werden. Hierfür wurde das Volumen entsprechend 0,125 – 0,25 mg Mitochondrienprotein verwendet und bei 14000 Upm fünf Minuten und 4 °C sedimentiert. Zur Solubilisierung der Mitochondrienproteine wurden den Pellets 50 µl Solubilisierungspuffer mit 1 % n-Dodecylmaltosid (DDM) zugegeben und zehn Minuten auf Eis inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch einen fünfminütigen Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 14000 Upm abgetrennt. Pro Spur wurden 10µl einer Mischung aus 7,5 µl Überstand mit 3,5 µl 4x BlauNativ-Probenpuffer und 0,5 µl 20x BlauNativ-Kathodenpuffer verwendet. Es wurden die 4-16 %-igen NativePAGE™ Novex® Bis-Tris Gele des Herstellers Invitrogen verwendet und die Elektrophorese entsprechend Herstellervorschrift bei 4 °C durchgeführt. Hierbei wurde der beschriebene optionale Pufferwechsel durchgeführt, bei dem der „Darkblue“ – Puffer gegen den „Lightblue“ – Puffer nach ca. einer Stunde bei 150V ausgetauscht wurde, nachdem die Proteinfront das Gel zu einem Drittel durchwandert hatte. Danach wird die Elektrophorese bei 205 V fortgesetzt.

Die spezifische Komplex I-Färbung erfolgt durch eine Inkubation bei Raumtemperatur mit der Komplex I-Färbelösung zwischen 20-60 Minuten bezogen auf die gewünschter Intensität der Banden. Nach vorsichtigen Waschen und Einscannen der BlauNativ-PAGE kann mit der Komplex IV-Färbelösung der Komplex IV zusätzlich visualisiert werden.

3.12.6 Cytochrombestimmung

Mit Hilfe eines Zweistrahlphotometers (Perkin-Elmer) wurde der Gehalt der Cytochrome a, b und c der Mitochondrien bestimmt. Hierfür wurden 0,2 bis 0,5 ml Mitochondriensuspension mit 0,2 ml 20 % Triton X-100 versetzt und mit Isolationspuffer auf 2 ml Endvolumen aufgefüllt. Jeweils 1 ml dieser Mischung wurde in die Proben- und Referenzküvette gegeben und die Basislinie zwischen 650 und 500 nm aufgenommen. Anschließend wurden die Mitochondrien in der Probenküvette durch Zugabe von einigen Körnchen Natriumdithionit reduziert und das Differenzspektrum von dithionitreduzierter Probe minus luftoxidierter Referenz

gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration der drei verschiedenen Cytochrome wurden die folgenden Differenz-Extinktionskoeffizienten verwendet:

- Cytochrom a : 24 mM⁻¹cm⁻¹ zwischen 605-650 nm
- Cytochrom b : 25 mM⁻¹cm⁻¹ zwischen 560-580 nm
- Cytochrom c : 20 mM⁻¹cm⁻¹ zwischen 550-581 nm

3.12.7 Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie

Sowohl für die Aufreinigung heterolog exprimierter Proteine in *E. coli* wie zur Anreicherung der modifizierten Fusionsproteine in den komplementierten Mutanten von *N. crassa* wurden die Methode der Immobilisierten Metallionenchromatographie (IMAC) angewendet. Es wurden HiTrapChelating Säulen (GE Healthcare) mit Ni²⁺-Ionen beladen und die Polyhistidin-getaggten Proteine gezielt durch die Koordination der Imidazolringe der Histidine mit den freien Koordinationsstellen der Metallionen angereichert. Final wurden die Proteine mit einem Imidazolhaltigen Puffer kompetitiv eluiert. Unspezifische Wechselwirkungen der Metallionen mit Proteinen wurden bei niedrigen Imidazolkonzentrationen von der Säule verdrängt.

Für die Anreicherung der Hexahistidin-tag fusionierten Proteine aus *N. crassa* wurden 6 ml Mitochondriensuspension mit 3 ml einer 20 %-igen Triton X-100 Lösung versetzt und mit einem Teflon-in-Glas-Homogenisator vermischt. Anschließend wurde das Solubilisat mit Resuspensionspuffer auf ein Envolumen von 45 – 50 ml gebracht und zur Sedimentation unlöslicher Bestandteile bei 42000 Upm für eine Stunde bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem die Säule mit Resuspensionspuffer äquilibriert wurde, erfolgte die Beladung mit dem klaren Überstand des Ultrazentrifugats mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit Resuspensionspuffer und anschließend mit einer Mischung beider Puffer (der Anteil des Elutionspuffers machte hierbei einen Volumenanteil von 5 % aus) in Form eines Stufengradienten gewaschen, bis keine Proteine mehr von der Säule eluierten. Anschließend wurden durch einen linearen Gradienten des Elutionspuffers über 30 Minuten die mit dem Säulenmaterial interagierenden Proteinen eluiert, die Fraktionen gesammelt und mit Hilfe von SDS-PAGE- und Western Blot- Methoden analysiert.

Die Aufreinigung der Hexahistidin-Fusionsproteine aus *E. coli* wurden analog über die HiTrap Chelating Säule gereinigt, jedoch zuvor die Expressionskulturen entweder

durch mechanische Verfahren an einem Hochdruckhomogenisator (Cell Disruptor, Constant Systems) oder durch Ultraschallbehandlung der Zellen (Sonopuls HD 2200, Bandelin) aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt grobe Bestandteile sedimentiert (bei 8000 Upm für 20 Minuten und 4 °C) und der Überstand zur Abtrennung weiterer unlöslicher Bestandteile durch eine einstündige Zentrifugation bei 42000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde für die IMAC verwendet.

Zur weiteren Aufreinigung wurde die Ionenaustauschchromatographie angewendet, mit der die Proteine aufgrund ihres isoelektrischen Punktes und der Anwendung verschiedener pH-Werte aufgetrennt wurden. Hierfür wurden interessante Fraktionen der Affinitätschromatographie vereinigt und durch Filtrationszentrifugation nach Herstellervorschrift (Amicon-Filtrationseinheit, 50 kDa Porenausschlussgröße, Millipore) mit salzfreiem Puffer gewaschen und konzentriert. Anschließend erfolgte die Beladung einer 1 ml Anionenaustauschsäule (HiTrap Q HP Säule, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit einem Niedrigsalzpuffer von der Säule eluiert und anschließend mit einem linearen Salzkonzentrationsgradienten mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min zwischen 20-30 Minuten mit einer finalen Salzkonzentration von 1 M NaCl die Proteine eluiert. Während der Chromatographie wurden Fraktionen für die Untersuchung durch SDS – PAGE und Western Blot aufgefangen.

3.12.8 Massenspektrometrie

Zur eindeutigen Identifizierung von Proteinen in Coomassie-gefärbten SDS-PAGE – Gelen wurde die Massenspektrometrie angewendet. Hierfür wurde die interessante Bande mit einem Skalpell mit möglichst wenig umgebenden Gelmaterial ausgeschnitten und einem tryptischen Verdau unterzogen. Die Vorbereitung des Gels, die Durchführung der Massenspektrometrie, die Detektion der Peptidstücke, ebenso die Auswertung der Daten erfolgte im Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum der Universität Düsseldorf (BMFZ).

3.13 Charakterisierung des RNA-Metabolismus

3.13.1 Isolierung von RNA

Alle Geräte wurden entweder durch Hitzesterilisation oder intensives Spülen mit sterilem Wasser von möglichen RNAsen dekontaminiert.

Es wurden 2 – 3 g schockgefrostete Hyphen aus Flüssigkultur in einem mit flüssigen Stickstoff vorgekühlten Mörser und Pistill fein zermahlen. Das Zellpulver wurde in einen 100 ml Weithals-Erlenmeyerkolben mit 7 ml auf 50 °C vorgewärmten RNA-Isolierungspuffer versetzt und unter Rühren auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden dem homogenen Gemisch 7 ml puffergesättigtes Phenol hinzugegeben und 20 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde durch eine zehnminütige Zentrifugation in einem SS34-Rotor bei 7000 Upm bei 4 °C die wässrige von der organischen Phase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde erneut für 15 Minuten unter Zugabe 1 Vol. Phenol / 1 Vol. Chloroform gerührt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Hieran schloss sich eine Chloroformextraktion mit 1 Vol. durch erneutes zehnminütiges Rühren und anschließendes Zentrifugieren. Hiernach wurden die Nukleinsäuren durch eine zweistündige Inkubation bei -20 °C gefällt, nachdem die wässrige Phase in einem sterilen 30 ml Corex-Zentrifugenröhrchen mit 1/10 Vol. Natriumacetat und 1 Vol. Isopropanol versetzt worden ist. Die durch eine zehnminütige Zentrifugation bei 9000 Upm sedimentierten Nukleinsäuren wurden getrocknet und anschließend mit 2 ml Borat-Puffer versetzt. Die Solubilisierung der RNA auf Eis wurde zwischen 30 Minuten und mehreren Stunden vollzogen. Nicht lösliches Material wurde bei einer zehnminütigen Zentrifugation bei 9000 Upm sedimentiert und vom Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde mit 1/3 Vol. LiCl- Lösung versetzt und hierdurch die hochmolekulare RNA präzipitiert. Die ausgefällte RNA wurde bei einem zehnminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 Upm und 4 °C sedimentiert, getrocknet und in 100 – 200 µl DEPC – behandeltem Wasser aufgenommen.

3.13.2 Native RNA-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wurden native RNA-Gelelektrophoresen durchgeführt, um den Abbau und die Präsenz der beiden mit Ethidiumbromid sichtbaren rRNA-Banden zu beurteilen. Um die RNA-Degeneration

zu minimieren, wurden sterile Medien und mit sterilem Wasser gespülte Instrumente verwendet. Zu diesem Zweck wurde ein 1,2 % Agarosegel mit 1x MOPS-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf 60 °C mit 70µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Das entsprechende Volumen von 1 µg RNA wurde mit Auftragungspuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen.

3.13.3 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Ein großes Gel mit 400 ml Gesamtvolumen (1,2 % Agarose, 1x MOPS- Puffer, 1,8 % Formaldehyd) wurde in einer großen Gelkammer gegossen und 30 Minuten in dem Laufpuffer (1x MOPS-Puffer mit 2 % Formaldehyd) inkubiert. Pro Spur wurden rechnerisch 6 µg RNA eingesetzt und mit 5 µl RNA-Auftragungspuffer und DEPC-behandeltem ddH₂O auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht. Die Gelelektrophorese wurde bei 100 V durchgeführt, bis die Methylenblau-Färbung 2/3 des Gels durchwandert hat.

3.13.4 Northern Blotting

Das denaturierende Gel nach der Elektrophorese wurde für 10 Minuten vorsichtig in sterilem Wasser geschwenkt. Hieran schloss sich eine Behandlung mit 50 mM NaOH-Lösung für 15 Minuten zur partiellen Hydrolyse der RNA und der damit verbundenen Erleichterung des Blotvorgangs. Anschließend wurde das Gel mehrmals für jeweils 10 Minuten in 10x SSC-Lösung geschwenkt, bis der pH den Wert 8 nicht mehr überschritten hat (2-3 Wiederholungen).

Der Northern-Transfer wurde durch die Methode des Kapillarblottings ermöglicht. Das Gel lag hierbei in der Horizontalen auf einer Lage saugfähigen Whatman-Papiers, welches in ein Reservoir mit 20 x SSC-Puffer reichte. Hierdurch ist die Versorgung mit Puffer beim Blotvorgang gewährleistet. Auf das Gel wurde luftblasenfrei eine in 20 x SSC getränkte Nylonmembran (Biodyne B, Pall) gegeben und hierauf unter Vermeidung eines direkten Kontakts zum Gel viele Lagen saugfähiges Papier. Final wurde zur Beschwerung auf einer Platte ein Gewicht von ungefähr 0,5 kg positioniert und der Blotvorgang für 18 Stunden durchgeführt. Nach Abbau der Transferapparatur wurde die Nylonmembran mit der nach oben gerichteten RNA-Seite in einem UV-Bestrahlungsgerät (UV Crosslinker, Amersham

Life Sciences) mit $30000 \mu\text{J}/\text{cm}^2$ zur Fixierung der RNA bestrahlt. Anschließend wurde die rRNA und die Banden des verwendeten RNA-Größenstandards (RiboRuler[®], Fermentas) durch eine einminütige Färbung mit Methylblau und anschließendem Waschen in sterilem Wasser sichtbar gemacht und entsprechend markiert. Durch Waschen mit 1x SSPE und 1% SDS-Lösung konnte die Membran entfärbt werden. Die Membran wurde anschließend für die Hybridisierung verwendet. Hierfür wurde die Membran in geeignete Glasröhren, welche mit auf $64 \text{ }^\circ\text{C}$ erhitztem Hybridisierungspuffer gefüllt waren, gegeben und für eine Stunde im Hybridisierungssofen unter Drehbewegungen inkubiert. Nach jeweils 30 Minuten wurde der Hybridisierungspuffer ausgewechselt, wobei Temperaturschwankungen vermieden wurden. Beim dritten Pufferwechsel wurden 10 ml Puffer mit dem vollständigen Ansatz jeweils einer markierten Sonde versetzt ($27,5 \mu\text{l}$ aus Markierungsansatz, Durchführung siehe Abschnitt 3.13.5) und für 14-18 Stunden im Hybridisierungssofen hybridisiert. Die Membran wurde anschließend zweimal für 10 Minuten mit Waschpuffer (2x SSC, 0,1 % SDS) bei $64 \text{ }^\circ\text{C}$ gewaschen. Hieran schloss sich ein zehnminütiger Waschschrift bei Raumtemperatur und der Vermessung der Radioaktivität über der Membran. Bei über 100 IPS (Impulse pro Sekunde) wurde ein maximal fünfminütiger Waschschrift mit einem stringenten Waschpuffer (0,1x SSC, 0,1% SDS) durchgeführt. Die Membran wurde abschließend in Folie eingeschlungen und das Autoradiogramm durch Auflegen der Imaging Plate (BAS-IP MP 2025, Fuji) für 2 Stunden bis zu 2 Wochen aufgenommen und die Banden im Bioanalyzer Fuji BAS 1800 detektiert.

3.13.5 Markierung der DNA-Sonden für die Northern Blot-Hybridisierung

Nach Herstellerangaben wurde das DecaLabel[™] DNA Labeling Kit (Fermentas) zur Markierung der PCR-Produkte angewendet. Es wurde jedoch nur der halbe Ansatz pro Sonde und $25 \mu\text{Ci}$ [α - ^{32}P]-dATP (3000 Ci/mmol) eingesetzt.

3.13.6 In-vivo Markierung der mitochondrial kodierten Proteine

Die Anzucht der Hyphen für die in-vivo Markierung der mitochondrial kodierten Proteine mit [^{35}S]-Met/Cys erfolgte analog der Anzucht in 100 ml Flüssigkultur (siehe 3.11.1). Nach 24-30 Stunden Wachstum (exponentielle Wachstumsphase) wurden die Kulturen mit jeweils 1 ml einer 10 mg/ml Cycloheximid-Lösung versetzt

(Konzentration im Medium betrug 10 µg/ml), 20 Sekunden geschwenkt und mit 150-300 µCi oder für eine höhere spezifische Radioaktivität mit 1,8 mCi [³⁵S]-Met/Cys (1175Ci/mmol für L-[³⁵S]-Met, 1075Ci/mmol für L-[³⁵S]-Cys) versetzt. Nach einer Stunde Wachstum wurden die Hyphen geerntet (Ise, Haiker et al. 1985; Tuschen, Sackmann et al. 1990). Die Isolierung erfolgte analog der Mitochondrienisolierung (siehe 3.12.1) unter Modifizierung des Zentrifugationsschritts zur Sedimentation der Mitochondrien. Hierfür wurde ein JA-20 Rotor mit 10000 Upm für 75 Minuten verwendet.

Zur Analyse der markierten Proteine wurde eine SDS-PAGE im großen Maßstab mit jeweils 400 oder 150 µg Protein pro Spur durchgeführt und das Gel mit einem Geltrockner vor der autoradiographischen Auswertung getrocknet. Die Inkubation der Imaging Plate erfolgte zwischen 2 Stunden bis zu 2 Wochen.

3.13.7 Immunopräzipitation

Von einer Mitochondriensuspension wurde das 1 mg Protein entsprechende Volumen mit 1 ml IP-Lysispuffer für 30 min auf Eis lysiert. Die nicht lysierten Bestandteile wurden für 30 min bei 13.000 Upm und 4°C (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) pelletiert und der Überstand abgenommen. Zu dem Überstand wurden jeweils 8 µl Antikörper-Serum hinzugegeben und 1 Stunde bei 4 °C rotierend inkubiert. Die Protein G-Sepharose (PGS) wurde zweimal mit dem Waschpuffer B gewaschen und durch kurze Zentrifugation sedimentiert. Abschließend wurde das Sediment im Verhältnis 1:1 mit dem Waschpuffer B gemischt. Die Mitochondrienüberstände wurden nach der Inkubation mit den Antikörpern kurz zentrifugiert und der klare Überstand mit 40 µl der aufgeschwämmten PGS-Suspension versetzt und für 18 Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Hieran anschließend wurde durch eine kurze Zentrifugation von 10 Sekunden die Protein G-Sepharose mit den präzipitierten Proteinen sedimentiert, dreimal das Sediment mit 1 ml Waschpuffer B, zweimal mit 1 ml Waschpuffer C und einmal mit 1 ml Waschpuffer D aufgeschwämmt und kurz zentrifugiert. Zur Elution wurde auf das Pellet 60 µl IP-SDS-Probenpuffer gegeben und der Überstand direkt in die Taschen einer SDS-PAGE im großen Maßstab gegeben. Vor der Aufnahme des Autoradiogramms wurde das Gel getrocknet.

4 Ergebnisse

4.1 Eingrenzung und Identifizierung essentieller Proteine für die Komplex I-Biogenese

Der Komplex I zeigt sich in vielen aeroben Organismen als essentieller Bestandteil der Atmungskette. Ausnahmen bilden hierbei Organismen, die neben dem Komplex I alternativen NADH-Dehydrogenasen und Ubichinol-Oxidasen aufweisen, wozu beispielsweise viele Pflanzen und Pilze gehören wie auch der in dieser Arbeit genutzte Hyphenpilz *Neurospora crassa*. Hervorzuheben sind des Weiteren Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, die vollständig auf den Komplex I verzichten und nur alternative, nicht-protonenpumpende Dehydrogenasen wie NAD1 verwenden (de Vries und Marres 1987; de Vries und Grivell 1988). Dieser Sachverhalt wurde genutzt, um über eine manuelle in-silico-Sequenzanalyse in einem differentiellen Genomvergleich Proteine zu identifizieren, die mit der Existenz des Komplex I korrelierten (Ogilvie, Kennaway et al. 2005). Es ist anzunehmen, dass Organismen, die infolge ihrer evolutionären Entwicklung auf den Komplex I verzichtet haben, einen stufenweisen Verlust der obsoleten Untereinheiten und ihrer Gene aufweisen. Dies kann dementsprechend auch für die spezifischen Biogeneseproteine des Komplex I postuliert werden. Ein Genomvergleich mit der Subtraktion konservierter Proteine sowohl in Organismen mit Komplex I wie auch ohne ebendiesen sollte demnach zu einer Eingrenzung von Komplex I-Untereinheiten und bekannter und potentieller Biogenesefaktoren führen. Zu diesem Zweck wurden die Informationen der Online-Datenbank Génolevures⁷ genutzt, welche eine komparative Genomanalyse verschiedener Hemiascomyceten durchführte, um Proteine aufgrund ihrer Sequenzhomologie in Proteinfamilien einzuteilen, die sowohl orthologe wie paraloge Proteine eines Proteins / einer Proteinklasse aufweisen (Sherman, Martin et al. 2009). Gegenwärtig beinhaltet die Datenbank die Informationen von neun verschiedenen vollständig sequenzierten Hefegenomen. Zum Zeitpunkt der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung lag der Genomvergleich von fünf vollständig sequenzierten Genomen von *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida glabrata*, *Debaryomyces hansenii* und *Yarrowia lipolytica* vor. Von diesen besitzen ausschließlich die Hefen *D. hansenii* und *Y. lipolytica* einen Komplex I. Ausgehend

⁷ <http://genolevures.org/>

von den Proteinfamilien, die nur Mitglieder von *D. hansenii* und *Y. lipolytica* beinhalten, wurde die Analyse um das Genom von *N. crassa* erweitert. Der Hyphenpilz *N. crassa* besitzt ebenfalls einen Komplex I und wurde ausgewählt, die Gendeletionsstudien durchzuführen. Die Identifizierung von orthologen Proteinen in *N. crassa* wurde mit Hilfe des BLAST-Algorithmus vorgenommen. Dabei wurden die 283 Proteinfamilien, die ausschließlich Proteine der Hefen *D. hansenii* und *Y. lipolytica* aufgewiesen haben, um weitere 78 Familien reduziert, da diese kein orthologes Protein in *N. crassa* aufgewiesen haben. Bei 151 Proteinfamilien ließ sich ein einzelnes, homologes Protein in *N. crassa* bestimmen. Bemerkenswerterweise gehörten in diese Gruppe 28 der 32 kernkodierten Komplex I-Untereinheiten. Hierunter fiel auch eine Untereinheit des Komplex I (ncu04781), die bislang in der *N. crassa*-Genom-Datenbank MIPS nicht als solche annotiert war. Lediglich vier Untereinheiten konnten nicht über die Anwendung der Kriterien für den differentiellen Genomvergleich identifiziert werden. Bei 54 Proteinfamilien waren mehrere Treffer in *N. crassa* identifizierbar, die zu insgesamt 340 zusätzlichen Proteinen führten. Dies kann durch eine geringere Sequenzkonservierung entweder der Proteinfamilienmitglieder der Hefen *D. hansenii* und *Y. lipolytica* oder der entsprechenden homologen Proteine von *N. crassa* bedingt sein. Insgesamt ließen sich durch dieses Methode 491 Proteine in *N. crassa* als potentielle Biogenesefaktoren identifizieren. Zusammenfassend dargestellt sind die Ergebnisse in nachfolgender Tabelle 4.1.

Tab. 4.1.: Übersicht und Klassifizierung der eingegrenzten Proteine durch den differentiellen Genomvergleich.

	Proteinfamilien mit <i>N. crassa</i> Mitgliedern > 1			Proteinfamilien mit <i>N. crassa</i> Mitgliedern = 1			Gesamtzahl aller potentiellen Proteine
	Hypothetische Proteine (Klassifizierung: <i>putative,</i> <i>hypothetical,</i> <i>conserved</i> <i>hypothetical</i>)	hohe Homologie zu bekannten Proteinen (Klassifizierung: <i>related to</i>)	bekannte Funktion	Hypothetische Proteine (Klassifizierung: <i>putative,</i> <i>hypothetical,</i> <i>conserved</i> <i>hypothetical</i>)	hohe Homologie zu bekannten Proteinen (Klassifizierung: <i>related to</i>)	bekannte Funktion	
Anzahl	167	158	15	81	45	25	491
Summe der Proteine	340			151			

Die Zuordnung und Annotation der Proteine wurde anhand der Informationen der MIPS⁸- oder BROAD⁹- Online-Datenbank durchgeführt, welche die gesamten

⁸ MNCDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/>

Informationen der Genomsequenzierung mit manuell oder automatisch identifizierten Gensequenzen und ihrer Annotationen zur Verfügung stellt. Hierbei sollte jedoch angemerkt werden, dass die Datengrundlage nicht als aktuell zu betrachten ist und demnach nicht alle Ergebnisse zu bekannten Funktionen dem jetzigen Stand der Forschung entsprechen. Ein manueller Abgleich der interessanten Proteine ist demnach notwendig. Darüber hinaus war es auffällig, dass gerade die konservierten Proteine mit jeweils einem Vertreter von *D. hansenii* und *Y. lipolytica* in einer Proteinfamilie und einem entsprechenden homologen Protein in *N. crassa* einen hohen Homologiegrad (entsprechend geringer E-value als Ausdruck der Sequenzähnlichkeit) aufgewiesen haben und demnach eine eindeutige, konservierte Funktion postuliert werden kann.

Die Bedeutung des jeweilig bestimmten Proteins für die Biogenese des Komplex I wurde anhand der Auswirkungen von Gendeletionen auf die An- oder Abwesenheit der Komplex I-Aktivität überprüft.

Insgesamt wurden zu den 491 potentiellen Proteinen bisher 248 Deletionsmutanten untersucht. 70 Deletionsmutanten liegen lediglich als heterokaryote Mutanten vor, in denen gemischterbig sowohl das mutierte Genom als auch das Genom des ursprünglich verwendeten Transformationsstamm vorliegt und in denen die Auswirkung der Gendeletion daher nicht zu Tage treten. Dies ist immer der Fall, wenn aufgrund von letalen Effekten einer Gendeletion keine homokaryotische Mutante hergestellt werden konnte. 27 der potentiellen Proteine waren Komplex I-Untereinheiten und wurden demnach ebenfalls nicht untersucht. Eine weitere Untereinheit (ncu04781) war wir bereits erwähnt nicht als solche annotiert und wurde zunächst ebenfalls untersucht. Zusammenfassend fehlen also noch 146 Gene, die in Form von Deletionsmutanten auf ihren Einfluss für den Komplex I untersucht werden können.

Die Deletionsmutanten wurden vom *Neurospora Genome Project* erzeugt (die Methode wurde in Kapitel 2.5.1 erläutert) und vom *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC) bezogen. Die jeweils angegebene fünfstellige Nummer entspricht der Bestellnummer des FGSC und ist eindeutig einer Deletionsmutante zuzuordnen.

Nachfolgend in der Tabelle 4.2 sind alle Deletionsmutanten aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind.

⁹ BROAD Institute, *Neurospora crassa* Database;
<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>

Tab. 4.2: Die überprüften Mutanten mit aktivem Komplex I. Das deletierte Gen ist jeweils der FGSC-Nummer zugeordnet und die angewendete Methode zur Überprüfung der Aktivität ist angegeben. + / - steht für die entsprechend angewendete Methode. Teilweise wurden beide Methoden angewendet, sodass zweimal ein + angegeben ist.

Stamm FGSC	Gen	enzym. Test	BN-PAGE	Stamm FGSC	Gen	enzym. Test	BN-PAGE	Stamm FGSC	Gen	enzym. Test	BN-PAGE	Stamm FGSC	Gen	enzym. Test	BN-PAGE
11001	NCU06799	+	-	12561	NCU00124	+	-	16166	NCU02127	-	+	19199	NCU08953	+	-
11017	NCU06407	+	-	12632	NCU06664	+	-	16234	NCU00403	+	-	19204	NCU09099	+	-
11030	NCU07788	+	-	12651	NCU06643	+	-	16248	NCU01147	-	+	19210	NCU01016	+	-
11054	NCU02307	+	-	12660	NCU00226	+	-	16278	NCU04099	-	+	19242	NCU02159	-	+
11061	NCU08443	+	-	12675	NCU08828	-	+	16335	NCU03092	+	-	19247	NCU02227	-	+
11073	NCU04001	+	-	12690	NCU07919	+	-	16336	NCU03103	+	-	19257	NCU04228	-	+
11074	NCU05294	+	-	12751	NCU02134	+	-	16340	NCU00045	+	-	19262	NCU04505	-	+
11101	NCU01629	+	-	12852	NCU02012	+	-	16380	NCU09346	+	-	19275	NCU05037	-	+
11116	NCU06411	+	-	12872	NCU00073	+	-	16550	NCU01086	-	+	19397	NCU07506	+	-
11128	NCU03356	+	-	12993	NCU03714	+	-	16559	NCU01404	+	+	19516	NCU03283	+	-
11131	NCU03905	-	+	13020	NCU06543	-	+	16571	NCU02537	+	-	19523	NCU07298	-	+
11132	NCU04179	+	-	13072	NCU00914	+	-	16716	NCU04727	+	-	19557	NCU07415	-	+
11149	NCU03421	+	-	13073	NCU09482	+	-	16741	NCU01335	+	-	19577	NCU07735	+	-
11150	NCU00278	+	-	13111	NCU02069	-	+	16768	NCU00659	+	-	19597	NCU07868	+	-
11158	NCU02795	+	-	13124	NCU09576	+	-	16792	NCU04512	+	-	19629	NCU08058	-	+
11259	NCU08875	+	-	13165	NCU01777	+	-	16794	NCU04603	+	-	19726	NCU00899	+	-
11287	NCU01181	+	+	13366	NCU01904	-	+	16813	NCU04442	+	-	19727	NCU00928	+	-
11316	NCU04096	-	+	13406	NCU05261	+	-	16819	NCU04393	-	+	19797	NCU02431	+	-
11319	NCU06419	+	-	13489	NCU06881	+	-	16829	NCU04637	+	-	19806	NCU02565	+	+
11322	NCU00406	+	+	13868	NCU01879	+	-	16838	NCU04874	+	-	19807	NCU02601	+	-
11324	NCU03894	+	-	13882	NCU01922	+	-	16872	NCU02310	+	-	19839	NCU03890	+	-
11326	NCU02234	+	+	13894	NCU01971	+	-	16996	NCU01105	+	-	19851	NCU06035	-	+
11338	NCU09064	+	-	13898	NCU01984	+	-	17175	NCU01180	+	-	19887	NCU02600	+	-
11344	NCU02666	+	-	13958	NCU02937	+	-	17196	NCU02547	+	-	19896	NCU00592	+	-
11397	NCU00090	+	-	13999	NCU03088	+	+	17419	NCU03851	+	-	19904	NCU05607	+	-
11449	NCU02764	+	-	14009	NCU05782	+	-	17451	NCU01023	+	-	19958	NCU06724	-	+
11528	NCU01320	-	+	14024	NCU07874	+	-	17457	NCU01305	+	+	19965	NCU00092	+	-
11536	NCU06177	+	-	14026	NCU09013	+	-	17560	NCU04750	+	-	19971	NCU02467	-	+
11545	NCU09212	+	-	14065	NCU03571	+	-	17739	NCU04741	+	-	19978	NCU05753	-	+
11632	NCU05196	+	-	14133	NCU01477	+	-	17817	NCU04937	+	-	19995	NCU06275	-	+
11762	NCU08891	-	+	14152	NCU02287	+	+	17876	NCU00183	+	+	20112	NCU06461	+	+
11791	NCU00828	+	-	14173	NCU03053	+	-	17919	NCU09649	+	-	20123	NCU00219	+	-
11796	NCU01830	+	-	14202	NCU02068	+	-	17939	NCU03200	+	+	20138	NCU05886	+	-
11798	NCU02126	-	+	14241	NCU03342	-	+	17951	NCU05658	+	-	20162	NCU07092	+	-
11808	NCU01285	+	-	14283	NCU07197	+	-	17961	NCU06685	+	+	20206	NCU06610	+	-
11829	NCU02211	+	-	14349	NCU05846	+	-	17964	NCU07872	-	+	20242	NCU06625	+	-
11887	NCU04421	+	-	14519	NCU05984	+	-	18011	NCU06036	-	+	20245	NCU07929	+	-
11906	NCU05943	+	-	14636	NCU03338	+	-	18013	NCU05774	+	+	20253	NCU07663	+	-
11913	NCU06242	+	-	14815	NCU09447	+	-	18094	NCU07466	+	-	20310	NCU08398	+	-
11926	NCU07361	+	-	14910	NCU00675	+	-	18154	NCU07963	+	-	20323	NCU08516	+	-
11941	NCU08092	+	+	14919	NCU05633	+	-	18224	NCU08275	+	-	20422	NCU00813	+	-
11947	NCU08566	+	-	14925	NCU06276	+	-	18237	NCU07738	+	-	20449	NCU07684	+	+
11958	NCU09058	-	+	14945	NCU04781	+	+	18264	NCU02793	+	-	20702	NCU08825	-	+
11962	NCU09115	-	+	15038	NCU00170	+	-	18270	NCU07949	+	-	20778	NCU08532	-	+
11979	NCU01238	+	-	15055	NCU07183	+	-	18309	NCU01150	+	-	21064	NCU09532	+	-
11982	NCU08062	-	+	15310	NCU06629	+	-	18314	NCU01310	+	-	21086	NCU07858	+	+
11989	NCU06422	+	-	15333	NCU06565	+	-	18346	NCU08674	+	+	21091	NCU07899	+	-
12014	NCU09142	+	-	15340	NCU07277	+	-	18349	NCU08682	+	-	21093	NCU07928	+	-
12057	NCU06247	+	-	15350	NCU06935	+	-	18478	NCU09160	-	+	21125	NCU09215	+	-
12070	NCU03285	+	-	15353	NCU06977	+	-	18502	NCU06559	-	+	21142	NCU09402	+	-
12071	NCU03355	+	-	15422	NCU01339	+	-	18544	NCU09705	-	+	21147	NCU09517	+	+
12085	NCU03197	+	-	15497	NCU08994	+	+	18564	NCU09767	-	+	21155	NCU09553	+	-
12174	NCU05530	+	-	15522	NCU09541	+	-	18565	NCU09771	-	+	21175	NCU10049	+	-
12183	NCU05977	+	-	15580	NCU00361	+	-	18754	NCU03332	-	+	21177	NCU08692	-	+
12220	NCU00330	+	-	15588	NCU09222	+	-	18874	NCU05731	+	+	21189	NCU01479	+	+
12226	NCU06864	+	-	15660	NCU00236	+	-	18960	NCU02520	-	+	21221	NCU03439	+	+
12234	NCU01135	-	+	15725	NCU04198	+	-	18963	NCU03693	-	+	21253	NCU08658	+	-
12296	NCU06676	+	-	15838	NCU04827	+	-	19043	NCU07783	-	+	21305	NCU06041	-	+
12360	NCU01134	+	-	15849	NCU00158	+	-	19060	NCU08354	+	-	21387	NCU08558	-	+
12383	NCU03754	+	-	15867	NCU00317	+	-	19131	NCU04614	+	-	21457	NCU02970	-	+
12387	NCU03810	+	-	15924	NCU00598	+	+	19138	NCU04713	+	-	21480	NCU01757	-	+
12480	NCU03790	+	-	16008	NCU06907	+	-	19139	NCU04744	+	-				
12489	NCU00545	+	-	16115	NCU00593	+	-	19154	NCU04998	+	-				
12555	NCU06112	+	-	16153	NCU02291	-	+	19188	NCU08391	+	-				

4.2 Charakterisierung der Deletionsmutanten

Die Identifizierung von Deletionsmutanten mit Defekten im Komplex I wurde durch einen enzymatischen Test realisiert. Hierfür wurde durch Einsatz von Detergenzien der membrangebundene Komplex I aus isolierten Mitochondrien solubilisiert. Anschließend wurde der Komplex I bedingt durch seine Größe durch eine Ultrazentrifugation von anderen NADH-oxidierenden Enzymen getrennt und die Katalyse der NADH-Oxidation durch die Reduktion des wasserlöslichen artifiziellen Elektronenakzeptor Hexacyanoferrat III detektiert.

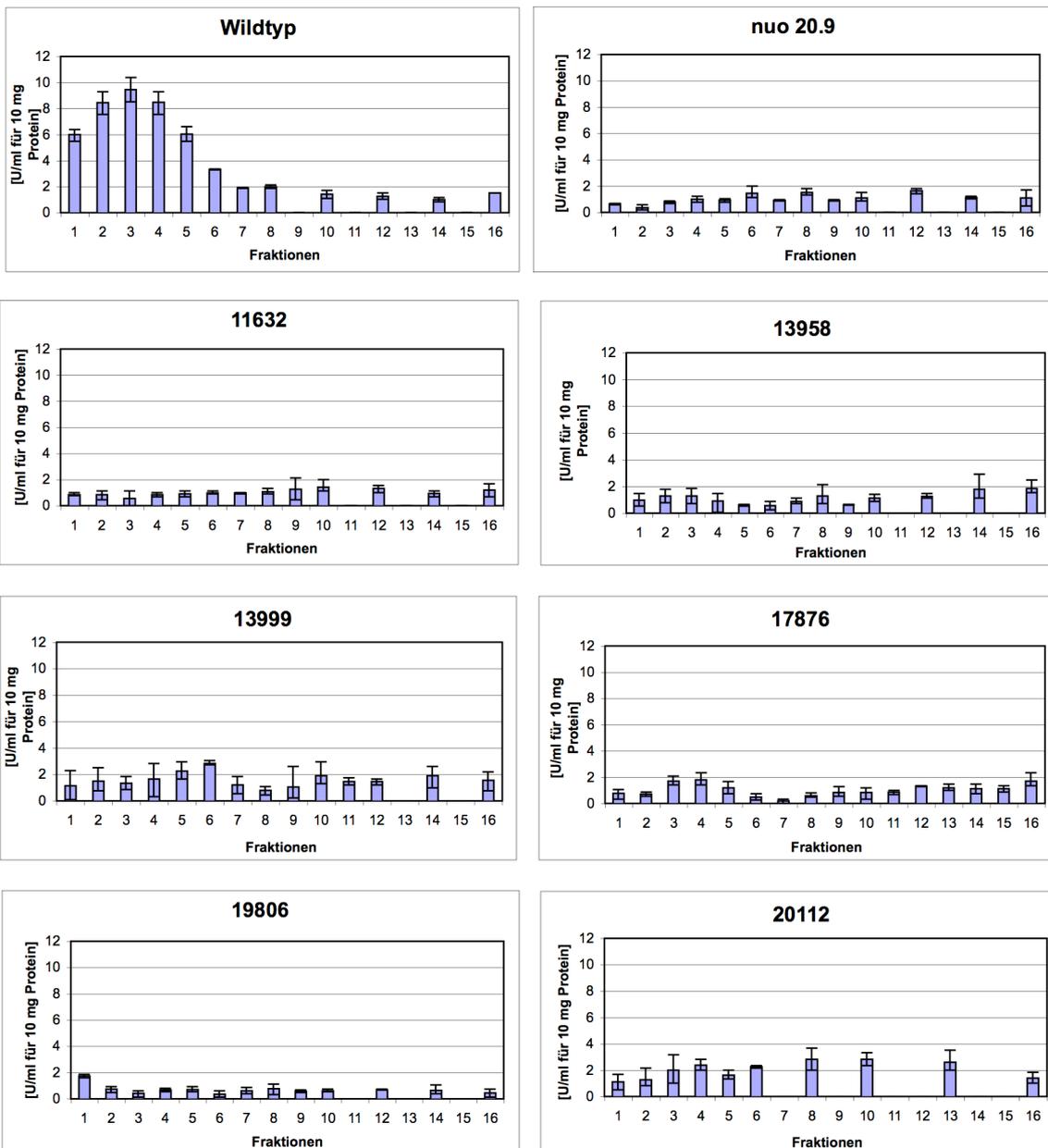
Ein analytischer Aktivitätstest im kleinen Maßstab (4-10 mg solubilisierte Mitochondrienproteine nach Zentrifugation in einem 4 ml 7 – 25 % Saccharosegradienten) diente der ersten Charakterisierung der Deletionsmutanten. Hierbei wurden zum Vergleich das Ergebnis des enzymatischen Tests des vollständig assemblierten Komplex I des Wildtyps und einer Komplex I-defizienten Mutante in der die Untereinheit 20.9 kDa (nuo20.9) deletiert ist, herangezogen. Das Sedimentationsverhalten des Komplex I wurde genutzt, da dieser aufgrund seines hohen Molekulargewichtes nach dem Zentrifugationsschritt in den niedrigeren Fraktionen des Zuckergradienten auftritt. Ein aktiver Komplex I zeigt Aktivität innerhalb der ersten fünf Fraktionen mit einem Maximum innerhalb der ersten ein bis vier Fraktionen. Sichtbar ist dieses im Fall des dargestellten Wildtyps im ersten Diagramm der Abbildung 4.1. Die Mutante nuo20.9 ist aufgrund der Position der deletierten Untereinheit 20.9 kDa im Membranarm dazu in der Lage, den peripheren Arm vollständig zu assemblieren und zeigt aufgrund der geringeren Größe ein langsames Sedimentationsverhalten als der vollständige Komplex I. Demnach ist ein peripherer Arm mit einem deutlich niedriger ausgeprägten Aktivitätsgipfel in mittleren Fraktionen sichtbar. Dies wird aufgrund der Lokalisierung des Flavinmononukleotids ermöglicht, welches als NADH-Oxidationszentrum am distalen Ende des peripheren Arms positioniert ist.

Die große Mehrheit der 248 untersuchten Mutanten zeigte eine ausgeprägte Enzymaktivität im hohen Molmassenbereich, welches typisch für einen intakten Komplex I ist. Bei den auffälligen Deletionsmutanten war eine starke bis vollständige Verminderung der Komplex I-Aktivität oder entsprechend geringe Mengen des Assemblierungsintermediates des peripheren Arms sichtbar. Da die gemessene Aktivität beim Wildtyp präparationsbedingten Schwankungen unterliegt und das

Aktivitätsmaximum zwischen 6-12 U/ml bei Einsatz von 10 mg Protein liegt, wurden fragwürdige Deletionsmutanten mit einem Maximum von weniger als 4 U/ml für 10 mg Protein einer Wiederholung des enzymatischen Tests unterzogen.

Von den 248 untersuchten Deletionsmutanten zeigten sechs ein auffälliges Profil im Aktivitätstest. Diese werden in der Tabelle 4.3 am Ende dieses Kapitels aufgelistet.

Die zu den auffälligen Deletionsmutanten dazugehörigen Aktivitätsergebnisse des enzymatischen Tests sind in den nachfolgenden Diagrammen in Abbildung 4.1 dargestellt.



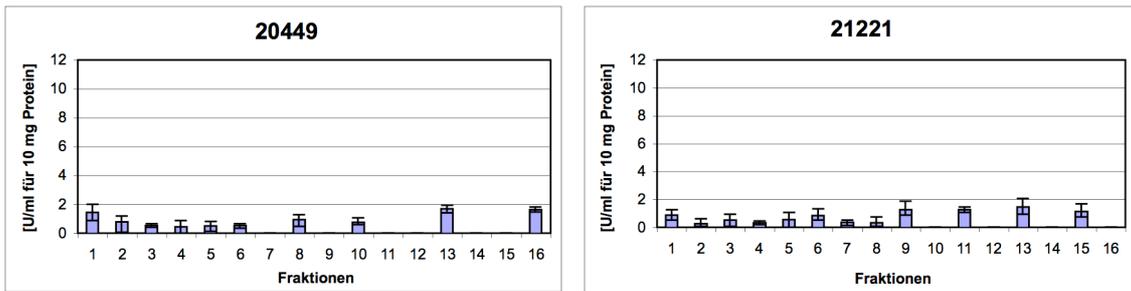


Abb. 4.1: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation der Deletionsmutanten mit inaktivem Komplex I. Es wurden zwischen 4-10 mg solubilisierter Mitochondrienproteine auf einen 4 ml Zuckergradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation wurde dieser in 16 Fraktionen aufgeteilt und hiernach die Redoxaktivität des Komplex I dreifach photometrisch bestimmt. Zum Vergleich ist ein Aktivitätsprofil des Komplex I des Wildtyps und der Mutante nuo20.9 mit defektem Komplex I dargestellt. Die Benennung der verschiedenen Mutanten bezieht sich auf die fünfstellige Nummer der Deletionsmutante im Fungal Genetic Stock Center (FGSC)¹⁰.

In jeder der auffälligen Mutanten wurde die Anreicherung von Assemblierungsintermediaten untersucht und die Auswirkungen der Gendeletion auf die anderen Atmungskettenkomplexe wurden festgestellt. Die Methoden werden im folgenden Abschnitt exemplarisch für den Wildtyp und in manchen Fällen zusätzlich für die Mutante nuo20.9 (deletierte Untereinheit 20.9 kDa) oder nuo9.8 (deletierte Untereinheit 9.8 kDa) erläutert. Anschließend wurden die Ergebnisse für jede Deletionsmutante zusammenfassend dargestellt.

Zunächst erfolgt nach einem Zentrifugationsschritt mit 40 mg solubilisierter Mitochondrienproteine auf einem 7,5-25 %-igen Zuckergradienten mit 12 ml Gesamtvolumen ein enzymatischer Test im präparativen Maßstab. Hierbei treten die Aktivitäten eventueller Assemblierungsintermediate des peripheren Arms oder geringer Mengen an vollständig assembliertem Komplex I deutlicher zutage, da die Nachweisgrenzen zumeist deutlich überschritten werden.

¹⁰ www.fgsc.net

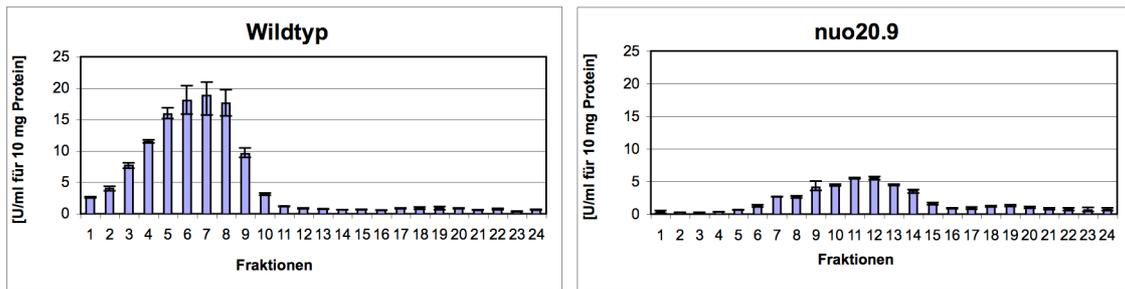


Abb. 4.2: Aktivitätsprofil des enzymatischen Tests im großen Maßstab vom Wildtyp und der Deletionsmutante nuo20.9 als Referenzstämmen. Auf den 12 ml Saccharosegradienten wurden 40 mg solubilisierte Mitochondrienproteine aufgetragen und nach der Zentrifugation in 24 Fraktionen aufgetrennt. Die Aktivität der jeweiligen Fraktion wurde dreifach bestimmt und die Abweichung entsprechend graphisch dargestellt.

Ergänzend wurde zur Beurteilung eines Komplex I-Defekts die Methode der BlauNativ-Gelelektrophorese mit anschließender Aktivitätsfärbung innerhalb des Polyacrylamid-Gels angewandt. Hierbei werden unter nativen Bedingungen die mild solubilisierten Mitochondrienproteine und Komplexe innerhalb eines Gradientengels aufgetrennt. Als vereinheitlichender Ladungsträger wird der unter physiologischen Bedingungen negativ geladene Farbstoff Coomassie verwendet. Die anschließende Komplex I Färbung nutzt die Lokalisation des weiterhin aktiven Komplex I bzw. seines peripheren Arms, um durch die Reduktion des gelblich gefärbten Nitrotetrazoliumblau (NBT) zu dem anthrazitfarbenen Formazan die NADH-Oxidation nachzuweisen, welches am Ort der Oxidation präzipitiert. Die BlauNativ-PAGE bietet zusätzlich die Möglichkeit die Assemblierung und Katalyse des Atmungskettenkomplex IV zu überprüfen. Hierbei wird 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) oxidiert, wodurch es als braunes Präzipitat auf der Höhe des Komplex IV ausfällt und dieser dadurch sichtbar wird. In der Abbildung wurde zur Verdeutlichung einer Komplex I defekten Mutante als Beispiel die nuo20.9 mit deletierter 20.9 kDa-Untereinheit gewählt, so dass der assemblierte periphere Arm sichtbar ist. Im Falle der Komplex IV-Färbung wurden neben einer Mutante ohne manifestiertem Atmungskettenkomplex die Mutanten 21177 gewählt, die aufgrund des deletierten Gens ncu08692 (kodiert das Protein CYA-5) die mitochondrial kodierte Untereinheit coxI des Komplex IV nicht translatieren kann und somit keine Komplex IV-Aktivität aufweist (Coffin, Dhillon et al. 1997).

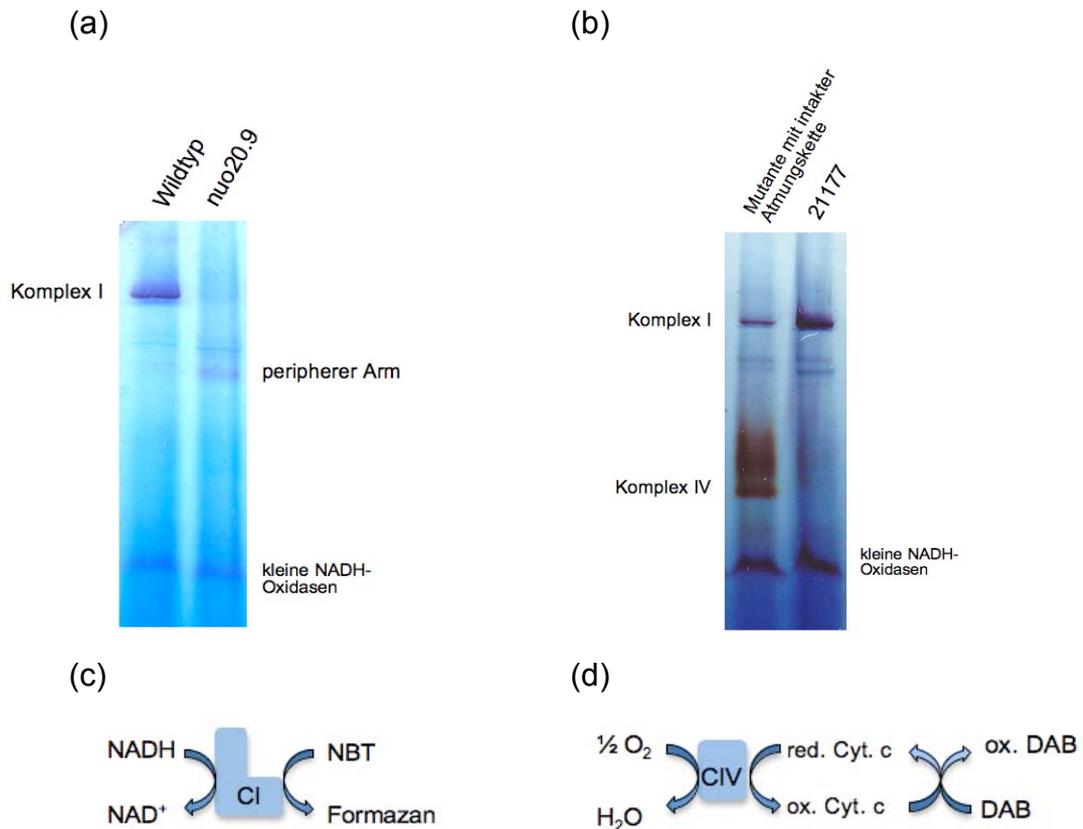


Abb. 4.3: BlauNativ-Gelelektrophorese von solubilisierten Mitochondrienproteinen mit In-Gel Färbung. Die entsprechend sichtbaren Banden sind jeweils seitlich markiert. (a) Zur Veranschaulichung wurde der Wildtyp und die Komplex I Mutante *nuo20.9* verwendet. Durch die Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors NBT erscheinen NADH oxidierende Enzyme durch präzipitiertes Formazan als anthrazitgefärbte Bande. Der Komplex I, das Assemblierungsintermediat des peripheren Arms und kleine NADH-Oxidasen sind sichtbar. (b) Die Anfärbung des Komplex IV wird anhand einer wildtypähnlichen, unbestimmten Mutante mit intakter Atmungskette und der Mutante 21177 mit deletiertem *CYA-5* Gen verwendet. (c) Schematische Darstellung der Komplex I Färbung. NBT steht für Nitrotetrazoliumblau. (d) Schematische Darstellung der Komplex IV Färbung. Cyt c steht für Cytochrom c, DAB für 3,3'-Diaminobenzidin.

Zum Nachweis enzymatisch inaktiver Assemblierungsintermediate wurde die Western-Blot-Analyse mit spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen verschiedene Untereinheiten des Komplex I angewendet. Zu diesem Zweck wurden Fraktionen der Saccharosegradientenzentrifugation in einer SDS-PAGE aufgetrennt und elektronisch geblottet. Ein intakter Komplex I zeigt die stärkste Intensität der markierten Untereinheiten bei niedrigen Fraktionszahlen, welche mit dem Aktivitätsprofil im enzymatischen Test korrelieren. Die Intensität der Signale nimmt mit höheren Fraktionszahlen stark ab und bei Verwendung mehrerer Antikörper ist eine gleichförmige Zu- und Abnahme der Signale zueinander erkennbar.

Exemplarisch wird hierfür in Abbildung 4.4 ein Western-Blot für den Wildtyp gezeigt.

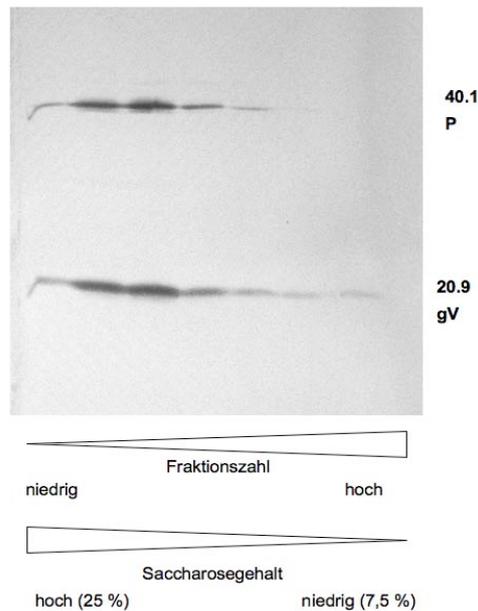


Abb. 4.4: Beispiel eines Western Blots für einen vollständig assemblierten Komplex I aus Wildtyp-Mitochondrien.

Die Zunahme der Fraktionen und die Abnahme des Saccharosegehaltes wurde graphisch dargestellt. Die verwendeten Antikörper wurden auf der rechten Seite markiert (40.1 = Antikörper gegen die Untereinheit 40.1 kDa, 20.9 = Antikörper gegen die Untereinheit 20.9), **P** steht für die Lokalisation dieser Untereinheit im peripheren Arm, **gV** für die Lokalisation in der großen Membranarmvorstufe.

Zur Überprüfung, ob der jeweilige Komplex I-Defekt für diesen spezifisch ist oder auch andere Komplexe der Atmungskette betroffen sind, wurde der Cytochromgehalt in den Mitochondrien der Deletionsmutanten bestimmt. Die Komplexe III und IV und der wasserlösliche Elektronencarrier Cytochrom c beinhalten Hämgruppen, die im oxidierten bzw. reduzierten Zustand unterschiedliche Spektren aufweisen. Hierüber kann man eine erste Aussage über die Existenz der jeweiligen Komplexe tätigen und damit die Spezifität des deletierten Gens in der jeweiligen Mutante für den Komplex I beurteilt werden. Bei Mutanten mit einem Defekt des Komplex I ist der Cytochrom c-Gehalt häufig deutlich erhöht. Vermutet wird ein Kompensationseffekt zur Sicherstellung einer ausreichenden ATP Produktion (Harkness, Rothery et al. 1995; da Silva, Alves et al. 1996). Dieser Sachverhalt wird in der nächsten Abbildung 4.5 deutlich, in der die Differenzspektren des Wildtyps und der Komplex I-Mutante nuo9.8 übereinander gelegt wurden und der erhöhte Cytochrom c-Gehalt ersichtlich ist.

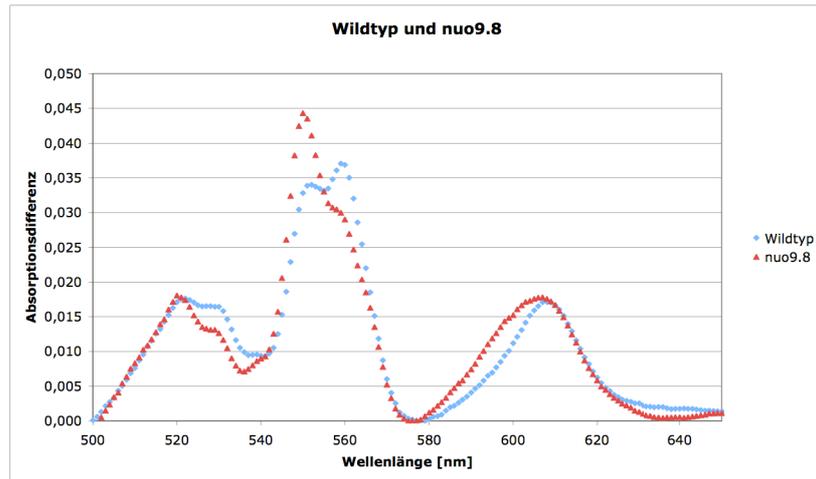


Abb. 4.5: Differenzspektrum von nuo9.8 und Wildtyp-Mitochondrien. Gezeigt ist die dithionitreduzierte Probe minus der luftoxidierten Referenz. Cytochrom a ist im Bereich zwischen 605-650 nm, Cytochrom b zwischen 560-580 nm und Cytochrom c ist bei 550-581 nm sichtbar.

Für Hinweise auf die Funktion der deletierten Gene wurden Sequenzanalysen durchgeführt. Neben der Bestimmung der Größe des kodierten Proteins wurde unter Anwendung des TMHMM-Programms¹¹ geprüft, ob Transmembrandomänen anzunehmen sind (Krogh, Larsson et al. 2001). Des Weiteren wurde mit dem TargetP¹²- oder zusätzlich mit dem MitoProt¹³-Programm bestimmt, ob das Protein eine mitochondriale Präsequenz aufweist (Claros und Vincens 1996; Nielsen, Engelbrecht et al. 1997; Emanuelsson, Nielsen et al. 2000).

Für erste Anhaltspunkte der möglichen Funktion von hypothetischen Proteinen wurde die Sequenzanalyse ausgeweitet. Hierbei wurden mit Hilfe des BLAST-Algorithmus orthologe und eventuell paraloge Proteine identifiziert (Altschul, Gish et al. 1990; Altschul, Madden et al. 1997). Phänetische Stammbäume wurden teilweise zur Klärung der Verwandtschaftsgrade erstellt (Felsenstein 1988; Combet, Blanchet et al. 2000).

Aufgrund dieser Sequenzanalyse wurde die Deletion in der Mutante 14945 des Gens *ncu04781*, welche im enzymatischen Test einen eindeutigen Einfluss auf den Komplex I aufwies, als nicht annotierte Untereinheit des Komplex I in der MIPS-

¹¹ TMHMM Server v. 2.0, *prediction of transmembrane helices in proteins*;
www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/

¹² TargetP 1.1 Server, *prediction of the subcellular location of eukaryotic proteins*;
www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/

¹³ MITOPROT, *prediction of mitochondrial targeting sequences*;
www.ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html

Datenbank identifiziert und von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen werden (Marques, Duarte et al. 2003).

Die nachfolgende Tabelle 4.3 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzanalyse. Details werden in den Kapiteln 4.2.2 ff beschrieben.

Tab. 4.3: Auflistung der Deletionsmutanten mit einem nachgewiesenen Komplex I-Mangel. Die verwendeten Abkürzungen chp steht für *conserved hypothetical protein* und DUF für *domain of unknown function*.

# FGSC	ncu	Klassifizierung	Genstruktur	Anzahl Aminosäuren	Größe [kDa]
11632	ncu05196	MDJ	3 Exons	531	56,4
13958	ncu02937	chp	2 Exons	203	22
13999	ncu03088	chp	1 Exon	521	55
17876	ncu00183	DUF 185	4 Exons	568	61,9
19806	ncu02565	DUF 185	2 Exons	531	61,9
21221	ncu03439 ncu21508	chp (Methyltransferase)	3 Exons	390	43,5

4.2.1 Erzeugung von Komplementationsmutanten

Zur Überprüfung der Verlässlichkeit der gewünschten Deletion in den verwendeten Mutanten des *Neurospora Genome Projects* und damit eines eindeutigen Nachweises, dass das fehlende Protein für den Komplex I eine essentielle Funktion ausübt, wurden in Zusammenarbeit mit Ricarda Moseler Komplementationsmutanten erzeugt (Moseler 2011). Hierfür wurden die Gene kloniert und die Deletionsmutanten transformiert. Diese Methode ermöglicht die Überprüfung der erfolgreichen Proteinsynthese durch die Komplementation des Komplex I-Defektes und der wiederhergestellten Enzymaktivität. Im Hinblick auf eine spätere funktionelle Charakterisierung wurden zur Komplementation modifizierte Gene eingesetzt, die vor dem Start- oder hinter dem Stoppcodon Basensequenzen für die Kodierung von Hexahistidintags tragen. Diese Tags können für den Nachweis des Proteins mit einem gegen den Histidintag gerichteten Antikörper nachgewiesen werden und über Immobilisierte Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC) angereichert werden.

Zunächst wurden die Gensequenzen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert und als blunt-end Produkte in den Vektor pJET1.2 ligiert. Es folgte eine „Side-directed-mutagenesis“ zur Deletion der Introns, um die Proteine bei Bedarf ebenfalls in prokaryotischen Expressionssystemen wie *E. coli* exprimieren zu können. Das finale Produkt ohne Introns wurde in den Expressionsvektor pET28b überführt. Durch die In-FusionTM-Reaktion wurden die Sequenzen entweder mit 5'- oder 3'-Oligonukleotidsequenzen für den Hexahistidin-tag versehen in den *N. crassa*-Expressionvektor pMYX umgesetzt. Alternativ hierzu wurde die klassische Klonierungsstrategie über Insertion in den Zielvektor durch den Einbau von Schnittstellen für die Verwendung von Restriktionsendonukleasen gewählt. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durch Sequenzierungen auf die richtige Sequenzabfolge und Mutationsfreiheit überprüft.

Der pMYX-Vektor zeichnet sich dadurch aus, dass er in *E. coli* vervielfältigt werden kann und hierfür ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin aufweist. Des Weiteren beinhaltet er die notwendigen Gene für eine erfolgreiche Transformation in das *N. crassa*-Genom. Dabei ist das Benomylresistenzgen als Selektionsmarker zu nennen und der Chinasäure-induzierbare qa-Promotor. Dieser führt in Anwesenheit von Chinasäure zu einer verstärkten Genexpression (Patel, Schweizer et al. 1981; Baum und Giles 1985; Giles, Case et al. 1985; Giles, Geever et al. 1991; Campell, Enderlin et al. 1994).

Die hierdurch entstandenen Plasmide dienten zur Komplementierung der Deletionsmutanten durch Transformation.

Die Aufhebung des Defektes erfolgte durch eine heterologe Transformation in das chromosomale Genom der jeweiligen Deletionsmutanten und die erfolgreiche Komplementierung wurde durch den Nachweis der Komplex I Aktivität erbracht. Nicht in allen Fällen war eine Abhängigkeit vom Induktor Chinasäure feststellbar, der sich in der An- oder Abwesenheit des Komplex I zeigte, sondern es war eher eine Chinasäure-unabhängige Präsenz des Komplex I bei erfolgreicher Komplementation detektierbar.

In dieser Arbeit wurden zur Komplementation die Deletionsmutanten 13958, 17876 und 19806 ausgewählt. Insgesamt sind also sechs Transformationsplasmide entstanden.

Nachfolgend in den Abbildungen 4.6-4.7 werden die BlauNativ-Gele mit angefärbten Komplex I gezeigt, in welchen die Komplementierung erfolgreich stattgefunden hat.

Als Bezeichnung für die modifizierten Gensequenzen wurde im Falle eines vorangestellten Hexahistidin-tags im Protein (im Protein also am N-Terminus lokalisiert) die Abkürzung „His“ vor die Gensequenz gesetzt, im Falle eines C-terminalen Hexahistidin-tags entsprechend an die Gensequenz angefügt.

Im Falle der Deletionsmutante 17876 werden exemplarisch drei Transformanten dargestellt (Abb. 4.6 (a)). Die Mutante *ncu00183-His_1* zeigte keine deutliche Erhöhung der Komplex I Aktivität, wogegen *ncu00183-His_2* dies deutlich aufwies. Interessanterweise konnte man bei der Mutante *ncu00183-His_3* einen Einfluss des Induktors Chinasäure erkennen, bei Anwesenheit zeigte sich ein signifikanter Komplex I mit nachweisbarer Bande des peripheren Arms. Die transformierte Mutante 19806 zeigte ebenfalls Transformanten mit komplementiertem Komplex I. Dies ist in der Abb 4.6 (b) gezeigt. Hierbei wurde ebenfalls eine Mutante ohne nachweisbaren Komplex I gezeigt, bei der demnach von keiner Komplementierung ausgegangen werden kann (*His-ncu02565_1*), dagegen zeigte die Mutante *His-ncu02565_2* einen durch Chinasäure induzierbaren Komplex I.

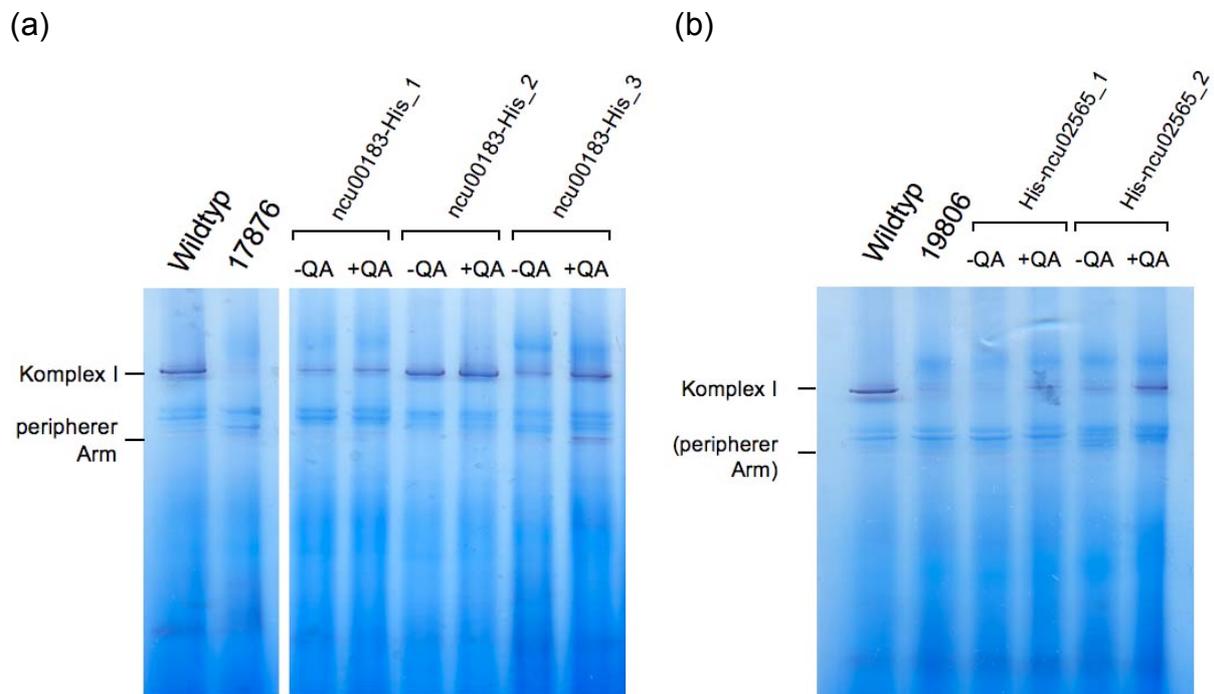


Abb. 4.6 BlauNativ-PAGE ausgewählter Transformanten der komplementierten Deletionsmutante 17876 und 19806 mit gefärbtem Komplex I. Die Spuren wurden entsprechend beschriftet. Im Falle der komplementierten Mutanten wurde der Zusatz von Chinasäure mit +QA markiert, eine Abwesenheit des Induktors mit –QA. Die Höhe der Komplex I – Bande und des peripheren Arms wurde auf der linken Seite markiert.

Durch die mehrfache Wiederholung der Transformationen konnten die Mutanten *ncu02565-His*, *His-ncu00183*, *His-ncu02937* und *ncu02937-His* erzeugt werden, von denen jeweils eine Mutante exemplarisch in der nachfolgenden Abbildung 4.7 dargestellt wurden.

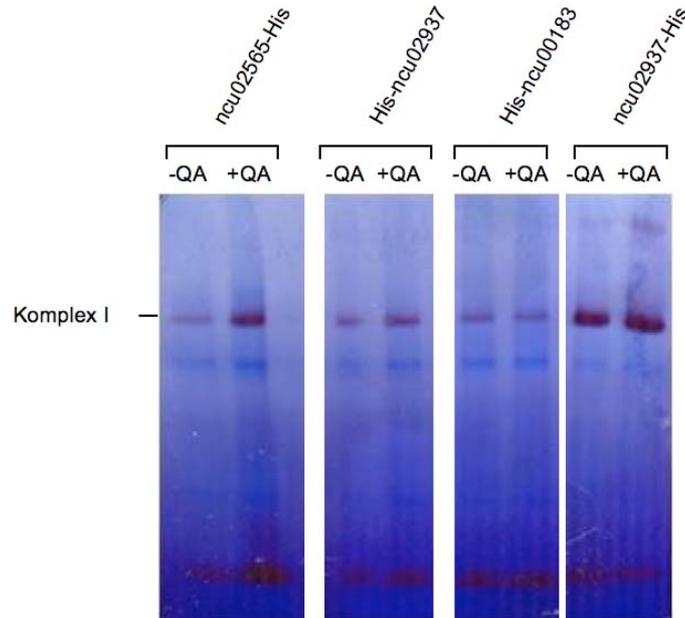


Abb. 4.7: BlauNativ-PAGE ausgewählter Transformanden der komplementierten Deletionsmutanten 13958, 17876 und 19806. Der Komplex I wurde angefärbt und die Transformanden den Spuren zugeordnet. Eine An- oder Abwesenheit von Chinasäure wurde entsprechend mit +QA/-QA bezeichnet (Moseler 2011).

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Enzymaktivität des Komplex I durch die NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität nach der Größenauffrennung durch eine Saccharosegradienten-Zentrifugation für ausgewählte Transformanden durchgeführt. Hierbei zeigte sich für alle Mutanten eine geringe Aktivität für den Komplex I, die in allen Fällen die Aktivität der ursprünglichen Deletionsmutante übertraf. Es ist jedoch anzumerken, dass das Aktivitätsmaximum im Falle der Mutanten *ncu00183-His* und *His-ncu02565* lediglich 1/15 der Aktivität des Wildtyps aufgewiesen haben. Die Mutante *ncu02937* zeigte ebenfalls ein deutlich reduziertes Signal von 1/5 des Wildtyps (Moseler 2011). Die geringe Ausprägung des Komplementationeffektes ist unter anderem auf einen gemischten Genotyp zurückzuführen, da für die Transformation mehrkernige Makrokonidien verwendet worden sind. Die Ausprägung der erfolgreichen Komplementierung kann also durch die Überlagerung mit ursprünglichen und untransformierten Kernen und ihrem Proteom den Phänotyp der komplementierten Deletionsmutante beeinträchtigen. Versuche zur Erzeugung

homokaryoter Mutanten über die Herstellung von einkernigen Mikrokonidien zeigten erste Resultate in einer signifikanten Erhöhung der Komplex I-Aktivität aufgrund einer Komplementation mit His-ncu02565. In der nachfolgenden Abbildung 4.8 einer BlauNativ-PAGE zeigten sich deutliche Banden in den homokaryoten Transformanden His-ncu02565_a und b. Eine Verifizierung dieses Ergebnisses durch die Quantifizierung der Enzymaktivität im enzymatischen Test zeigte für die Mutante His-ncu02565_b eine Aktivität von 15 U/ml im Vergleich zum Wildtyp mit 18 U/ml. Demnach kann die Deletion des Gens und der damit einhergehende Komplex I-Defekt durch die ektopische Integration der modifizierten Gensequenz komplementiert werden. Für die anderen Mutanten steht die entsprechende Erzeugung homokaryoter und komplementierter Mutanten zu diesem Zeitpunkt aus.

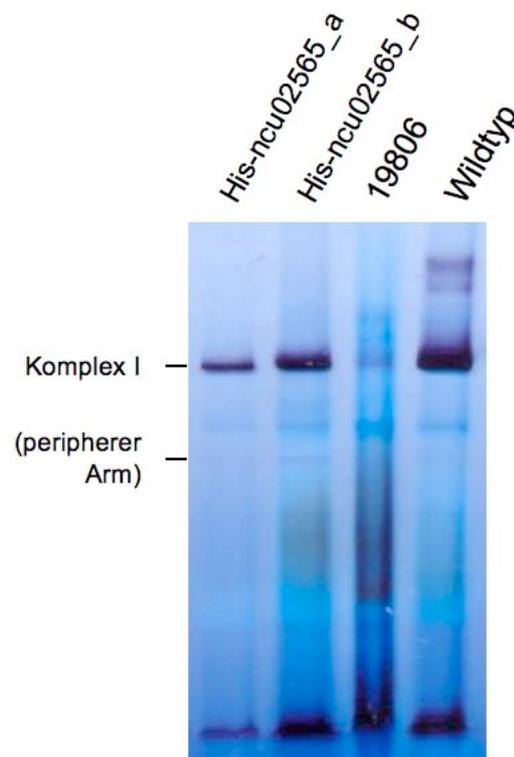


Abb. 4.8: BlauNativ-PAGE ausgewählter, homokaryoter Transformanden der komplementierten Deletionsmutante 19806 mit gefärbtem Komplex I. Die Spuren wurden entsprechend beschriftet. Die Höhe der Komplex I-Bande und des peripheren Arms wurde auf der linken Seite markiert (Moseler 2011).

Die Komplementation des defekten Komplex I durch die ektopische Integration der modifizierten Gensequenz zeigte sich als Möglichkeit zum einen die Bedeutung des Gens bzw. seines Proteins für die Komplex I-Biogenese und die angegebene Gendeletion in der jeweiligen Mutante zu bestätigen und zum anderen bietet sich nachfolgend aufgrund der angefügten Affinitätsmarker die Proteine zu lokalisieren und Bindungspartner zu identifizieren.

4.2.2 Deletionsmutante 11632

Das in der Mutante 11632 fehlende Gen *ncu05196* kodiert ein Protein mit 531 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 56,4 kDa. Die Sequenz des Proteins zeigt keine Transmembrandomäne. Es kann also von einem löslichen Protein ausgegangen werden. Am N-Terminus ist eine mitochondriale Präsequenz mit hoher Zuverlässigkeit bestimmbar (RC=2).

Phylogenetische Untersuchungen zeigen, dass dieses Protein einen höheren Grad an Homologie zu dem orthologen Protein Mdj1 aus *S. cerevisiae* als zu paralogen Proteinen aus *N. crassa* aufweist. Die Identifizierung des Proteins durch den differentiellen Genomvergleich in Korrelation mit einer Existenz des Komplex I in verschiedenen Organismen führte zwar zu Sequenzähnlichkeiten mit den beiden Proteinen DEHAOF11055g und YALIOF17292p, die ursprünglich gemeinsam die Proteinfamilie GLC.2372 gebildet haben, jedoch erscheint die Homologie zu dem Chaperon Mdj1 signifikanter. Dargestellt wird dieser Zusammenhang in der nachfolgenden Abbildung 4.9.

Seinerseits wird das Mdj1 Protein der Familie der DnaJ Proteine zugeordnet, welche bakteriellen Ursprungs sind. Die Aufgaben von Mdj1 in *S. cerevisiae* umfasst sowohl Rollen in der Biogenese funktioneller mitochondrialer DNA und in der Faltung neu importierter Proteine, sowie deren Schutz vor Denaturierung oder Aggregation durch Hitze (Rowley, Prip-Buus et al. 1994; Duchniewicz, Germaniuk et al. 1999). Deletionen des Mdj1 führen in der fakultativ aeroben Hefe *S. cerevisiae* zu einem Verlust des mitochondrialen Genoms.

Abkürzung	Bezeichnung des Gens	Organismus	Klassifizierung / Genbezeichnung
11632	ncu05196	Neurospora crassa	related to heat shock protein MDJ1
MDJ1	YFL016c	Saccharomyces cerevisiae	MDJ1 - heat shock protein
Nc1	ncu03732	Neurospora crassa	related to DNAJ-like protein
Nc2	ncu00465	Neurospora crassa	related to DNAJ homolog subfamily A member 2
Nc3	ncu07414	Neurospora crassa	probable mitochondrial import protein YDJ1
Dh	DEHAOF11055g	Debaryomyces hansenii	hypothetical protein
Y11	Q6C1D3	Yarrowia lipolytica	YALI0F17292p
Cn	Q55VG6	Cryptococcus neoformans	putative uncharacterized protein
Af	Q4X0Z6	Aspergillus fumigatus	mitochondrial DNAJ chaperone (Mdj1), putative
Chg	Q2H0Z5	Chaetomium globosum	putative uncharacterized protein
CT	E6UMN0	Clostridium thermocellum	Chaperone protein DNAJ
Cg1	Q6FUG2	Candida glabrata	homologs of bacterial chaperone DnaJ
Cg2	Q6FPF5	Candida glabrata	strain CBS138 chromosome J complete sequence
Sc1	YMR214	Saccharomyces cerevisiae	SCJ1, homolog of E. coli DnaJ
Sc2	YNL064	Saccharomyces cerevisiae	YDJ1, mitochondrial and ER import protein
Dm	Q7KVH7	Drosophila melanogaster	lethal tumorous imaginal discs, isoform C
At	Q9SSD4	Arabidopsis thaliana	hypothetical protein
Hs	Q59E88	Homo sapiens	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3 variant
Ms	Q465Y7	Methanosarcina barkeri	chaperone protein
Y12	Q6C1X9	Yarrowia lipolytica	similar to YFL016c MDJ1 Co-chaperone

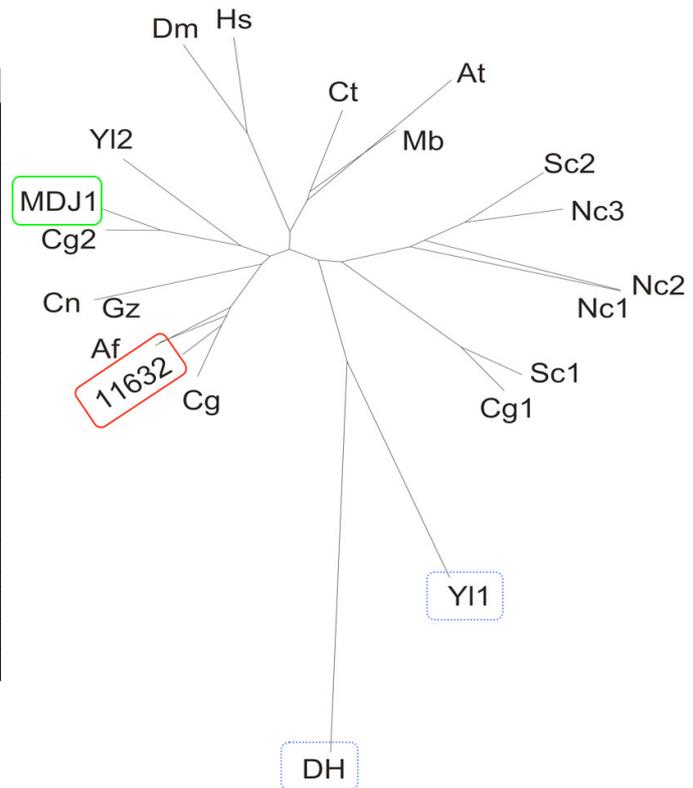


Abb. 4.9: Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen homologen Proteinen zum ncu05196 Protein. Die Proteine wurden durch BLAST ermittelt und mit Clustal W die Homologien bestimmt (Felsenstein 1988; Combet, Blanchet et al. 2000). Die verwendeten Abkürzungen sind in der Tabelle angegeben. Das untersuchte Protein ncu05196 ist mit der Nummer 11632 gekennzeichnet und rot markiert. Das Protein MDJ1 ist grün markiert und die beiden Proteine der ursprünglichen Proteinfamilie GLC.2372 blau.

Die Aktivitätsbestimmung nach einer Zuckergradientenzentrifugation zeigte einen breiten und zu höheren Fraktionen verschobenen Aktivitätsgipfel, wenn auch geringer Ausprägung, welches die Anwesenheit des Assemblierungsintermediates des peripheren Arms untermauert.

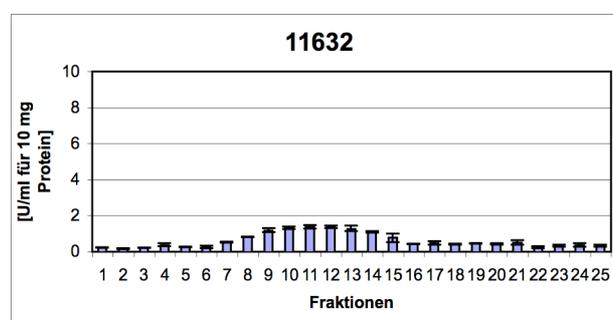


Abb. 4.10: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation für die Mutante 11632. Es wurden 40 mg Mitochondrienprotein für einen 12 ml Zuckergradienten verwendet.

Die Präsenz des peripheren Arms kann durch die Detektion verschiedener Untereinheiten im Western Blot bestätigt werden (siehe Abb. 4.11).

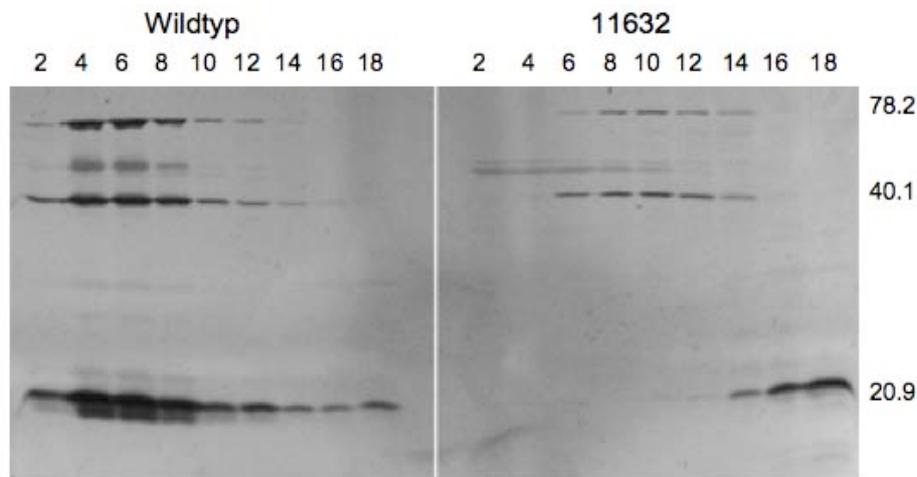


Abb. 4.11: Western Blot der Deletionsmutante 11632 im Vergleich zum Wildtyp. Die Fraktionsnummern sind oberhalb des Bildes angezeigt, auf der rechten Seite sind die apparentne Massen der durch Antikörper angefärbten Untereinheit angegeben.

Im Vergleich mit dem Wildtyp ergab sich bei den Mitochondrien von 11632 eine Verschiebung des Signalmaximums der Untereinheiten 78.2 kDa und 40.1 kDa zu höheren Fraktionen. Die Lokalisation der beiden Untereinheiten im hydrophilen Teil des Komplex I deutet in Korrelation mit dem Ergebnis des enzymatischen Tests im großen Maßstab auf einen assemblierten peripheren Arm hin. Die Untereinheit 20.9 kDa ist Bestandteil der großen Membranarmvorstufe und durch das ausschließliche Auftreten des Signals in den Fraktionen 16 – 18 kann die Existenz eines vollständigen Komplex I negiert werden. Des Weiteren deutet dies auf ein Assemblierungsintermediat des Membranarms sehr kleiner Größe oder ein Aggregat hin, welches in beiden Fällen die Untereinheit 20.9 kDa beinhaltet.

Da aufgrund der Homologie zum Mdj1 Protein aus *S. cerevisiae* von ähnlichen Funktionen in der Erhaltung des mitochondrialen Genoms ausgegangen werden kann, wurde zu diesem Zweck in Zusammenarbeit mit Iren Göklü die mitochondriale DNA sowohl aus der Mutante 11632 und dem Wildtyp isoliert und einer Restriktionsanalyse unterzogen (Göklü 2008). Der gleiche Effekt in dem obligat aeroben Hyphenpilz *N. crassa* würde zur Letalität des Organismus führen, da ein vollständiger Verlust des mitochondrialen Genoms nicht tolerierbar wäre.

Hierfür wurden Restriktionsendonukleasen gewählt, die ein spezifisches und leicht zu charakterisierendes Bandenmuster bei einer erfolgreichen Restriktionsspaltung

ermöglichten. Die erwarteten Fragmente der mitochondrialen DNA wurden in folgender Tabelle aufgelistet und die Banden der Restriktionsspaltung anschließend durch Gelelektrophorese sichtbar gemacht, welches in Abb. 4.12 dargestellt ist.

Tab 4.4: Erwartungswerte bei einer Restriktionsspaltung des mitochondrialen Genoms.

Restriktionsenzym	Anzahl Fragmente	Erwartete Fragmentgröße
EcoR V	10	25478 / 11606 / 9160 / 8259 / 4701 / 2921 / 1063 / 808 / 571 / 273
Fba I	13	25268 / 9384 / 8499 / 5175 / 5019 / 3855 / 2136 / 1933 / 1364 / 1119 / 441 / 438 / 209

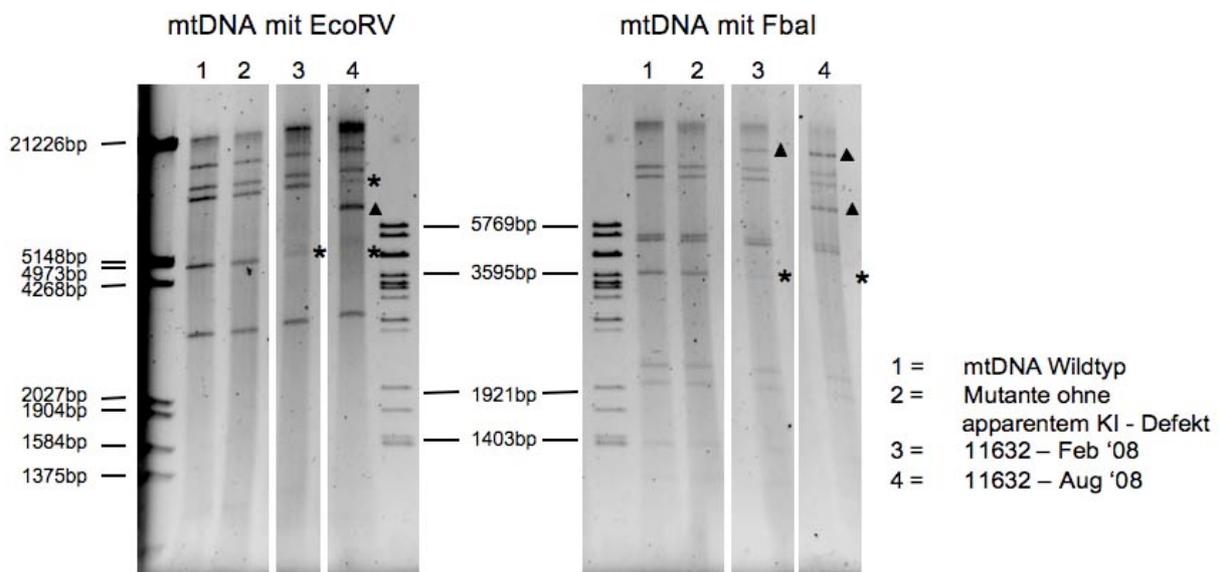


Abb. 4.12: Fragmentbanden der mitochondrialen DNA nach Restriktionsspaltung mit EcoRV und FbaI. Die Banden der verwendeten Größenstandards wurden markiert. Die mtDNA des Wildtyps (1), einer Deletionsmutante mit apparentem und aktivem Komplex I und die mtDNA der 11632 Deletionsmutante verschiedener Generationen (Isolierung mtDNA im Februar 2008 (3) und ein halbes Jahr später im August 2008 (4)) wurden mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen gespalten. Zusätzlich auftretende Banden wurden mit einem Dreieck und abgeschwächte oder abwesende Banden wurden mit einem Stern markiert.

Die Gelelektrophorese der isolierten und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und FbaI gespaltenen mitochondrialen DNA brachte zutage, dass das Protein ncu05196 ebenso wie das Protein Mdj1 aus *S. cerevisiae* eine Funktion für die Biogenese und den Erhalt des mitochondrialen Genoms innehat. Das Bandenmuster der Mutante 11632 dokumentiert eine Veränderung des mitochondrialen Genoms bei Abwesenheit des Proteins ncu05196 durch zusätzliche bzw. abwesende Banden im Vergleich zur wildtypischen mitochondrialen DNA.

Welche Arten von Mutationen vorliegen vermag diese Art der Untersuchung nicht zu offenbaren, hierfür müssten Sequenzierungen der mitochondrialen DNA erfolgen. Jedoch ist zu beobachten, dass die Art der Mutationen anscheinend nicht gleichartig zwischen verschiedenen Generationen der Mutante ist, denn im Abstand eines halben Jahres zeigten sich zusätzliche Mutationen im Bandenmuster, wodurch eine fortlaufende Mutation des mitochondrialen Genoms anzunehmen ist. An dieser Stelle ist anzumerken, dass eine Zelle mehrere Mitochondrien mit dem jeweilig eigenen Genom beinhaltet, so dass innerhalb einer Zelle unterschiedlich ausgeprägte Genotypen im mitochondrialen Genom auftreten können.

Das Protein ncu05196 zeigt demnach keine Spezifität für die Komplex I Assemblierung, sondern eine allgemeine Funktion für den Erhalt der korrekten mitochondrialen Erbinformation mit entsprechendem Einfluss auf die mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe. Bestätigung findet dieser Sachverhalt in der Bestimmung des Cytochromgehaltes der Mutante. Hierbei zeigt sich, dass insbesondere der Komplex IV betroffen zu sein scheint. Begründet werden kann dies durch einen lediglich leicht verminderten Gehalt an Cytochrom b, jedoch einer signifikanten Reduktion von Cytochrom a, welches dem Gehalt des Wildtyps von einem Viertel entspricht und Bestandteil der Cytochrom c-Oxidase ist. Der Gehalt des Cytochrom c ist im Vergleich zum Wildtyp erhöht, welches bei Defekten in der Atmungskettenkomplex häufig beobachtet werden kann.

Tab. 4.5.: Cytochromgehalt der Mutante 11632 im Vergleich zum Wildtyp.

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
Wildtyp	0,075	0,107	0,102
11632	0,02	0,09	0,281

Die Defekte zeigen demnach einen generellen Einfluss auf die Atmungskettenkomplexe, jedoch weniger stark ausgeprägt als in *S. cerevisiae*, denn es ist kein Verlust sondern lediglich Mutationen des mitochondrialen Genoms beobachtbar.

4.2.3 Deletionsmutante 13958

Die Deletionsmutante 13958 des Gens ncu02937 zeigt einen deutlichen Defekt des Komplex I. Das dazugehörige Protein ist als konserviertes hypothetisches Protein

klassifiziert und umfasst 203 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 22,2 kDa. Des Weiteren liefern Programme zur Vorhersage der Sekundärstrukturen die Information, dass es sich um ein Membranprotein mit zwei Transmembrandomänen handeln kann. Eine mitochondriale Präsequenz wurde nicht identifiziert.

Phylogenetische Betrachtungen offenbaren eine entfernte Verwandtschaft zu Tim- und Tom-Proteinen des Mitochondrientransportsystems, jedoch sind die Proteine mit einem höheren Homologiegrad zum Protein ncu02937 der Klassifizierung hypothetische oder konserviert hypothetischen Proteinen zuzuordnen und zeigen eine deutlich ausgeprägte Homologie zu orthologen Proteinen anderer Pilze. Homologe Proteine zu Tieren und Pflanzen sind ebenfalls vorhanden, jedoch mit einer geringeren Sequenzähnlichkeit. Zusammen mit der Bestimmung von zwei Transmembrandomänen und der entfernten Verwandtschaft zu Transportproteinen ist ein Einfluss auf den spezifischen Import von Komplex I-Untereinheiten postulierbar, auch im Hinblick darauf, dass die anderen Atmungskettenkomplexe durch eine Deletion des Gens nicht betroffen zu sein scheinen.

Abkürzung	Organismus	Protein Klassifizierung - englisch
Necra	Neurospora crassa	conserved hypothetical protein
Nc TIM17	Neurospora crassa	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit
Nc TIM22	Neurospora crassa	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit
Magri	Magnaporthe grisea	hypothetical protein
Chglo	Chaetomium globosum	hypothetical protein
Bofuc	Botryotinia fuckeliana	predicted protein
Scscl	Sclerotinia sclerotiorum	hypothetical protein
Gizea	Gibberella zeae	conserved hypothetical protein
Nehae	Nectria haematococca	conserved hypothetical protein
Asnid	Aspergillus nidulans	conserved hypothetical protein
Yalip	Yarrowia lipolytica	unknown function
Loelo	Lodderomyces elongisporus	conserved hypothetical protein
Caalb	Candida albicans	unknown function
Pisti	Pichia stipitis	predicted protein
Pigui	Pichia guilliermondii	hypothetical protein
Sc MTM1	Saccharomyces cerevisiae	Manganese trafficking factor for mitochondria
Sc YPR	Saccharomyces cerevisiae	DNA polymerase e subunit B
Sc TIM22	Saccharomyces cerevisiae	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit
Kllac	Kluyveromyces lactis	similar to ca CA4956 IPF4583 Cand
Dehan	Debaryomyces hansenii	unknown function
Laagg	Labrezia aggregata	Coenzyme A transferase
Hosap	Homo sapiens	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 1
Hs TIM22	Homo sapiens	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit
Mouse	Mouse	MKIAA4025 fragment

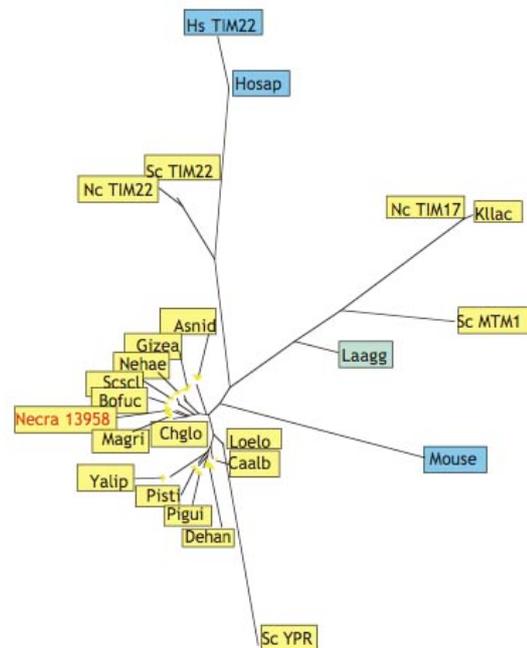


Abb. 4.13: Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen homologen Proteinen des Protein 13958. Die Proteine wurden durch BLAST ermittelt und mit Clustal W die Homologien bestimmt (Felsenstein 1988; Combet, Blanchet et al. 2000). Die verwendeten Abkürzungen sind in der Tabelle angegeben und umfassen sowohl Vertreter aus Ascomyceten (gelb markiert), Bakterien (grün markiert) und aus Säugetieren (blau markiert). Das Protein 13958 ist zur besseren Sichtbarkeit in roter Schrift hervorgehoben.

Das Aktivitätsprofil nach der Zuckergradientenzentrifugation offenbarte keine Komplex I-Aktivität. Weder ein intakter Komplex I noch ein peripherer Arm sind nachweisbar.

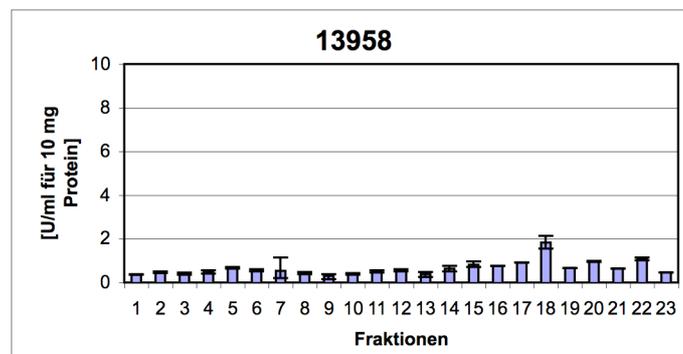


Abb. 4.14: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation für die Mutante 13958. 40 mg Mitochondrienprotein wurde durch eine Zentrifugation auf einem 12 ml Saccharosegradienten aufgetrennt.

Der Western Blot spiegelt dieses nur bedingt wider. Hier zeigt sich in der nachfolgenden Abbildung 4.15, dass geringe Mengen der Untereinheiten 40.1 kDa und 20.9 kDa in den Fraktionen 4-6 detektierbar waren, wo ebenfalls der Komplex I des Wildtyps nachweisbar war. Der Western Blot zeigte eine auffällige Ansammlung der Untereinheit 20.9 kDa in Bereichen hoher Fraktionen zwischen Fraktion 15-18, so dass hier über eine Anhäufung von Assemblierungsintermediaten oder Aggregaten spekuliert werden kann.

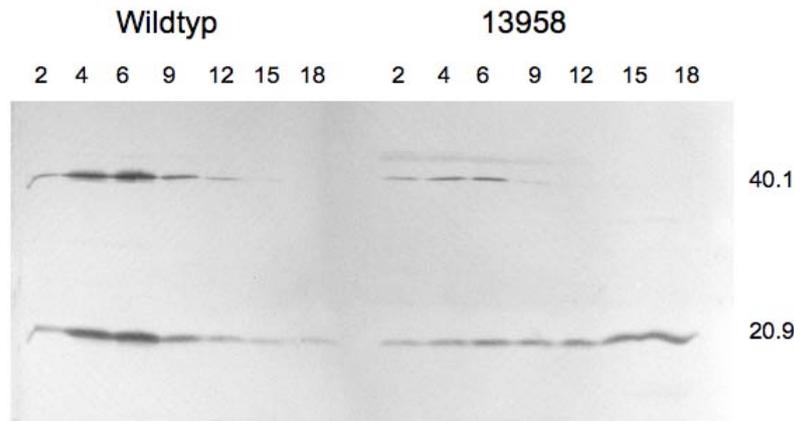


Abb. 4.15: Western Blot der Deletionsmutante 13958 im Vergleich zum Wildtyp. Die Fraktionsnummern sind oberhalb des Bildes angezeigt, auf der rechten Seite ist die apparente Masse der durch Antikörper angefärbten Untereinheit angegeben.

Die Existenz von geringen Mengen vollständig assemblierten und aktiven Komplex I ergab die Überprüfung mit Hilfe der BlauNativ-Gelelektrophorese mit anschließender Komplex I-Färbung, welche in Abb. 4.16 dargestellt ist. Sichtbar ist eine Bande auf der Höhe des Komplex I, welche eine geringe Intensität aufweist. Dies untermauert die Signale im Western Blot, welche geringe Mengen Komplex I vermuten lassen und zeigt auf, dass die Nachweisgrenze im Falle des enzymatischen Tests unterhalb der Färbemethode der BlauNativ-Gele liegt. Zusätzlich erlaubt die Färbung des Komplex IV eine Aussage zur Spezifität der Deletion des Gens *ncu02937* zu treffen, denn dieser erscheint in der Mutante 13958 nicht betroffen und sogar deutlicher aktiv als im Falle des Wildtyps zu sein. Eine Überexpression des Komplex IV zur Kompensation des Komplex I Defektes kann vermutet werden, jedoch fehlen hierfür weitere Belege.

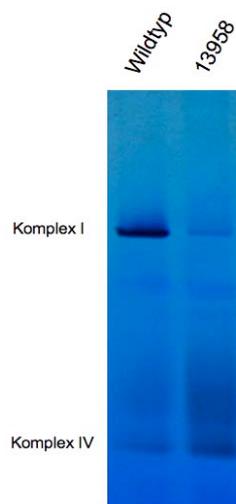


Abb. 4.16: BlauNativ-Gelelektrophorese mit angefärbtem Komplex I und IV der Deletionsmutante 13958 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Komplex I - und die Komplex IV - Bande wurde in der entsprechenden Höhe markiert.

Erst die Konzentration der ersten vier Fraktionen von sechs Saccharosegradienten im großen Maßstab, welche im Western Blot einen assemblierten Komplex I vermuten lassen, und die erneute Auftrennung auf einen Saccharosegradienten mit nachfolgender Zentrifugation offenbart die Existenz geringer Mengen an aktivem Komplex I, wie in Abb. 4.17 sowohl im Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation und auf dem dazugehörigen Western Blot gezeigt werden konnte. Dies bestätigt die Erkenntnisse aus der Färbung des Komplex I der BN-PAGE.

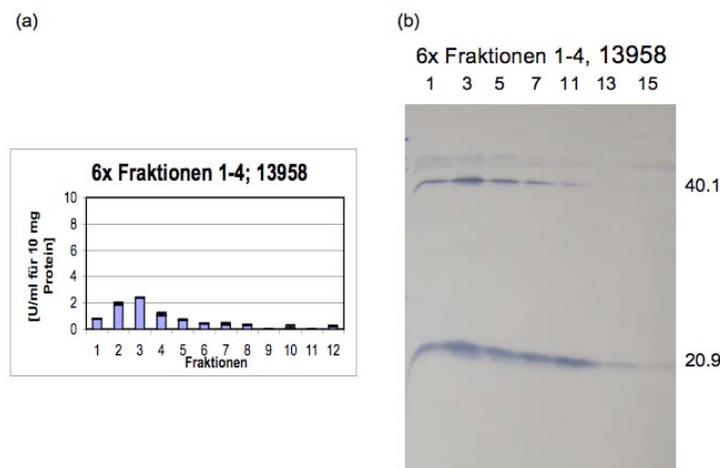


Abb. 4.17: Nachweis eines assemblierten Komplex I in 13958 im Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation. (a) Von sechs Saccharosegradienten wurden die ersten vier Fraktionen vereint und erneut nach einer Ultrazentrifugation aufgetrennt und vermessen. Die Aktivität der Fraktionen 1-8, 10 und 12 von 24 Fraktionen wurde angegeben. (b) Ausgewählte Fraktionen wurden im Western Blot auf die Untereinheiten 40.1 und 20.9 kDa überprüft.

Die Spezifität der Deletion zeigte sich bei Betrachtung der Absorptionsdifferenzen für die Mutante 13958 im Vergleich zum Wildtyp zur Bestimmung der Cytochromgehalte. In der nachfolgenden Abbildung ist das Differenzspektrum dargestellt und offenbart den Gehalt aller Cytochrome in der Mutante 13958 mit einer evidenten Erhöhung des Cytochrom c Gehaltes, welches bei Mutanten mit Komplex I-Defekt häufig beobachtet werden kann. In der Tabelle 4.6 ist der 2,7fach erhöhte Cytochrom c Gehalt der Mutante 13958 ersichtlich.

Tab. 4.6: Cytochromgehalt der Mutante 13958 im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden nach einer Dreifachbestimmung gemittelt.

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
Wildtyp	0,064	0,108	0,122
13958	0,058	0,174	0,330

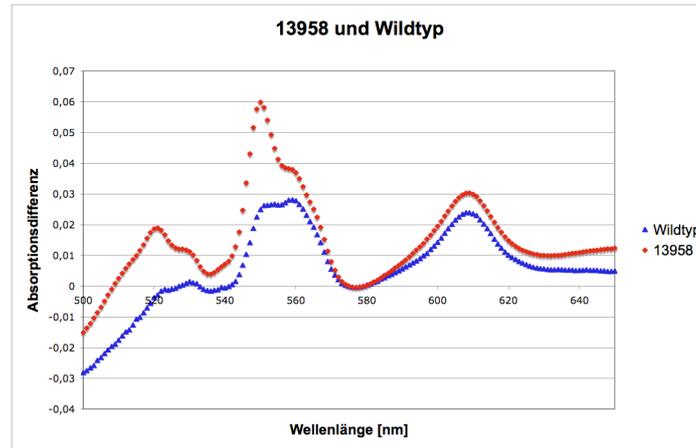


Abb. 4.18: Absorptionsdifferenzspektroskopie der Mutante 13958 im Vergleich zum Wildtyp. Gezeigt ist die dithionitreduzierte Probe minus der lufoxidierten Referenz. Cytochrom a ist im Bereich zwischen 605 – 650 nm, Cytochrom b zwischen 560 – 580 nm und Cytochrom c ist bei 550 – 581 nm sichtbar.

4.2.4 Deletionsmutante 13999

Das Gen *ncu03088* kodiert auf einem Exon ein konserviert hypothetisches Protein mit 521 Aminosäuren. Vorhergesagt werden zwei Transmembrandomänen und eine mitochondriale Präsequenz, welche eine mittlere Reliabilität aufweist (RC=3). Die Anwendung der Domänenzuordnung mit der Pfam-Datenbank zeigt eine Domäne, die zur DUF3375 (DUF = *domain of unknown function*) Familie gehört ohne bisher bekannte Funktion (Bateman, Coggill et al. 2010; Finn, Mistry et al. 2010).

Der enzymatische Test offenbart einen defekten Komplex I und die Existenz eines aktiven und assemblierten peripheren Arms (siehe Abb. 4.19).

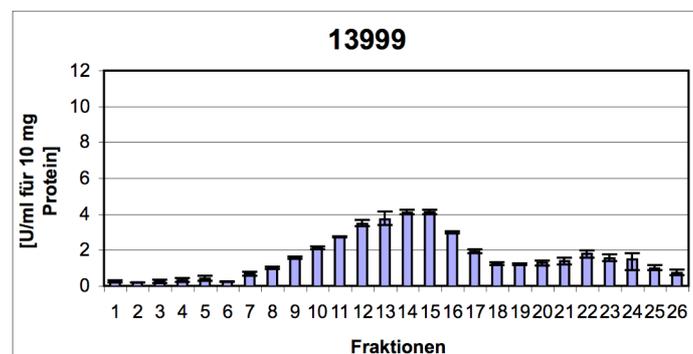


Abb. 4.19: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation für die Mutante 13999. 40 mg Mitochondrienprotein wurde durch eine Zentrifugation auf einem 12 ml Saccharosegradienten aufgetrennt.

Der Western Blot bestätigt die Präsenz des peripheren Arms durch die detektierbare Untereinheit 40.1 und möglicher kleinerer Assemblierungsintermediate des Membranarms aufgrund der Nachweisbarkeit der membranständigen Untereinheit 20.9 kDa in den Fraktionen 12 - 18.

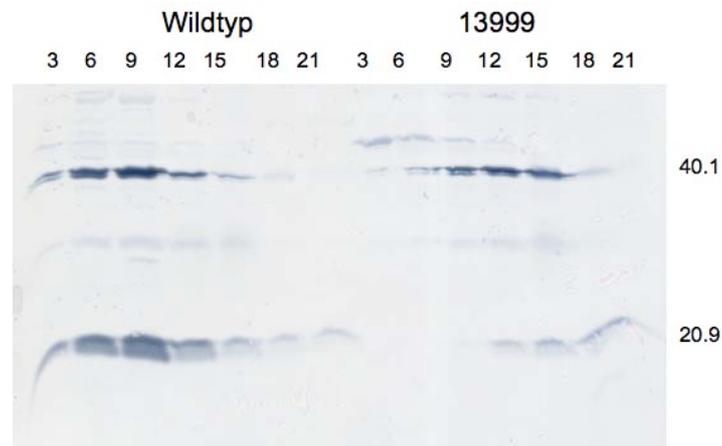


Abb. 4.20: Western Blot der Deletionsmutante 13999 im Vergleich zum Wildtyp. Die Fraktionsnummern sind oberhalb des Bildes angezeigt, auf der rechten Seite ist die apparente Masse der durch Antikörper angefärbten Untereinheit angegeben.

Untermauert wird dies durch einen sichtbaren peripheren Arm in der NADH-abhängigen Färbung der BN-PAGE und zusätzlichen Anfärbung des Komplex IV zur ersten Verifizierung der Spezifität des Defekts (siehe Abb. 4.21). Der Komplex IV zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine ausgeprägtere Bande aufgrund eines möglichen Kompensationseffektes für den Komplex I – Mangel.

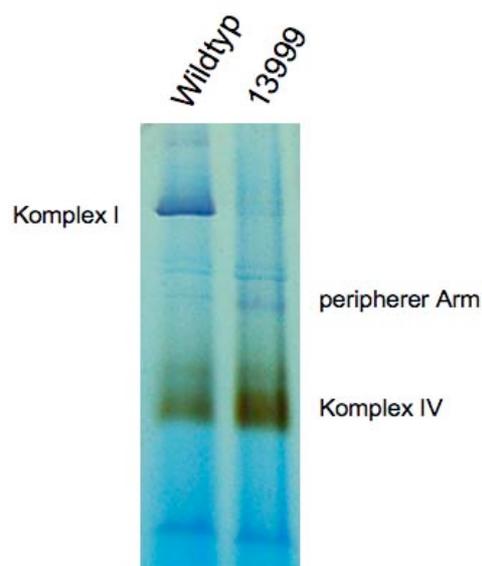


Abb. 4.21: BlauNativ-Gelelektrophorese mit angefärbtem Komplex I und IV der Deletionsmutante 13999 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Komplex I - und die Komplex IV - Bande wurde in der entsprechenden Höhe markiert.

Der Cytochromgehalt bestätigt das Ergebnis, dass der Komplex IV nicht betroffen ist, da die Werte unauffällig waren und lediglich der Gehalt an Cytochrom c erhöht ist, wie es für Komplex I-defiziente Mutanten häufig sichtbar ist.

Tab. 4.7: Cytochromgehalt der Mutante 13999 im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden nach einer Dreifachbestimmung gemittelt.

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
Wildtyp	0,075	0,107	0,102
13999	0,063	0,160	0,283

4.2.5 Die Deletionsmutanten 17876 und 19806

Die Gene *ncu00183* und *ncu02565* werden aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit als Paraloge klassifiziert und die Ergebnisse zur Sequenzanalyse und zur Charakterisierung der entsprechenden Deletionsmutanten werden daher in diesem Kapitel gemeinsam dargestellt.

Die kodierten Proteine weisen beide eine molekulare Masse von 61,9 kDa auf. Postuliert wird eine mitochondriale Präsequenz mit guter Zuverlässigkeit im Falle des Proteins *ncu00183* (RC=2) und mittlerer Zuverlässigkeit für das Protein *ncu02565* (RC=3). Das Gen *ncu00183* umfasst vier Exons, das Gen *ncu02565* zwei.

Beide Proteine gehören der Proteinfamilie DUF185 (*domain of unknown function*) an, welche Proteine verschiedenster Organismen beinhaltet. Offiziell werden dieser Proteinfamilie 920 Proteinsequenzen aus 800 verschiedenen Organismen zugeordnet. Die Funktionen dieser Proteine sind grundsätzlich nicht charakterisiert, es existiert jedoch ein Vertreter aus *Brucella melitensis*, der als ATP Synthase β Untereinheit Transkriptionsfaktor / ρ Protein beschrieben wird und unter der Abkürzung „BM“ im nachfolgend gezeigten Stammbaum dargestellt ist. Das Protein MidA aus *Dictyostelium discoideum* wurde von Torija et al. in seiner Funktion genauer charakterisiert (Torija, Vicente et al. 2006).

Für den Stammbaum wurden mit Hilfe der BLAST-Funktion verschiedene homologe Proteine zu den Proteinen *ncu02565* und *ncu00183* ausgewählt und der phänetische Stammbaum ermittelt. Da der DUF185 Familie auch Proteine zugeordnet werden, die aus Organismen stammen, die keinen Komplex I tragen, wurden das Protein A6ZZG2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und Q6CJT6 aus *Kluyveromyces lactis* als

exemplarische Vertreter in die Kalkulation einbezogen. Jedoch zeigten sich beide Proteine in der phylogenetischen Betrachtung sehr weit von den anderen ausgewählten Proteinen entfernt und wurden nicht im Stammbaum dargestellt. Demnach kann postuliert werden, dass diese Proteine einen geringeren Homologiegrad aufweisen und demnach möglicherweise andere Funktionen ausführen als einen spezifischen Komplex I-Einfluss.

Der dargestellte phänetische Stammbaum lässt sich in zwei Gruppen aufteilen. Die beiden Proteine aus *N. crassa* befinden sich jeweils in einer der beiden Gruppen, wobei in der Gruppe um das Protein ncu00183 ebenfalls das näher charakterisierte Protein MidA vertreten ist. Aufgrund zunächst fehlender Anhaltspunkte für eine Funktionsweise dieser Proteine wurde der einzige Vertreter der DUF185 Familie mit postulierter Funktion in die Betrachtung mit einbezogen und eine ähnliche Rolle für die beiden Proteine ncu00183 und ncu02565 in Erwägung gezogen. Dieses Protein aus *B. melitensis* mit der schon erwähnten Funktion als ATP synthase β Untereinheit Transkriptionsfaktor / ρ Protein mit Homologien zum arsR Protein, welches ein bakterieller Transkriptionsfaktor mit DNA-Bindemotif ist, wurde jedoch durch automatische Zuordnung annotiert und es lassen sich keine experimentellen Daten hierzu in der Literatur finden (Wu und Rosen 1991; DeIVecchio, Kapatral et al. 2002; Torija, Vicente et al. 2006).

Zur Klarifizierung einer möglichen Funktion der Proteine für die Transkription und unter Berücksichtigung der signifikant identifizierbaren mitochondrialen Präsequenzen beider Proteine wurde eine mögliche Einflussnahme auf den RNA-Metabolismus in den Mitochondrien mit Hilfe von Northern Blots untersucht. Die Ergebnisse werden im Kapitel 4.3.1 dargestellt.

Abkürzung	Bezeichnung des Gens	Organismus	Klassifizierung / Genbezeichnung
PS1	A3LX1	Pichia stipitis	Predicted protein
PS2	A3LZP8	Pichia stipitis	Predicted protein
DH1	Q6BNU5	Debaryomyces hansenii	Predicted protein
DH2	Q6BQD3	Debaryomyces hansenii	Predicted protein
CA1	Q59RN1	Candida albicans	predicted uncharacterized protein
PN2	Q0V1N6	Phaeosphaeria nodorum	putative uncharacterized protein
CI1	E9DJ90	Uccidiales posadasii str. Silveira	putative uncharacterized protein
AC2	A6REZ1	Ajellomyces capsulata	putative uncharacterized protein
AN1	AZR812	Aspergillus niger	Similarity to the uncharacterized A. thaliana protein EP1033405-A2
SS1	A7E5I4	Sclerotinia sclerotiorum	putative uncharacterized protein
MG2	A4RBP3	Magnaporthe oryzae	putative uncharacterized protein
AT2	Q1JPN1	Arabidopsis thaliana	evidence at protein level
AT3	Q9LJ16	Arabidopsis thaliana	Predicted protein
PA1	B2AXL2	Podospira anserina	Predicted protein
OT	Q017N0	Ostreococcus tauri	ATP synthase beta subunit/transcription termination factor rho-like
ZM	B4FH65	Zea mays	putative uncharacterized protein
MT	B7FLE5	Medicago truncatula	putative uncharacterized protein
PG1	A5DD74	Pichia guilliermondii	putative uncharacterized protein
CA3	Q5APE5	Candida albicans	putative uncharacterized protein
AF1	B0Y9U6	Aspergillus fumigatus	putative uncharacterized protein
CG2	Q2HFV3	Chaetomium globosum	putative uncharacterized protein
PA2	B2AYH8	Podospira anserina	Predicted protein
NH2	C7Y189	Nectria haematococca	Predicted protein
MG1	A4QRE4	Magnaporthe oryzae	putative uncharacterized protein
BF2	A6SJC5	Botryotinia fuckeliana	putative uncharacterized protein
EN2	Q5BD68	Aspergillus nidulans	putative uncharacterized protein
AT2	Q1JPN1	Arabidopsis thaliana	evidence at protein level
AT3	Q9LJ16	Arabidopsis thaliana	Predicted protein
MM	Q9CWG8	Mus musculus	Protein midA homolog, mitochondrial
HS	Q7L592	Homo sapiens	Protein midA homolog, mitochondrial
BM	Q8Y187	Brucella melitensis	ATP synthase beta subunit transcription termination factor rho protein
MidA	Q54S83	Dictyostelium discoideum	Protein midA, mitochondrial
19806	Q7SHQ0	Neurospora crassa	ncu02565
17876	Q7RXA4	Neurospora crassa	ncu00183

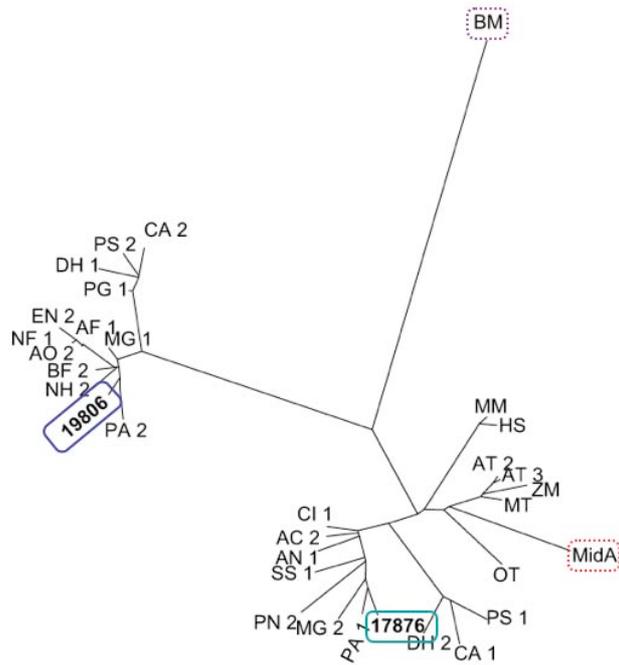


Abb. 4.22: Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen homologen Proteinen der DUF185-Proteinfamilie. Die Proteine wurden durch BLAST ermittelt und mit Clustal W die Homologien bestimmt. Die verwendeten Abkürzungen sind in der Tabelle angegeben und umfasst Proteine verschiedener Organismen. Die Proteine 19806 und 17876 sind durch farbige Linien hervorgehoben, die Proteine MidA aus *Dictyostellum discoideum* und das Protein aus *Brucella melitensis* (BM) wurden farblich durch gestrichelte Linien markiert.

Der enzymatische Test nach der Zuckergradientenzentrifugation zur Bestimmung des Aktivitätsprofils im großen Maßstab lässt keinen Komplex I und keinen peripheren erkennen.

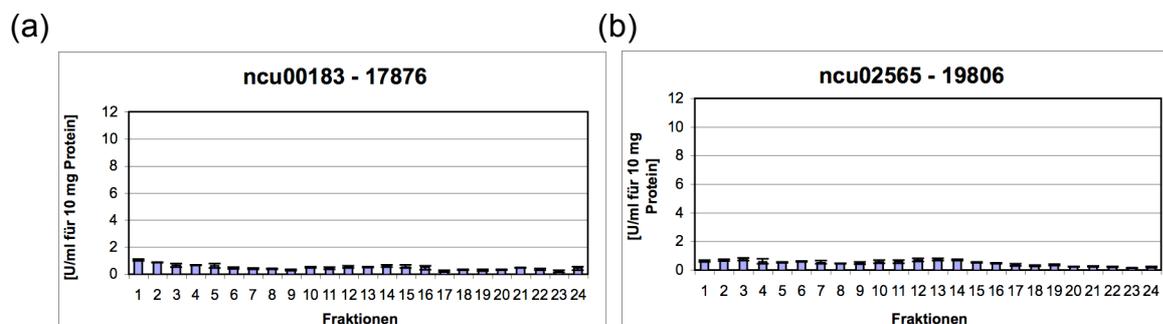


Abb. 4.23: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation für die Mutanten 17876 und 19806. (a) und (b) Jeweils 40 mg Mitochondrienprotein wurde durch eine Zentrifugation auf einem 12 ml Saccharosegradienten aufgetrennt.

Der dazugehörige Western Blot dagegen lässt einen geringen Anteil assemblierten Komplex I vermuten, da in den Fraktionen 2-8 entsprechende Signale sowohl der immunologisch nachgewiesenen Untereinheit 20.9 des Membranarms wie der Untereinheit 40.1 des peripheren Arms mit dem Sedimentationsverhalten des vollständigen Komplex I korrelierten. Die Intensitäten der Signale dagegen weisen keine vollständige Kosedimentation auf. Die intensivsten Signale für die Untereinheit 20.9 kDa der Mutante 17876 finden sich in den Fraktionen 8-12, wogegen die Untereinheit 40.1 kDa in den Fraktionen 4-8 die signifikantesten Signale aufweist mit einer Abwesenheit eines Signals in der Fraktion 12. Bei der Mutante 19806 zeigt sich ein ähnliches Verhalten mit einer konstanten Zunahme der Bandenintensität der Untereinheit 20.9 kDa zu Fraktionen geringerer Saccharosekonzentration. Die intensivsten Signale sind ab der Fraktion 14 erkennbar. Die Untereinheit 40.1 kDa dagegen ist nur in den Fraktionen 4-8 detektierbar. Die Abwesenheit beider Proteine verursacht einen ähnlichen Defekt mit minimalen Mengen assemblierten Komplex I, der im enzymatischen Test keine Aktivität aufweist. Zusätzlich erscheint der Membranarm bzw. seine Assemblierungsintermediate über den gesamten Saccharosegradienten verteilt.

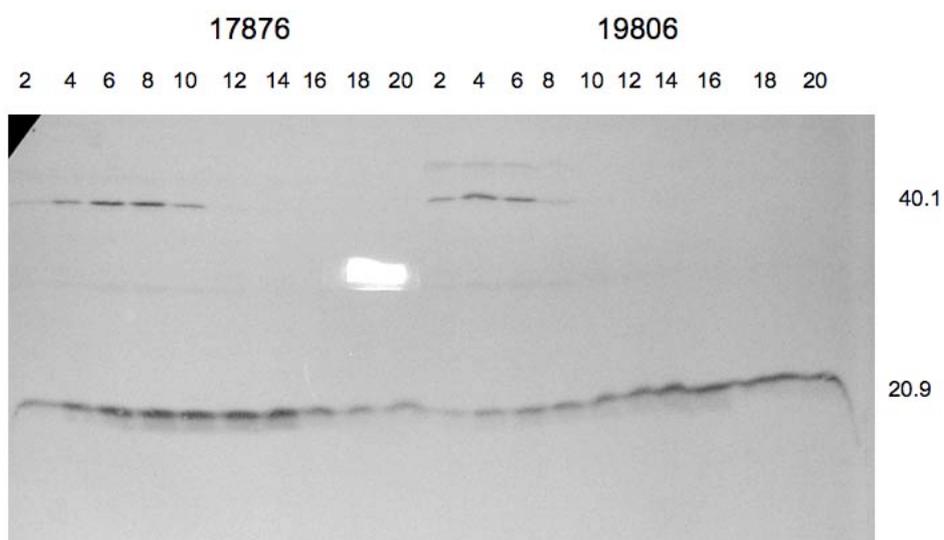


Abb. 4.24: Western Blot der Deletionsmutanten 17876 und 19806. Die Fraktionsnummern sind oberhalb des Bildes angezeigt, auf der rechten Seite sind die Massen der durch Antikörper angefärbten Untereinheiten angegeben.

Dass der vermutete geringe Anteil Komplex I auch eine NADH-Oxidation katalysieren kann, zeigte die Färbung des Komplex I in BlauNativ-Gelen nachfolgend in der Abb. 4.25 gezeigt. Hierbei zeigten sich geringe Komplex I Mengen und ebenso war der

Komplex IV spezifisch anzufärben. Die Mutante 19806 zeigt hier eine erhöhte Aktivität des Komplex IV.

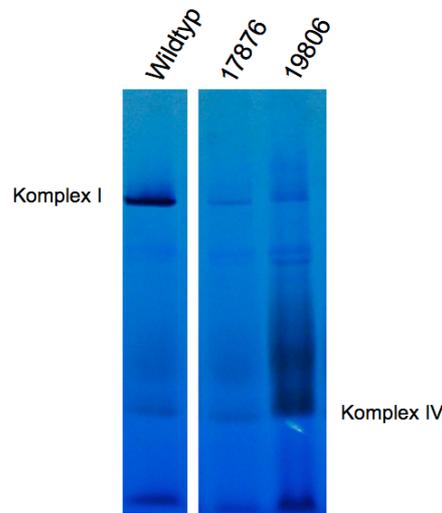


Abb. 4.25: BlauNativ-Gele mit angefärbtem Komplex I und IV der Mutanten 17876 und 19806 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die sichtbaren Banden der Atmungskettenkomplexe sind entsprechend markiert.

Die Bestimmung der Cytochromgehalte zeigte keine signifikante Auffälligkeit im Vergleich zum Wildtyp. Der Gehalt an Cytochrom a ist mit dem Wildtyp vergleichbar, das Cytochrom b dagegen um 29% bzw. 38% erhöht. Der Gehalt an Cytochrom c dagegen weist in den Mutanten eine signifikante Erhöhung auf, wie es bei vielen Mutanten mit Defekten in der Atmungskette zu beobachten war. In der Mutante 17876 war der Gehalt im Vergleich zum Wildtyp um 135% und in der Mutanten 19806 um 295% erhöht.

Tab. 4.8: Cytochromgehalt der Mutanten 17876 und 19806 im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden nach einer Dreifachbestimmung gemittelt.

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
Wildtyp	0,075	0,107	0,102
17876	0,082	0,138	0,240
19806	0,073	0,148	0,301

4.2.6 Deletionsmutante 21221

Das Gen *ncu03439* (alternative Bezeichnung *ncu21508*) besteht aus drei Exons und kodiert ein Protein mit 390 Aminosäuren. Das kodierte Protein weist eine eindeutige S-Adenosyl-Methionin (SAM) - Methyltransferase Domäne auf und ist homolog zum menschlichen Protein C20orf7, welches eine spezifische und klinische Bedeutung für die Aktivität des Komplex I hat (Sugiana, Pagliarini et al. 2008; Gerards, Sluiter et al. 2010). Das Protein C20orf7 zeigte sich peripher assoziiert an die Matrixseite der mitochondrialen inneren Membran und ist offensichtlich an einem frühen Schritt der Komplex I-Assemblierung beteiligt. Sein Fehlen führt zu einer nahezu vollständigen Abwesenheit des Komplex I. Die Relevanz des Proteins für die Anwesenheit der mitochondrial kodierten ND1 Untereinheit wurde über die Detektion [³⁵S]-markierter mitochondrialer Untereinheiten in 2D-PAGE Experimenten nachgewiesen. Postuliert wird eine Bedeutung in der Aktivierung der humanen Untereinheit NDUFB3 durch Methylierung (Carroll, Fearnley et al. 2005; Gerards, Sluiter et al. 2010). Diese Untereinheit ist homolog zur NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Untereinheit B12 in *N. crassa*, welche von dem Gen *ncu09002* kodiert wird und im Membranarm lokalisiert ist mit einer postulierten Transmembranhelix. In *B. taurus* zeigte sich eine post-translationale Modifikationsform durch zwei- bis dreimalige Methylierung von verschiedenen Histidinen (Carroll, Fearnley et al. 2005). Die Homologien zu dem C20orf7 Protein im Menschen und anderen SAM-Methyltransferasen ist eindeutig in phylogenetischen Betrachtungen belegbar. Hierfür wird in der nachfolgenden Abbildung ein Ausschnitt eines Alignments zwischen verschiedenen SAM-Methyltransferasen und dem Protein 21221 dargestellt. Es existiert ein Bereich hoher Ähnlichkeit und der direkte Sequenzvergleich des humanen C20orf7 Proteins mit dem Protein aus *N. crassa* führt zu einem Identitätsgrad von 54%, einem Score von 582 und einem *E-value* von $2,7 \cdot 10^{-68}$. Demzufolge ist die Verwandtschaft der beiden Proteine signifikant und eine ähnliche Funktionsweise ist annehmbar.

Der Western Blot zeigt eine eindeutige Abwesenheit des peripheren Arms bei einer Existenz von großen Membranarmintermediaten. Dies stellt eine Diskrepanz zur postulierten Bedeutung im Menschen dar, da hier von einer erfolgreichen Assemblierung des peripheren Arms ausgegangen werden kann unter Beeinträchtigung des Membranarms. Die mitochondrial kodierten Untereinheiten wie auch die im Menschen beeinträchtigte ND1 Untereinheit stellen essentielle und im Zentrum des Membranarms liegende Untereinheiten dar, so dass eine Beeinträchtigung einen fehlerhaft assemblierten Membranarm vermuten lassen, nicht jedoch eine vollständige Abwesenheit des peripheren Arms.

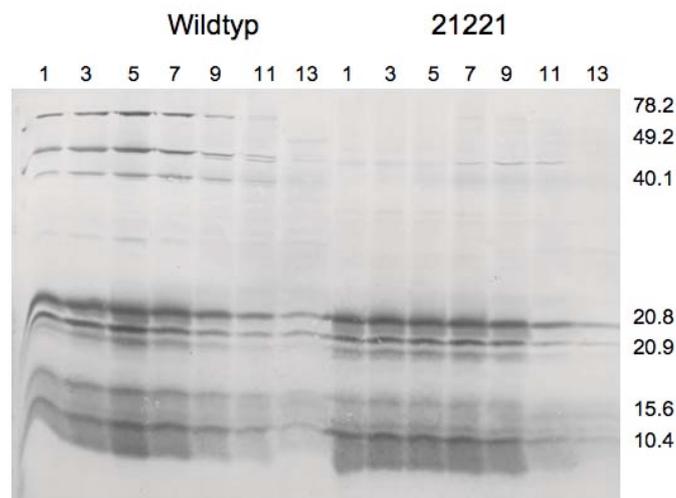


Abb. 4.28: Western Blot der Deletionsmutante 21221 im Vergleich zum Wildtyp. Die Fraktionsnummern sind oberhalb des Bildes angezeigt, auf der rechten Seite ist die Masse der durch Antikörper angefärbten Untereinheit angegeben. Hierbei gehörten die Untereinheiten 78.2, 49.2 und 40.1 kDa zum peripheren Arm, die Untereinheiten 20.8, 20.9, 15.6 und 10.4 zum Membranarm.

Bestätigung finden die bisherigen Ergebnisse in der NADH-abhängigen Färbung der BN-PAGE und der zusätzlichen Komplex IV- Färbung. Hierbei ist kein Komplex I oder peripherer Arm identifizierbar, jedoch eine deutliche Komplex IV Existenz (siehe Abb. 4.29). Aufgrund der unverhältnismäßig deutlichen Komplex IV Anfärbung wurden beide Gele nach der jeweiligen Färbung dargestellt. Ein Kompensationseffekt aufgrund des fehlenden Komplex I durch den Komplex IV kann bei dieser Darstellung erneut diskutiert werden.

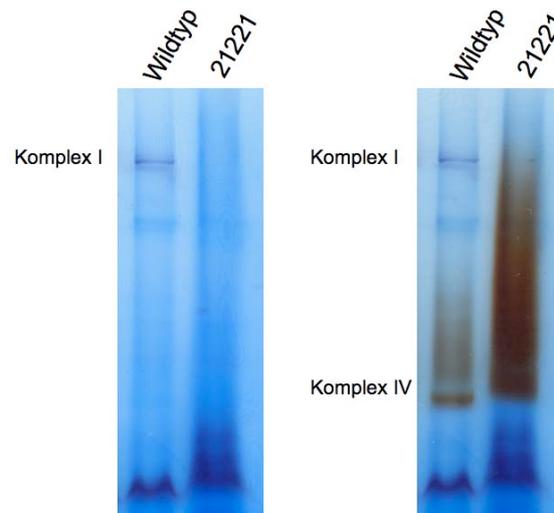


Abb. 4.29: BlauNativ-Gelelektrophorese mit angefärbtem Komplex I und IV der Deletionsmutante 21221 im Vergleich mit dem Wildtyp. Die Komplex I - und die Komplex IV - Bande im rechten Bildausschnitt wurde in der entsprechenden Höhe markiert.

4.3 Untersuchung der Bedeutung von Pentatricopeptid-Repeat-Proteinen für die Komplex I-Biogenese

Neben der Identifizierung von potentiellen Biogeneseproteinen für den Komplex I über die Anwendung des im Kapitel 4.1 beschriebenen differentiellen Genomvergleich bietet es sich an, bestimmte Proteinklassen selektiv zu betrachten, deren bisherige Rollen einen spezifischen Einfluss auf die Biogenese der Atmungskettenkomplexe vermuten lassen. Ein solcher Sachverhalt ist für die Klasse der Pentatricopeptid-Repeat-Proteine (PPR) gegeben, da alle bisher bekannten Funktionen dieser Familie innerhalb von Organellen im Rahmen der Proteinexpression stattfinden (siehe Kapitel 2.4). Die teilweise spezifischen Vorgänge in der Prozessierung einzelner mitochondrial kodierter Proteine machte diese Proteinklasse interessant für die Untersuchung der acht PPR-Proteine in *N. crassa*.

Die Identifizierung der PPR-Proteine erfolgte zum einen über die Annotation als PPR-Protein in der MIPS-Datenbank und zum anderen über die Suche nach Orthologen zum OTP43-Protein aus *A. thaliana*, welches einen nachgewiesenen spezifischen Einfluss auf den Splicingvorgang eines Introns in der mRNA der mitochondrial kodierten Komplex I-Untereinheit NAD1 aufweist (de Longevialle, Meyer et al. 2007). Hierdurch wurden neben den annotierten sieben PPR-Proteinen zusätzlich das Protein ncu07684 identifiziert.

Die Abgrenzung der Klasse der PPR-Proteine stellt sich als nicht eindeutig dar, da neben den sieben annotierten PPR-Proteinen auch in anderen Proteinen PPR-Domänen mit der PFAM-Datenbank identifizierbar waren. Neben dem genannten Protein nu07684 gehört auch beispielsweise das Komplex I-Chaperon CIA84 zu den Proteinen mit einer PPR-Domäne. Einzuschränken ist hierbei, dass nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es sich hierbei um eine signifikante Zuordnung oder lediglich eine zufällige Sequenzähnlichkeit handelt.

Nachfolgend ist der phänetische Stammbaum der PPR-Proteine sowohl von *N. crassa* und ausgewählter homologer PPR-Proteine aus *A. thaliana* und *S. cerevisiae* dargestellt. Hervorzuheben sind die beiden Proteine PET309 und ncu08692, die in der Literatur beschrieben die gleichen Funktionen bei der Translation und Stabilisierung des COX1-Transkripts in *S. cerevisiae* und *N. crassa* ausüben, in der phylogenetischen Betrachtung jedoch nicht direkt benachbart sind (Coffin, Dhillon et al. 1997).

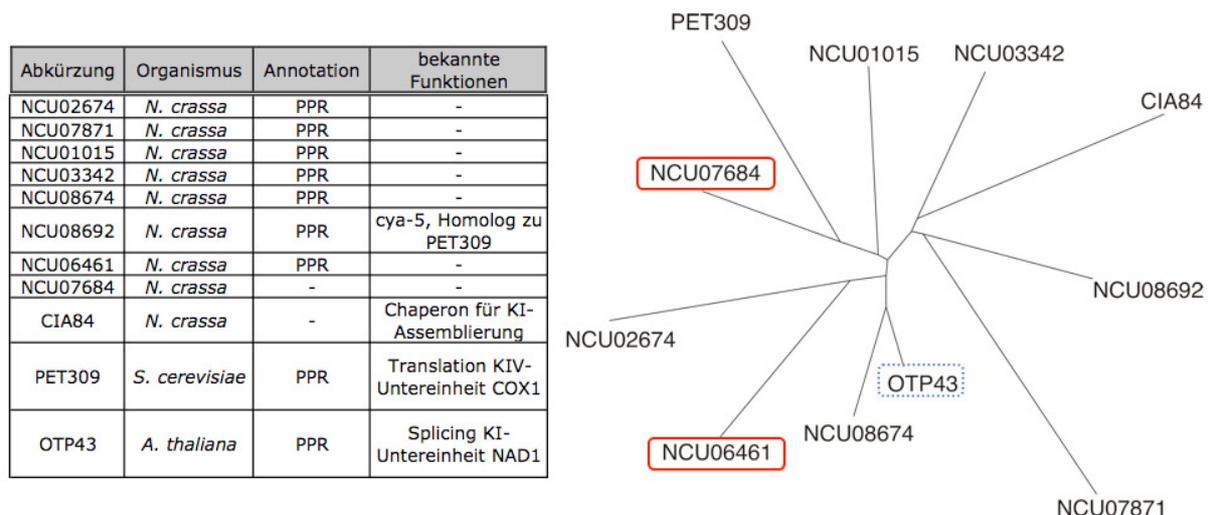


Abb. 4.30: Graphische Darstellung der phylogenetischen Beziehungen zwischen homologen Proteinen der PPR-Proteinfamilie. Die sieben annotierten PPR-Proteine aus *N. crassa* und zwei exemplarische PPR-Proteine aus anderen Organismen wurden mit aufgeführt. Das Protein OTP43 mit seiner spezifischen Funktion für den Splicingvorgang der Komplex I-Untereinheit nad1 wurde mit einer gestrichelten blauen Linie markiert. Die beiden Proteine mit dem nachfolgend dargestellten Komplex I-Einfluss sind rot markiert.

Drei Deletionsmutanten konnten im *Neurospora Genome Project* nur als heterokaryotische Mutanten hergestellt werden und entfielen demnach für eine nachfolgende Untersuchung (ncu02674, ncu07871, ncu20322 bzw. ncu01015). Die Deletionsmutanten der Gene ncu03342 und ncu08674 zeigten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Komplex I-Biogenese. In dem phänetischen

Stammbaum ist das Protein ncu08674 das direkt benachbarte Protein zum OTP43-Protein, jedoch konnte ein spezifischer Komplex I-Einfluss des Proteins aus *N. crassa* nicht bestätigt werden. In der Deletionsmutante des Gens ncu08692 konnte die bekannte Funktion des CYA-5-Proteins Relevanz mit ihrer Relevanz für den Komplex IV in der BlauNativ-Färbung gezeigt werden (Coffin, Dhillon et al. 1997).

Nachfolgend werden die Ergebnisse der beiden PPR-Proteine ncu06461 (ncu20711) und ncu07684 aufgeführt, bei denen im Rahmen dieser Arbeit eine Relevanz für die Komplex I-Biogenese nachweisbar waren.

4.3.1 Die Deletionsmutanten 20112 und 20449

Das Gen ncu06461 (alternative Bezeichnung ncu20711) kodiert auf zwei Exons ein Protein mit der Gesamtlänge von 1028 Aminosäuren, welches als konserviertes, hypothetisches Protein klassifiziert ist. Die kalkulierte molekulare Masse umfasst 115,4 kDa und die Proteinsequenz zeigt in Hydrophobizitätsplots keine potentielle Transmembrandomäne. Demnach kann man von einem löslichen Protein ausgehen. Es ist keine mitochondriale Präsequenz feststellbar. In der Mutante 20112 ist dieses Gen deletiert und die Auswirkungen der Deletion wurden untersucht.

Das Gen ncu07684 (untersuchte Deletionsmutante 20499) kodiert auf einem Exon ein Protein von einer Gesamtlänge von 641 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 72 kDa und der gleichen Klassifizierung als konserviertes, hypothetisches Protein. Es konnte keine Transmembrandomäne oder mitochondriale Präsequenz identifiziert werden.

Beide Proteine zeigen Domänen, die der PPR-Familie zuzuordnen sind. Im Falle des Proteins ncu20711 lassen sich mit der PFAM Datenbank zwei PPR-Domänen unterschiedlicher Signifikanz bestimmen. Eine Domäne weist einen E-Value von 0,024 und die andere einen Wert von 0,9 auf. Mit der Kalkulation der TIGRFAM Datenbank werden vier PPR Domänen kalkuliert.

Das Protein ncu07684 dagegen weist durch die Anwendung von PFAM lediglich eine PPR Domäne auf, mit der TIGRFAM im Vergleich drei. Die unterschiedlichen Ergebnisse kommen durch den sich ergänzenden Charakter der beiden auf *Hidden Markov Models* (HMMs) basierenden Datenbanken zustande (Bateman und Haft 2002; Haft, Selengut et al. 2003; Finn, Mistry et al. 2010). Die PFAM-Datenbank

basiert auf einer großen Ansammlung von HMMs kombiniert mit Alignments und Annotationen. Die TIGRFAM Datenbank dient hierzu als Ergänzung, da bei dieser der Fokus auf konservierte Proteine in Prokaryoten gelegt ist (Bateman und Haft 2002).

Die Ergebnisse des enzymatischen Tests nach der Saccharosegradientenzentrifugation zeigen die eindeutige Existenz eines peripheren Arms mit hoher Aktivität bezüglich der Katalyse der Redoxreaktion. Die Verschiebung des peripheren Arms aufgrund eines anderen Sedimentationsverhaltens wird in den Abbildungen deutlich.

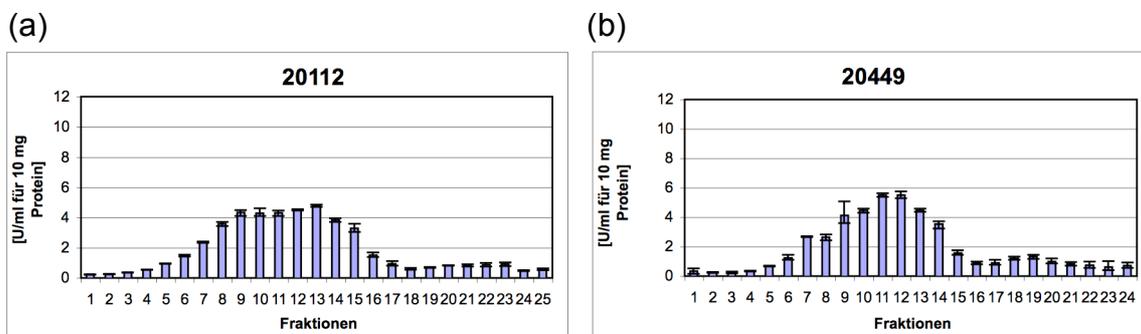


Abb. 4.31: Aktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation für die Mutanten 20112 und 20449. (a) und (b) 40 mg Mitochondrienprotein der jeweiligen Mutante wurde durch eine Zentrifugation auf einem 12 ml Saccharosegradienten aufgetrennt.

Der Western Blot untermauert die Existenz des peripheren Arms in Abwesenheit eines detektierbaren Membranarms. Bei beiden Deletionsmutanten waren die im peripheren Arm lokalisierten Untereinheiten 78.2 kDa und 40.1 kDa ebenso wie im Wildtyp detektierbar, dagegen zeigte lediglich der Wildtyp Signale für die membranständigen Untereinheiten 20.9 kDa und 15.6 kDa.

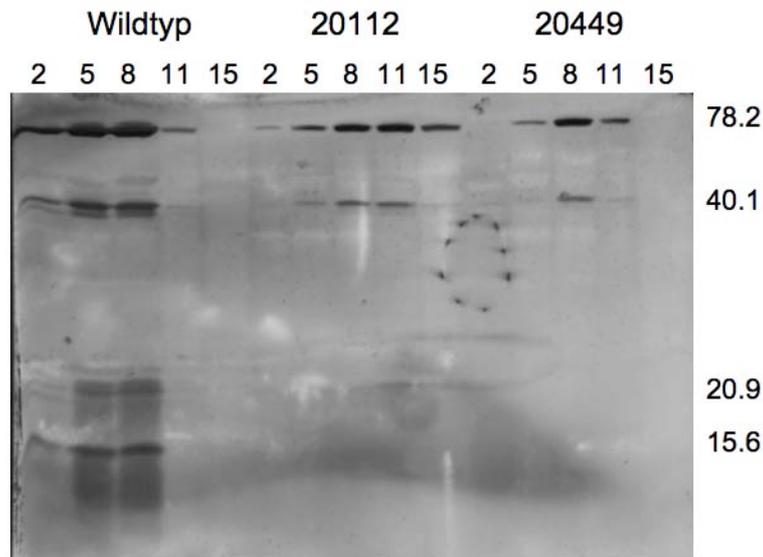


Abb. 4.32: Western Blot für die Mutanten 20112 und 20449 im Vergleich zum Wildtyp. Die aufgetragenen Fraktionen sind oben angegeben, die molekularen Massen der durch Antikörper detektierten Untereinheiten sind auf der rechten Seite angegeben.

Ebenso zeigt die NADH-spezifische Färbung des BlauNativ-Gels die Präsenz des peripheren Arms in beiden Mutanten. Bemerkenswerterweise sind in der Spur der Mutante 20112 eventuell minimale Mengen assemblierter Komplex I vorhanden, da auf der gleichen Höhe wie beim Wildtyp eine dezente Bande sichtbar ist. Die anderen dargestellten Ergebnisse deuten diese Beobachtung nicht an, so dass spekuliert werden kann, ob dies ein einmaliges Ereignis aufgrund von Verunreinigungen ist. Die Färbung des Komplex IV demonstriert eine evidente Existenz des Komplex IV in den Deletionsmutanten.

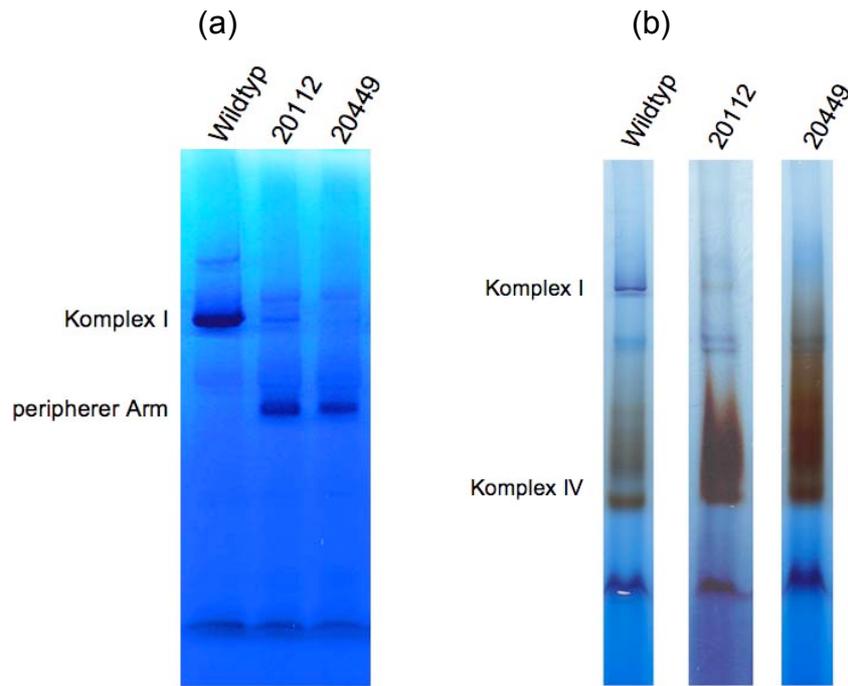


Abb. 4.33: Enzymatische Färbung der BlauNativ-Gele der Mutanten 20112 und 20449 im Vergleich zum Wildtyp. Zwei verschiedene Mitochondrienpräparationen wurden für die Färbung des Komplex I und IV verwendet. Die Spuren wurden oben beschriftet und die sichtbaren Banden jeweils links beschriftet. (a) NADH-abhängige Färbung des Komplex I und peripheren Arms durch die Redoxreaktion unter Bildung von Formazan. (b) Zusätzlich zur angefärbten Komplex I-Bande wurde der Komplex IV angefärbt. Der periphere Arm ist hierbei nicht sichtbar.

Hinweise auf die intakten Atmungskettenkomplexe III und IV liefern ergänzend die Cytochrombestimmungen mit einem vergleichbaren Gehalt an Cytochrom a des Wildtyps mit dem Mutanten und signifikant erhöhtem Cytochrom b und c.

Tab. 4.9: Cytochromgehalt der Mutanten 20112 und 20449 im Vergleich zum Wildtyp. Die Daten wurden nach einer Dreifachbestimmung gemittelt.

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
Wildtyp	0,075	0,107	0,102
20112	0,094	0,178	0,228
20449	0,081	0,195	0,242

4.3.1.1 Heterologe Expression der PPR-Genen aus *N. crassa* in *E. coli*

Um die Rolle der Pentatricopeptide-Repeat-Proteinen zu untersuchen wurden in Zusammenarbeit mit Anastasia Albrandt die beiden Gene *ncu20711* und *ncu07684* heterolog als Fusionsprotein im Expressionsstamm BL21 (DE3) von *Escherichia coli* exprimiert. Die Gene wurden zu diesem Zweck in den Klonierungsvektor

pJET1.2/blunt eingebaut und nachfolgend in den Expressionsvektor pET-28b umgesetzt. Hierbei wurden gängige Klonierungsstrategien angewendet unter Anfügung der entsprechenden Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen NdeI und HindIII am 5'-Ende der Primer für die Polymerasekettenreaktion. Der pET-28b Vektor verfügt über einen N-terminalen Hexahistidintag mit der Möglichkeit der Abtrennung durch eine Thrombin – Schnittstelle und einen C-terminalen Tag. Für die beiden Gene wurden zwei pET-28 Konstrukte erstellt. Bei einem Konstrukt wurde das Stoppcodon deletiert, so dass die Translation über das Ende des Gens hinaus bis zum nächsten Stoppcodon erfolgt und hierbei ein C-terminaler Hexahistidintag zusätzlich zum N-terminalen Tag angefügt wurde. Mit dem Stoppcodon im Gen wurde lediglich der N-Terminus mit Hexahistidintag exprimiert (Albrandt 2011).

Die Expression zeigte sich für alle Konstrukte nicht trivial. Im Falle des Proteins ncu20711 und der erwarteten molekularen Masse von 115 kDa war in der Coomassie - Färbung der SDS-PAGE das Protein nur in geringen Mengen angefärbt, der Western Blot unter Verwendung eines Antikörper gegen den Hexahistidintag zeigte dagegen eine Expression des Proteins (Abb. 4.34). Das Protein ncu07684 mit lediglich 72 kDa kalkulierter Molekülmasse war deutlich sichtbar sowohl in der Blaufärbung wie auch im Western Blot (Abb. 4.35) (Albrandt 2011).

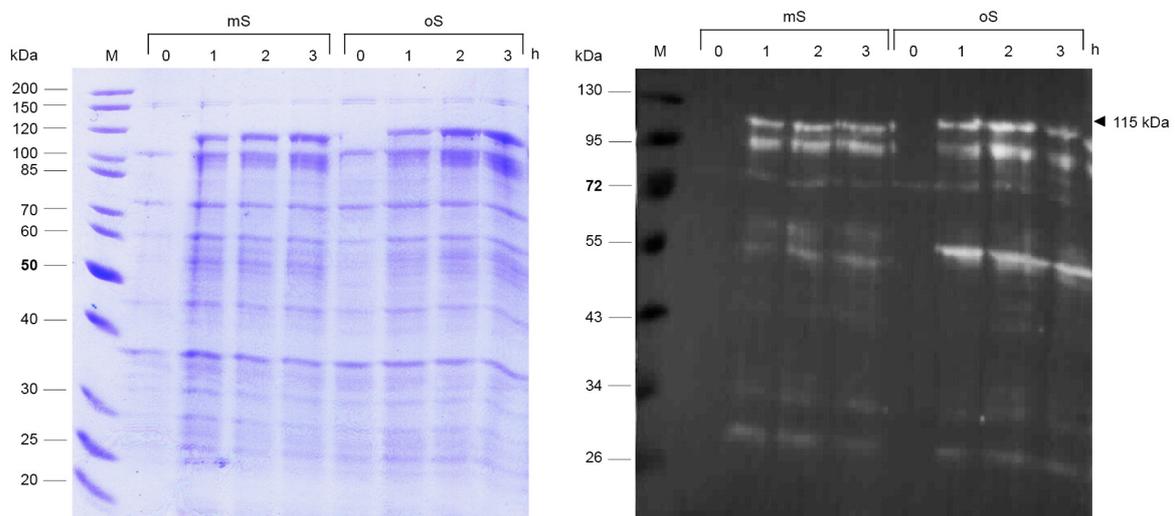


Abb 4.34: Expression von ncu20711 mS - mit Stoppcodon und oS - ohne Stoppcodon unter den Bedingungen: 37 °C / OD 0,4 / 0,5 mM IPTG (Albrandt 2011).

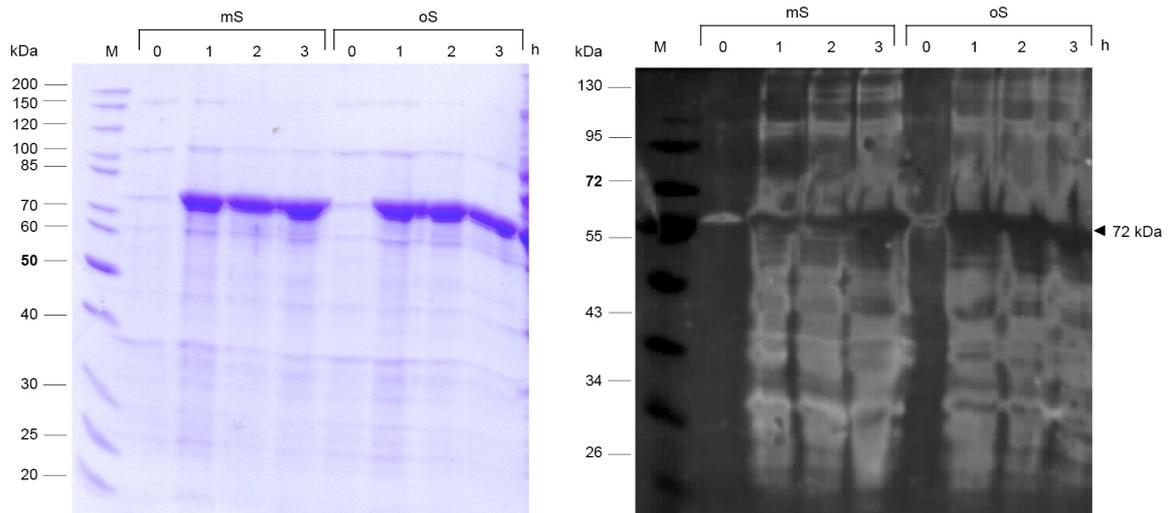


Abb. 4.35: Expression von ncu07684 mS - mit Stopcodon und oS - ohne Stopcodon unter den Bedingungen: 37 °C / OD 0,4 / 0,5 mM IPTG (Albrandt 2011).

Die Problematik gestaltete sich in der übermäßigen Produktion von sogenannten Einschlusskörperchen, die auch als „*inclusion bodies*“ bezeichnet werden, und bei beiden Proteinen den Anteil an löslichem Protein im Überstand drastisch reduzierten. Dies wird in der Abb. 4.36 deutlich, welche die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugation des Proteins ncu07684 gezeigt werden und im Überstand Ü2 nach der zweiten Zentrifugation (high spin) nur minimal detektierbare Mengen des Proteins feststellbar waren. Auf eine Darstellung der Ergebnisse des Proteins ncu20711 wird verzichtet, da im Überstand Ü2 kein Protein sichtbar war.

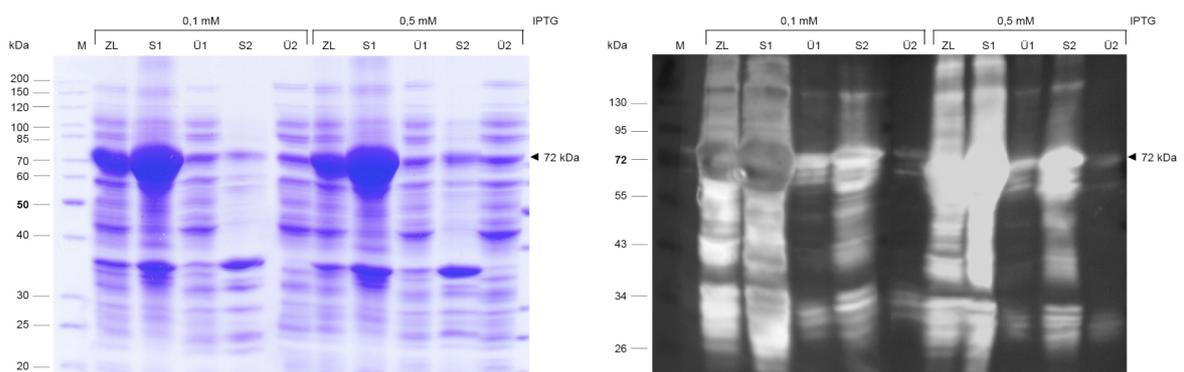


Abb. 4.36: Differentielle Zentrifugation nach der Expression von ncu07684 unter den Bedingungen: 18 °C / 20 h / OD 0,4 / 0,1 und 0,5 mM IPTG; M: Marker; ZL: Zelllysate; S1, Ü: Überstand und Sediment nach der 1. Zentrifugation (low spin); S2, Ü2: Überstand nach der 2. Zentrifugation (high spin) (Albrandt 2011).

Die Varianz möglicher relevanter Expressionsparameter wie die Expressionstemperatur, IPTG-Konzentration, Zeitpunkt der Induktion oder die

Pufferzusammensetzung beim Zellaufschluss führten zu keinen signifikanten Verbesserungen. Für die Aufreinigungen des Proteins ncu07684 wurde eine Expressionstemperatur von 18°C und ein Solubilisierungspuffer mit 1% Triton-X100 gewählt, welches zu einer leichten Erhöhung des löslichen Anteils des Proteins im Überstand der aufgeschlossenen Zellen führte. Hierdurch war eine zweistufige Aufreinigung des Fusionsproteins mit einer Immobilisierten Metallionen-affinitätschromatographie und anschließenden Ionenaustauschchromatographie möglich, die zu einer hohen Reinheit des Zielproteins als Hauptbestandteil des Eluats führte (Abb. 4.37).

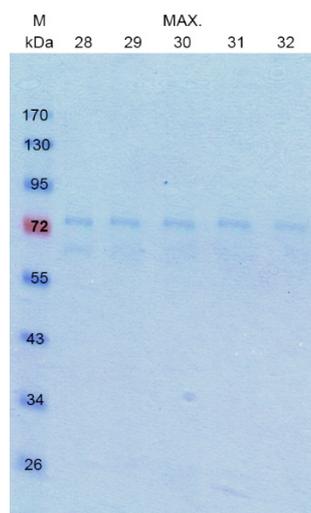


Abb. 4.37: SDS-PAGE der Ionenaustauschchromatographie von ncu07684. Es wurden die Fraktionen 28-32 des Chromatogramms aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (Albrandt 2011).

Die Identität des Proteins wurde durch Massenspektrometrie verifiziert.

4.4 Beeinflussung der mitochondrialen Genexpression durch Komplex I-spezifische Biogenesefaktoren

Aufgrund der Existenz von Pentatricopeptid-Repeat-Domänen in den Proteinen ncu20711 und ncu07684 mit der nachgewiesenen Relevanz dieser Proteinklasse für den RNA-Metabolismus in Organellen (siehe Kapitel 2.4) wurde ihre Bedeutung für die mitochondriale Transkription und Translation untersucht. Die Einflussnahmen auf die erfolgreiche Transkription von mitochondrial kodierten Komplex I-Untereinheiten der beiden Proteine ncu00183 und ncu02565 der DUF185-Familie wurde ebenfalls untersucht. Dies war bedingt durch die Homologie zu einem Transkriptionsfaktor aus *B. melitensis* und der signifikant vorhersagbaren mitochondrialen Präsequenzen.

4.4.1 Mitochondriale Transkription von Komplex I-Untereinheiten

Für die Proteine der Gene *ncu00183* (17876) und *ncu02565* (19806) der DUF185 Familie und die den Pentatricopeptid-Repeat-Proteinen zugeordneten Proteine *ncu20711* (20112) und *ncu07684* (20449) wurde der Einfluss der Gendeletion auf die mitochondriale Transkription untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Gesamt-RNA aus den jeweiligen Mutanten isoliert und mit Hilfe von Northern Blots charakterisiert. Hierbei wurden als Detektionssonden radioaktiv markierte PCR-Produkte verwendet. Es wurden alle sieben mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I mit je einer Sonde detektiert und zur Validierung der Methode noch zusätzlich je eine Sonde für die Untereinheiten *cob* des Komplex III und *ATP6* des Komplex V. Die Untereinheit *ATP6* ist Bestandteil eines polycistronischen Primärtranskripts mit den Untereinheiten *ATP8*, *ATP9* und *cox2* (Bittner-Eddy, Monroy et al. 1994; Kleidon, Plesofsky et al. 2003). Ein Überblick über die mitochondriale Transkription ist in Kapitel 2.5.2 dargestellt.

4.4.1.1 Transkript ND4 und ND1

Die Untersuchung der Transkripte der mitochondrial kodierten und benachbarten Untereinheiten *ND4* und *ND1* wiesen bis auf eine Mutante die gleichen Prozessierungsbanden auf. Bei der Deletionsmutante 20112 trat eine signifikante zusätzliche Bande auf (in der nachfolgenden Abbildung 4.38 mit 1 markiert), deren Größe in beiden Northern Blots mit ~5500bp bestimmbar war. Es ist jedoch eine weitere Prozessierung in dieser Mutante annehmbar, da weitere und die gleichen Signale wie in den anderen Mutanten ersichtlich sind. Es findet demnach kein Prozessierungsstopp statt.

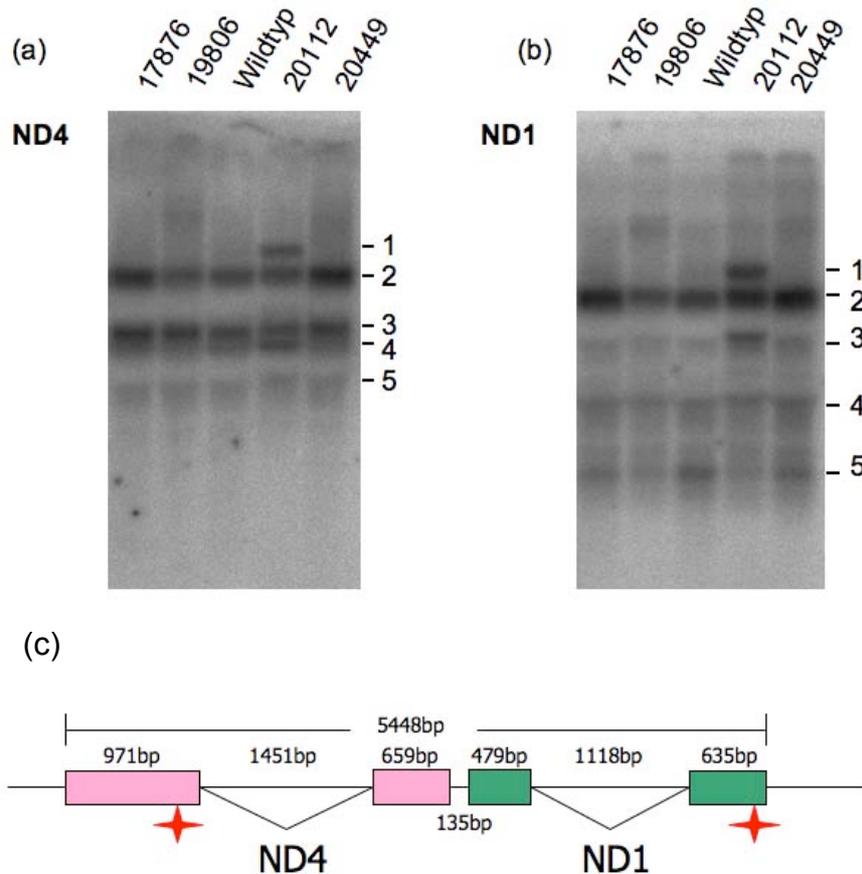


Abb. 4.38: Prozessierung der mitochondrialen Untereinheiten ND1 und ND4. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit Northern Blots untersucht. Die Spalten sind entsprechend der aufgetragenen RNA mit dem Namen der Deletionsmutanten und dem Wildtyp beschriftet. Die sichtbaren Banden wurden nummeriert. (a) Der Northern Blot für die Untereinheit ND4. Es wurde eine Sonde im 971bp Exon verwendet. (b) Northern Blot für die Untereinheit ND1. Es wurde einen Sonde im 635bp Exon verwendet. (c) Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms im Bereich der ND4-ND1 – Sequenzen. Die Exons werden als eingefärbte Rechtecke, die Introns als Dreiecke dargestellt. Die kodierende Sequenz für ND4 ist rosa und für ND1 ist grün gefärbt. Die Größe der entsprechenden Bereiche ist angegeben und die Position der verwendeten Sonden ist durch einen roten Stern markiert.

Anhand eines Vergleichs mit einem RNA-Größenstandards wurden die apparenten Größen der sichtbaren mRNA-Transkripte berechnet und nachfolgend in einer Tabelle zusammengefasst. Hieraus lässt sich entsprechend ein Prozessierungsschema postulieren, welches den Beobachtungen aber nur teilweise Rechnung trägt (Abb. 4.39).

Tab. 4.10: Bestimmung der Größe der mRNA-Transkripte für die Untereinheiten ND4 und ND1.

ND4		ND1	
Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Bande Nr.	berechnete Größe [bp]
1	5570	1	5646
2	4224	2	4487
3	2626	3	3138
4	2406	4	1836
5	1656	5	926

Bei der Deletionsmutante 20112 war eine Bande bei ~5.6 kb oberhalb der ersten detektierbaren Bande bei ~4.3 kb der überprüften Deletionsmutanten und dem Wildtyp detektierbar. Da kein abschließendes Prozessierungsschema aufgrund der Daten postulierbar ist, wird an dieser Stelle das mögliche Schema aufgezeigt und diskutiert.

Die Position des Promoters ist für die Transkriptionsinitiierung nicht bekannt, jedoch ist es auszuschließen, dass das polycistronische Primärtranskript noch weitere benachbarte Gensequenzen enthält, denn für die mRNA-Spezies mit COX1 ist bekannt, dass es nicht die Sequenzen für ND1 und ND4 enthält (Kleidon, Plesofsky et al. 2003), ebenso ist der nachfolgende Genbereich um die ATP-Synthase-Untereinheiten gut charakterisiert und zeigt kein polycistronisches Transkript mit ND4 und ND1. Demnach lässt sich ein noch nicht determiniertes Promotersignal aufwärts der ND1-Sequenz postulieren. Die Suche nach dieser Promotersequenz anhand der bisher bekannten Konsensus-Sequenzen (siehe Kapitel 2.5.2) weist kein konserviertes Signal zwischen der COX1 und ND1 Sequenz auf, lediglich ein stark degeneriertes Signal mit der Basenabfolge 5'-TTAGAAATccA-3', welches der degenerierten Sequenz 5'-TTAGARRKRKA-3' bis auf die beiden Cytosine entspricht (diese sind in der Sequenz klein geschrieben worden) (Kennell und Lambowitz 1989; Kubelik, Kennell et al. 1990). Die potentielle Promotorposition ist 1295bp vom Startcodon des ND1-Gens entfernt und würde das Primärtranskript von 5448 bp auf 6743 bp vergrößern. Aufgrund der bestimmten Größe des ersten vermutlich dicistronischen Transkripts mit einer Gesamtlänge von 5448bp bei allen Spezies (bei der Deletionsmutante 20112 die zweite sichtbare Bande) bei ~4.3 kb kann als erster Prozessierungsschritt die Entfernung eines der beiden Introns postuliert werden, vermutlich das Intron im ND4-Gen. Eine Separation der beiden mRNA-Bereiche ND4 und ND1 an dieser Stelle der Prozessierung widerlegt die Existenz der gleichgroßen, nachfolgenden Banden. Die weitergehende Prozessierung kann nachfolgend mit der

Teilung des dicistronischen Prätranskripts erfolgen, so dass im Falle der dann schon fast vollständig prozessierten ND4-mRNA ein Transkript von 1630 bp entstehen würde. Das mRNA-Transkript mit der Sequenz für ND1 dagegen würde noch das Intron beinhalten mit einer Gesamtgröße von 2238 bp, woran sich final die Prozessierung des Introns anschließen würde mit einer Bildung der reifen mRNA-Spezies mit 1114 bp. Das postulierte Prozessierungsschema lässt also im Fall der ND4-Sonde die Größen 5448 bp, 3997 bp und 1630 bp vermuten, zusätzlich zu dem möglichen Sequenzbereich bis zum Promotor. Dies kann nicht in Übereinstimmung mit den sichtbaren Größen gebracht werden, die in Tab. 4.10 aufgeführt sind. Im Fall der ND1-Sonde kann man ebenfalls die Banden 5448 bp und 3997 bp postulieren, danach anschließend die Banden 2238 bp und 1114 bp. Die Übereinstimmung mit den detektierten Größen ist hierbei höher, jedoch nicht abschließend beurteilbar.

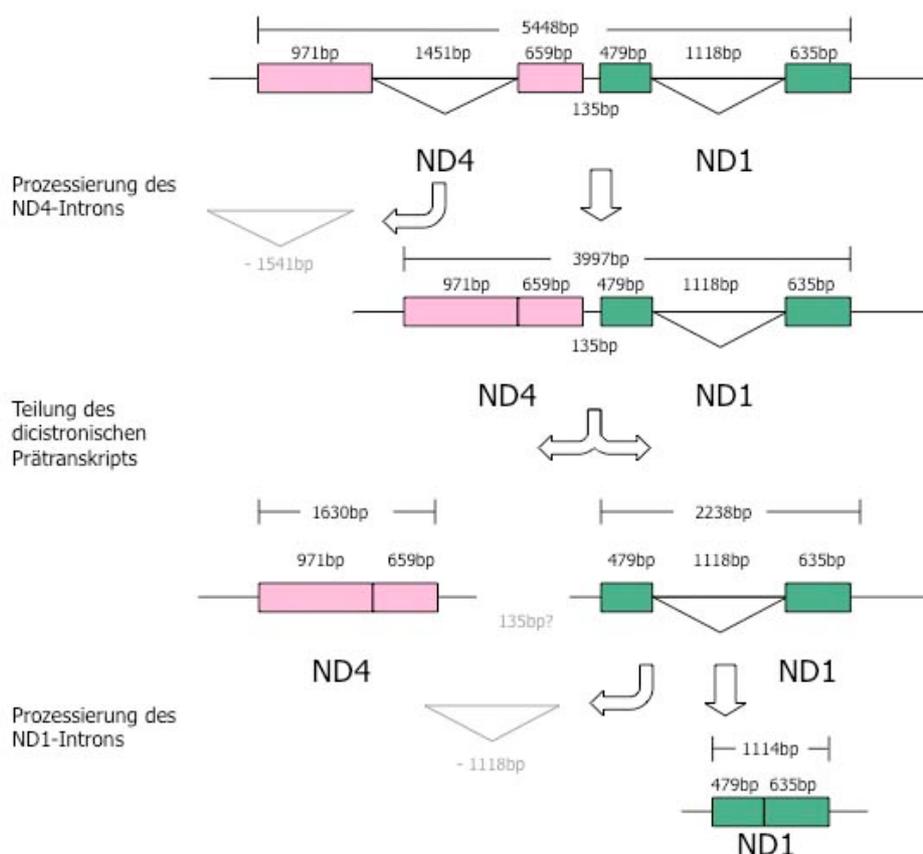


Abb. 4.39: Vermutetes Prozessierungsschema des dicistronischen mitochondrialen mRNA-Transkripts von ND4 und ND1. Die Exons der mRNA des Gens ND4 sind als rosafarbene Rechtecke, die des Gens ND1 als grüne Rechtecke dargestellt. Die beiden Introns sind als Dreiecke dargestellt. Die Größen der Sequenzbereiche sind angegeben.

4.4.1.2 Transkript ND2 und ND3

Ein weiterer auffälliger Bereich im untersuchten RNA-Metabolismus stellt die Transkription der Gene ND2 und ND3 dar. Hier zeigten sich die Deletionsmutanten 17876, 19806 und 20112 unauffällig, jedoch die Mutante 20449 ließ reproduzierbar signifikante Signale für die mRNA-Transkripte vermissen. Die Sonden waren im singulären Exon des ND2-Gens und im 353 bp großen Exon des ND3-Gens lokalisiert. Im Falle des Northern Blots für die Untereinheit ND2 konnten schwache Signale erkannt werden, wobei jedoch nicht unterschieden werden konnte, ob es sich hierbei um Detektionsartefakte aufgrund einer geringeren Spezifität der Sonde oder um geringe Mengen der detektierten Transkripte handelt.

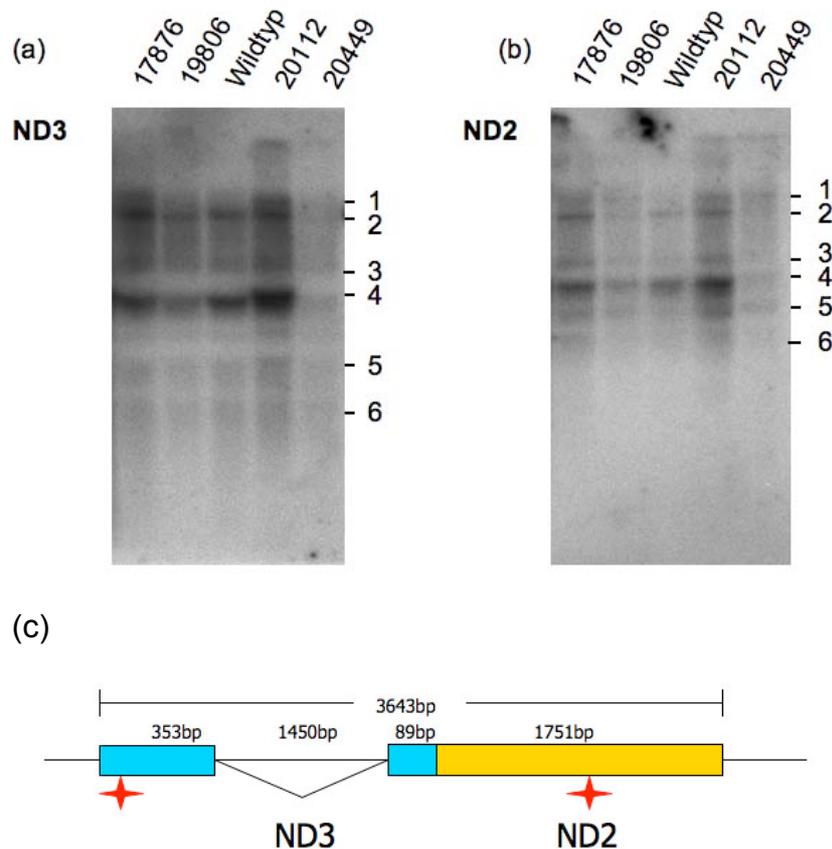


Abb. 4.40: Prozessierung der mitochondrialen Untereinheiten ND2 und ND3. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Transkription mit Northern Blots untersucht. Die Spalten sind entsprechend der aufgetragenen RNA mit dem Namen der Deletionsmutanten und dem Wildtyp beschriftet. Die sichtbaren Banden wurden nummeriert. (a) Der Northern Blot für die Untereinheit ND3. Es wurde eine Sonde im 353bp Exon verwendet. (b) Northern Blot für die Untereinheit ND2. Es wurde eine Sonde in der Mitte des Exons verwendet. (c) Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms im Bereich der ND3-ND2 – Sequenzen. Die Exons werden als eingefärbte Rechtecke, die Introns als Dreiecke dargestellt. Die kodierende Sequenz für ND3 ist blau und für ND2 ist gelb gefärbt. Das Startcodon der ND3-Untereinheit liegt direkt benachbart zum Stoppcodon der ND2-Untereinheit. Die Größe der entsprechenden Bereiche ist angegeben und die Position der verwendeten Sonden ist durch einen roten Stern markiert.

Tab. 4.11: Bestimmung der Größe der mRNA-Transkripte für die Untereinheiten ND3 und ND2. Vermutete Banden werden in Klammern gesetzt.

ND3		ND2	
Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Bande Nr.	berechnete Größe [bp]
(1)	(7846)	1	10239
2	6759	2	8121
3	4332	3	4626
4	3129	4	3322
5	1706	5	2308
(6)	(1158)	6	1713

4.4.1.3 Transkript ND5 und ND4L

Die Region um die Gene ND5 und ND4L zeigte sich in allen Mutanten nicht betroffen, welches in nachfolgender Abbildung 4.41 dargestellt wird. Der Northern Blot für die Untereinheit ND4L weist trotz einer geringen Auflösung und Signifikanz der Signale die erwarteten Banden auf, so dass von einer erfolgreichen Transkription ausgegangen werden kann. Ein Vergleich mit publizierten Daten (Nelson und Macino 1987; Nelson und Macino 1987) zeigt eine signifikante Übereinstimmung der berechneten Banden, jedoch ohne die 7000 bp Bande in der Literatur auf den Northern Blots zu sehen. Im Falle der Untereinheit ND4L waren die publizierten Banden mit ~5.6 und ~5.0 kb nicht sichtbar. Abweichungen zu den Literaturwerten lassen sich aufgrund der unterschiedlichen Größenbestimmung vermuten. In den vorliegenden Daten wurde die Größe anhand eines RNA-Größenstandards mit acht Banden zwischen 6000 bp und 200 bp determiniert, in den publizierten Daten lediglich aufgrund der beiden Banden der rRNA. Resultierend aus den bekannten dicistronischen Transkription der ND5 und ND4L Untereinheiten lässt sich annehmen, dass beide Gene erfolgreich in den untersuchten Deletionsmutanten transkribiert und prozessiert werden.

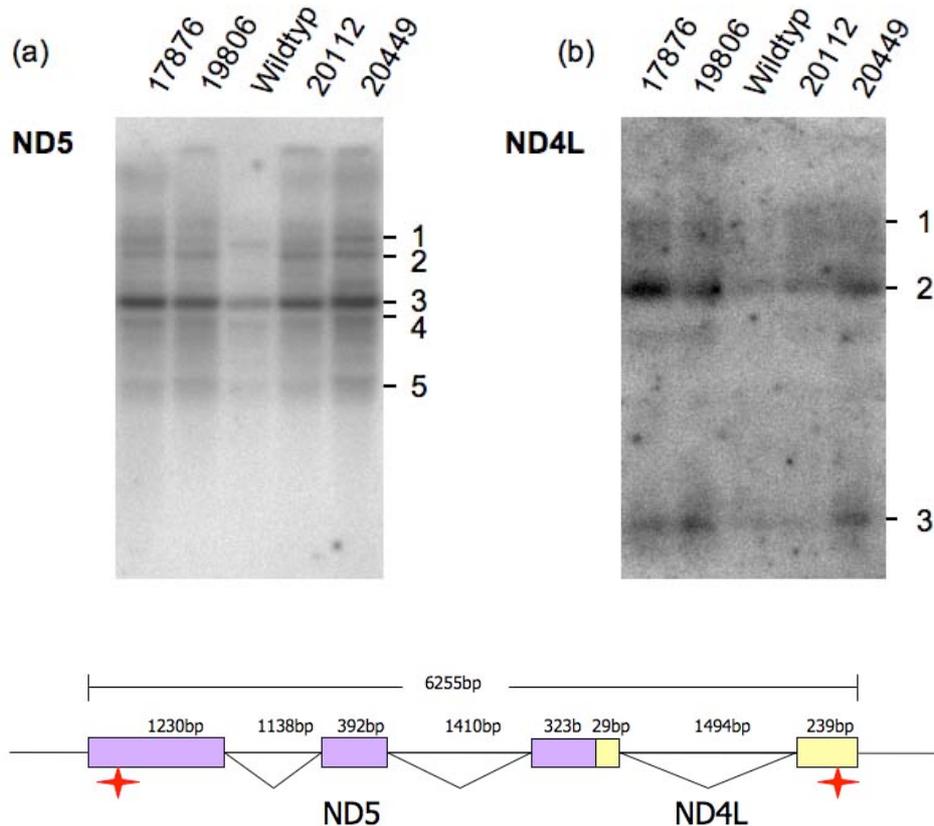


Abb. 4.41: Prozessierung der mitochondrialen Untereinheiten ND5 und ND4L. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Transkription mit Northern Blots untersucht. Die Spalten sind entsprechend der aufgetragenen RNA mit dem Namen der Deletionsmutanten und dem Wildtyp beschriftet. Die sichtbaren Banden wurden nummeriert. (a) Der Northern Blot für die Untereinheit ND5. Es wurde eine Sonde im 1230bp Exon verwendet. (b) Northern Blot für die Untereinheit ND2. Es wurde einen Sonde im 239bp Exon verwendet. (c) Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms im Bereich der ND5-ND4L-Sequenzen. Die Exons werden als eingefärbte Rechtecke, die Introns als Dreiecke dargestellt. Die kodierende Sequenz für ND5 ist lila und für ND2 ist gelb gefärbt. Das Stoppcodon der ND4L-Untereinheit überlappt mit dem Startcodon der ND5-Untereinheit. Die Größe der entsprechenden Bereiche ist angegeben und die Position der verwendeten Sonden ist durch einen roten Stern markiert.

Tab. 4.12: Bestimmung der Größe der mRNA-Transkripte für die Untereinheiten ND5 und ND4L. Bisher bestimmte Banden wurden mit ihrer Literaturquelle angegeben.

ND5			ND4L		
Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Literaturdaten (Nelson und Macino 1987)	Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Literaturdaten (Nelson und Macino 1987)
1	6471	5600	1	6371	7000
2	5654	5000	2	3875	3200
3	3297	3200	3	584	-
4	2657	1500			
5	1327	1100			

4.4.1.4 Transkript COX3 und ND6

Das polycistronische mitochondriale Transkript 19SrRNA-COX3-ND6 (Breitenberger, Browning et al. 1985) wurde mit einer Sonde gegen die mRNA der Untereinheit ND6 detektiert, bei der keine publizierten Daten vorhanden sind. Es zeigte sich eine signifikante Bande bei allen Mutanten und dem Wildtyp in der Höhe des Erwartungswertes für die vollständig prozessierte ND6 mRNA, so dass von keinen Beeinträchtigungen in diesem Bereich ausgegangen wird. Die reife mRNA umfasst 731bp, berechnet wurden 808bp. Eine große zusätzliche Bande im Bereich um 7000bp eines nicht näher bestimmten polycistronischen Transkripts war nur in den Mutanten 19806, 20112 und 20449 sichtbar, jedoch nicht in 17876 und dem Wildtyp. In der Abb. 4.42 sind die Ergebnisse dargestellt.

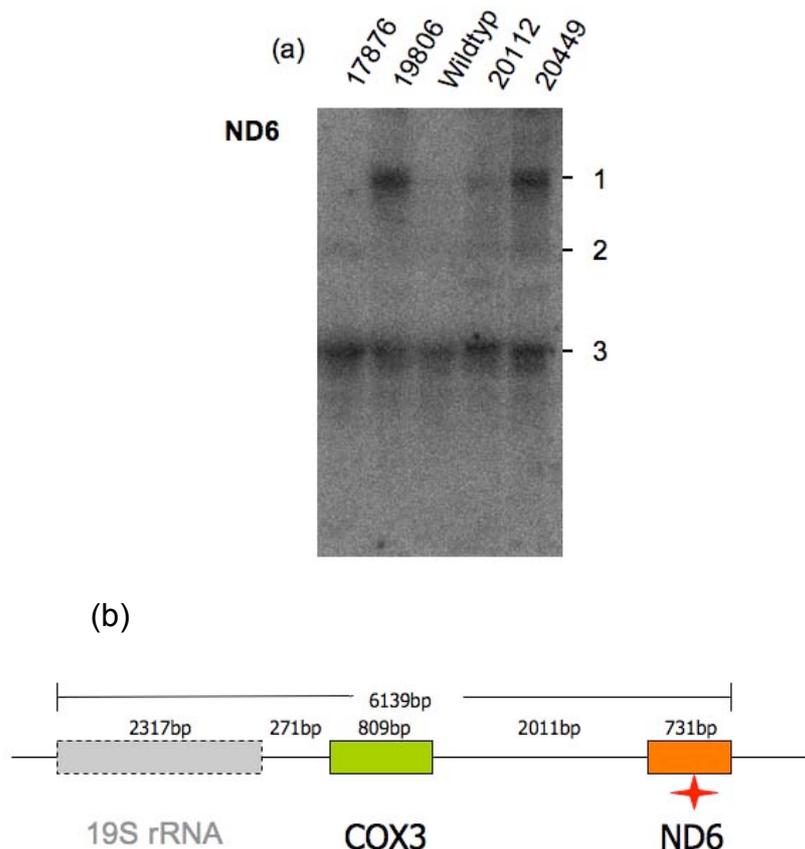


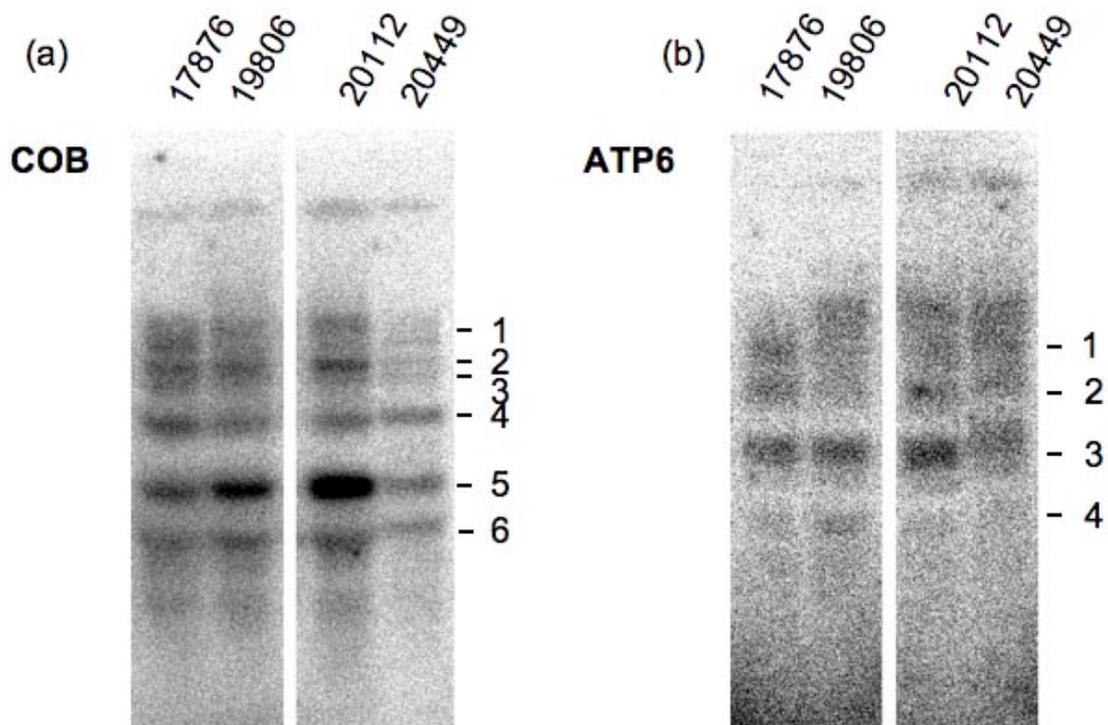
Abb. 4.42: Prozessierung der mitochondrialen Untereinheiten ND6 und COX3. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Transkription mit Northern Blots untersucht. Die Spalten sind entsprechend der aufgetragenen RNA mit dem Namen der Deletionsmutanten und dem Wildtyp beschriftet. Die sichtbaren Banden wurden nummeriert. (a) Der Northern Blot für die Untereinheit ND6. Es wurde eine Sonde in der Mitte des Exons verwendet. (b) Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms im Bereich der COX3-ND6-Sequenzen mit der angrenzenden Region der 19S rRNA. Die Exons werden als farbige Rechtecke dargestellt, die Sequenz für die rRNA grau. Die kodierende Sequenz für ND6 ist orange und für COX3 ist grün gefärbt. Die Größe der entsprechenden Bereiche ist angegeben und die Position der verwendeten Sonden ist durch einen roten Stern markiert.

Tab. 4.13: Bestimmung der Größe der mRNA-Transkripte für die Untereinheiten ND6.
Vermutete Banden werden in Klammern gesetzt.

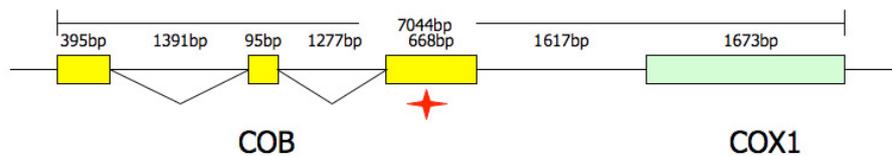
ND6	
Bande Nr.	berechnete Größe [bp]
1	7100
(2)	(1218)
3	808

4.4.1.5 Transkript COB und ATP6

Zur Überprüfung der anderen mitochondrial kodierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe wurde die Prozessierung der ATP6 und der COB überprüft. Hierbei lag ein besonderes Augenmerk auf dem Vergleich mit bereits existierenden Daten. Es wurden die Nitrocellulosemembranen der vorhergegangenen Northern Blots gestrippt, also von hybridisierten Sonden befreit und erneut hybridisiert. Die Qualität der Signale reduziert sich bei der zweiten Hybridisierung sichtbar bei dieser Vorgehensweise. Gerade die Qualität der Signale des Wildtyps waren deutlich verringert, so dass dieser in der nachfolgenden Abbildung nicht dargestellt wurde. Die sichtbaren Banden der Deletionsmutanten wurden mit den bekannten Literaturwerten verglichen (Bittner-Eddy, Monroy et al. 1994). Es zeigten sich keine auffälligen Unregelmäßigkeiten in den Transkriptionsmustern.



c)



d)

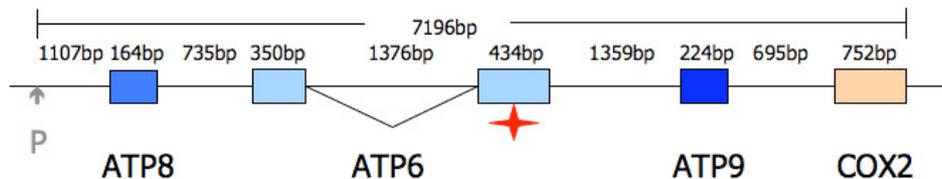


Abb. 4.43: Prozessierung der mitochondrialen Untereinheiten COB und ATP6. Es wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Transkription mit Northern Blots untersucht. Die Spalten sind entsprechend der aufgetragenen RNA mit dem Namen der Deletionsmutanten beschriftet. Die sichtbaren Banden wurden nummeriert. (a) Der Northern Blot für die Untereinheit COB. Es wurde eine Sonde im 668bp Exon verwendet. (b) Der Northern Blot für die Untereinheit ATP6. Es wurde eine Sonde im 434bp Exon verwendet. (c) und (d) Schematische Darstellung des mitochondrialen Genoms in den angegebenen Sequenzbereichen. Die Exons werden als farbige Rechtecke dargestellt und die Position der verwendeten Sonden sind durch rote Sterne markiert. Die Größe der entsprechenden Bereiche ist angegeben. (c) COB-COX1-Sequenz. Die Exons der COB-Untereinheit sind gelb, das Exon der COX1-Untereinheit grün markiert. (d) ATP8-ATP6-ATP9-COX2-Sequenzen. Die kodierenden Sequenzen für ATP-Synthase-Untereinheiten sind in verschiedenen Blautönen dargestellt und die COX2-Untereinheit ist orange gefärbt.

Tab. 4.14: Bestimmung der Größe der mRNA-Transkripte für die Untereinheiten COB und ATP6. Bisher bestimmte Banden wurden mit ihrer Literaturquelle angegeben.

COB			ATP6		
Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Literaturdaten (Bittner-Eddy, Monroy et al. 1994)	Bande Nr.	berechnete Größe [bp]	Literaturdaten (Bittner-Eddy, Monroy et al. 1994)
1	8200	8000	1	7749	-
2	7423	6800	2	4000	-
3	6269	-	3	2484	2200
4	4226	4600	4	1361	1300
5	2406	2200			
6	1574	1600			

4.4.2 Detektion mitochondrial kodierter Untereinheiten der Atmungskette

Durch die selektive Markierung der mitochondrial kodierten Proteine durch Einbau von [³⁵S]-Methionin und [³⁵S]-Cystein kann die erfolgreiche Transkription und Translation in Mitochondrien überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde die cytosolische Proteinsynthese durch den Einsatz von Cycloheximid in Anwesenheit der radioaktiv markierten Aminosäuren gehemmt und nach Isolierung der Mitochondrien wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden autoradiographisch detektiert.

Die in ihren Transkriptionsmustern auffälligen Mutanten 20112 und 20449 und der Wildtyp als Referenz wurden für diese Untersuchungen ausgewählt und in der Abbildung 4.43 das Autoradiogramm dargestellt. Die Position der Untereinheiten ließ sich im Vergleich mit veröffentlichten Daten verifizieren (Ise, Haiker et al. 1985). Die Ergebnisse der Immunopräzipitation insbesondere des Komplex I in Kapitel 4.4.2.1 konnte dazu verwendet werden, die Signale in der Abbildung 4.44 den entsprechenden Untereinheiten zuzuordnen. Anzumerken hierbei ist die Tatsache, dass eine eindeutige Zuordnung der Signale dadurch erschwert wurde, dass das kalkulierte Molekulargewicht nicht der apparenten Masse der Untereinheiten in der SDS-PAGE entsprechen muss. Gerade hydrophobe Proteine wie die membranständigen, mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I zeigen bei ihrem Laufverhalten während der Gelelektrophorese Abweichungen von kalkulierte und apparentem Molekulargewicht. Dadurch konnten in der Abbildung 4.44 die Untereinheiten cytb, ND1 und COX1 und ebenso COX3, atp6 und ND6 nicht eindeutig den sichtbaren Signalen zugeordnet werden. Dadurch wurde eine gemeinsame Markierung der Signale in den entsprechenden Bereichen bevorzugt und die vermutete Position durch die Reihenfolge der Beschriftung widergegeben.

Der Wildtyp ließ deutliche, jedoch diffuse acht Banden erkennen. Bei beiden Mutanten zeigten sich im Vergleich mit dem Wildtyp Unterschiede. Die Mutante 20112 offenbarte im Bereich der großen Untereinheiten einen Mangel an der ND5 und ND4 Untereinheit des Komplex I. Durch die Lage der Untereinheit ND2 auf der Höhe der Komplex III-Untereinheit COX1 konnte die Präsenz der Komplex I-Untereinheit nicht geklärt werden. Die ND1-Untereinheit wurde durch die Position der cyt b- und COX2-Untereinheiten verdeckt, so dass keine eindeutige Aussage über An- oder Abwesenheit der Komplex I-Untereinheit getroffen werden konnte. Die

drei Untereinheiten des Komplex III ließen sich für den Wildtyp und die Deletionsmutanten deutlich erkennen und die Proteinlevels, die mit der Signalstärke im Autoradiogramm korrelierten, lagen nur geringfügig unterhalb der Signalstärke, die für den Wildtyp sichtbar war. Die gleiche Beobachtung ist auch bei der Komplex IV-Untereinheit cyt b erkennbar.

In der Mutante 20449 konnte die Untereinheit ND4 nicht nachgewiesen werden, alle anderen mitochondrial kodierten Proteine, die sich in der SDS-PAGE überprüfen ließen, waren unauffällig. Die Intensität der ND5 Untereinheit erscheint im Vergleich weniger deutlich, was auf ein reduziertes Proteinlevel deuten kann. Die Proteine mit einer molekularen Masse kleiner 20 kDa ließen sich mit dieser Methode nicht nachweisen, obwohl die Untereinheit ND3 eine apparente molekulare Masse von 18 kDa aufweist und demnach im Bereich der dargestellten SDS-PAGE eingeschlossen sein sollte.

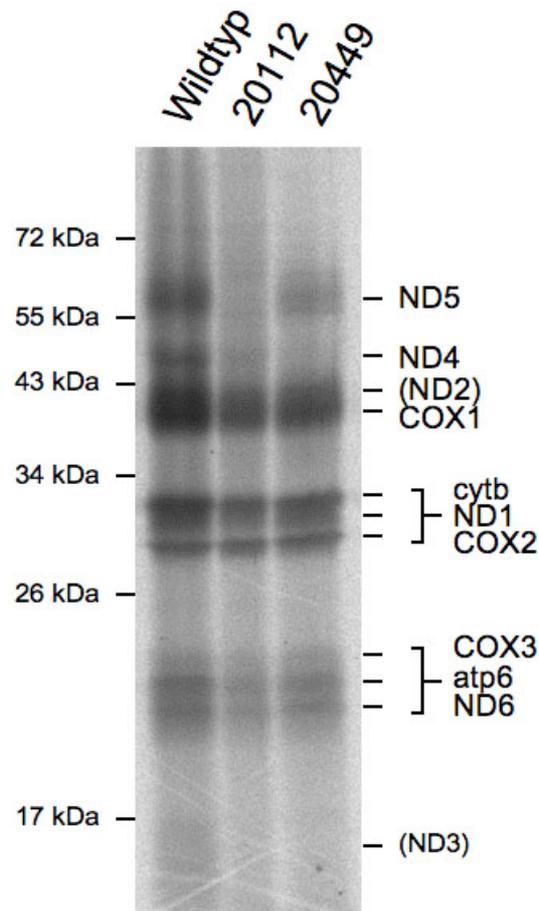


Abb. 4.44: Autoradiogramm der SDS-PAGE von [³⁵S]-markierten mitochondrial kodierten Untereinheiten. Es wurden 1,8 mCi in 100 ml Kultur hinzugegeben und 150 µg isolierte Mitochondrienproteine pro Spur aufgetragen. Die Spuren wurden entsprechend der verwendeten Mitochondrien aus dem Wildtyp oder den Mutanten 20112 und 20449 beschriftet. Die auf der SDS-PAGE sichtbaren Banden des verwendeten Größenstandards wurden in der entsprechenden Höhe auf der linken Seite markiert. Auf der rechten Seite wurden die zuordbaren mitochondrialen Untereinheiten bezeichnet. Die Positionen der Untereinheiten ND2 und ND3 wurden aufgrund der undeutlichen Signale in Klammern gesetzt. Die Bereiche der Untereinheiten cytb, ND1 und COX2 und ebenso COX3, atp6 und ND6 wurden mit einer Klammer gemeinsam markiert und die vermutete Zuordnung der Untereinheiten durch die Position in der Beschriftung wiedergegeben.

4.4.2.1 Immunopräzipitation der Atmungskettenkomplexe I und III

Um besser zwischen den radioaktiv markierten Komplex I-Untereinheiten und den Untereinheiten der anderen Atmungskettenkomplexen zu differenzieren, wurde eine Immunopräzipitation der [³⁵S]-markierten Mitochondrienproteine durchgeführt. Die Anreicherung erfolgt nach einer Lyse der Mitochondrien durch die Bindung der Enzyme an spezifische Antikörper, welche ihrerseits an Protein G-Sepharose

gebunden waren. Nach erfolgter Isolierung der Protein G-Sepharose vom Überstand wurden die gebundenen Proteine eluiert und für eine SDS-PAGE mit anschließender Autoradiographie verwendet.

Die verwendeten Antikörper gegen den Komplex I waren gegen den gesamten Enzymkomplex gerichtet (Antikörper 6721 und 1115), bei der Immunopräzipitation des Komplex III wurde eine Mischung von zwei Antikörpern verwendet, die gegen die Epitope exponiert lokalisierter Untereinheiten gerichtet waren (Antikörper 18 und 19). Beim Komplex I zeigte sich im Falle des Wildtyps ein Bandenmuster mit sechs bis sieben eindeutigen Signalen. Besonders die Untereinheit ND5 oberhalb der 55 kDa war deutlich sichtbar. Die nachfolgenden Signale lassen sich nur bedingt eindeutig den anderen Komplex I Untereinheiten zuordnen. Bemerkenswert hierbei ist, dass entweder cytb oder COX2 oder sogar beide Untereinheiten ebenfalls im Eluat der Präzipitation des Komplex I auftreten. Beide Mutanten zeigen keinen präzipitierbaren Komplex I, besonders die eindeutige ND5 Untereinheit fehlt. Es zeigen sich geringe Signale ebenfalls im Bereich der Untereinheiten cytb und COX2, welches als mögliche Kontamination deutbar sein könnte. Bei der Mutante 20449 lässt sich noch ein Bereich bei 43 kDa ausmachen, der ein diffuses Signal offenbart. Dieses liegt etwa auf der Höhe der bekannten apparenten molekularen Masse der Untereinheit ND2.

Ausgehend vom Überstand der Immunopräzipitation des Komplex I wurde mit Antikörpern, die gegen den Komplex III gerichtet waren, dieser aus der Lösung ausgefällt. Hierbei ist anzumerken, dass die vollständige Abwesenheit von Antikörpern gegen den Komplex I aus dem vorhergehenden Schritt nicht sichergestellt war. Demnach ist eine Vermischung der Signale annehmbar. Bei der Auswertung des Autoradiogramms war ein ähnliches Bandenmuster für den Wildtyp und die beiden Deletionsmutanten sichtbar. Die Abwesenheit eines Signals für die ND5 Untereinheit zeigte nur eine bedingte Vermischung der Signale. Weiterhin treten in allen drei Spuren die Banden für die erwartete cyt b Untereinheit als mitochondrial kodierte Untereinheit des Komplex III auf, jedoch zusätzlich noch weitere ausgefallte Banden. Die drei letzten Spuren in der Abbildung 4.45 wurden aus den Überständen nach den zwei Immunopräzipitationen gewonnen. Hierbei zeigte sich ein ähnliches Bandenmuster wie bei der Immunopräzipitation des Komplex III und in der nicht dargestellten Coomassie-Färbung des Gels ein hoher Gehalt an der leichten und schweren IgG-Kette der Antikörper. Demzufolge haben nicht alle Antikörper an die

Protein G-Sepharose gebunden und eine Vermischung der Signale ist gerade bei der Komplex III-Immunopräzipitation denkbar.

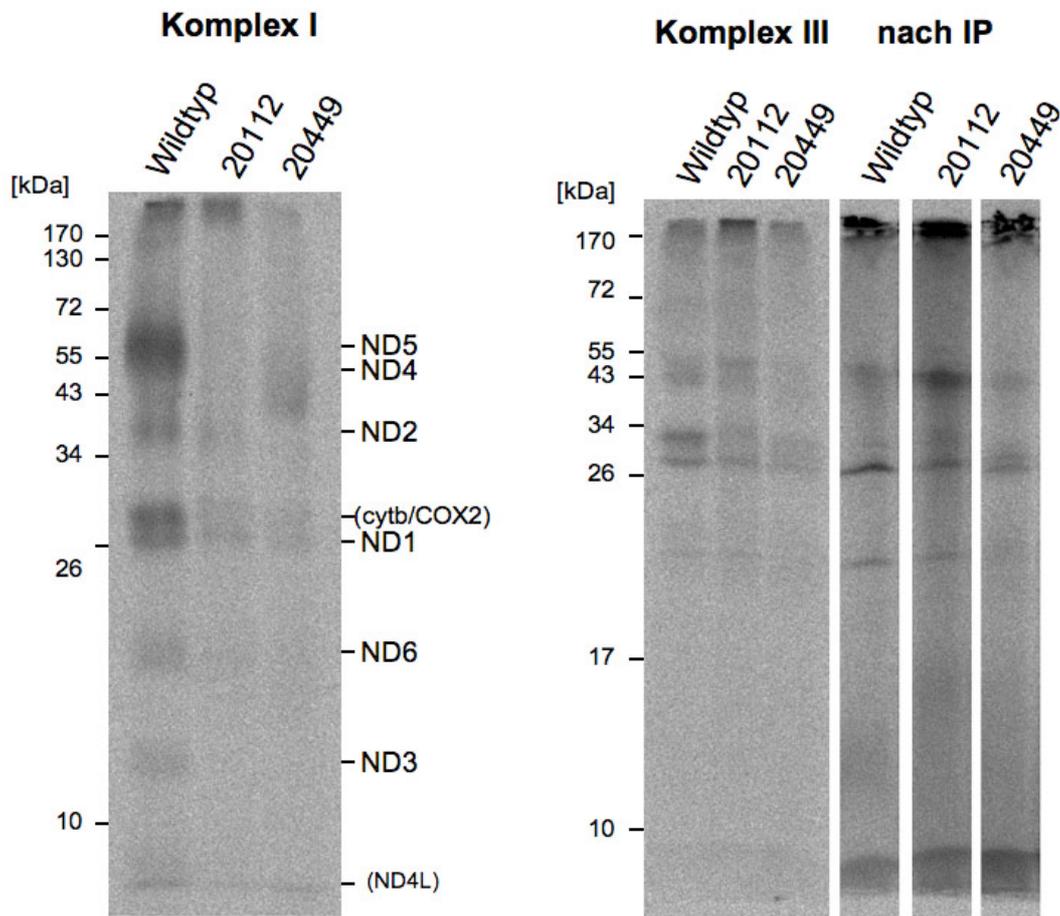


Abb. 4.45: Autoradiogramme der immunopräzipitierten Komplexe I und III. Die Spalten wurden oben entsprechend der verwendeten Mitochondriensuspension mit Wildtyp oder den Bezeichnungen der beiden Mutanten 20112 und 20449 beschriftet. Es wurden die kompletten Eluate der Immunopräzipitation von 1 mg Mitochondrienprotein aufgetragen. Auf der linken Seite ist das Autoradiogramm des immunopräzipitierten Komplex I sichtbar. Die Zuordnung der Untereinheiten konnte bis auf die mutmaßlich zusätzlich präzipitierten Untereinheiten cyt b und/oder COX2 und die undeutlich sichtbare ND4L-Untereinheit eindeutig zugeordnet werden. Die mittlere Darstellung zeigt den immunopräzipitierten Komplex III und die rechten drei Spalten zeigen die nicht durch Antikörper präzipitierbaren radioaktiv markierten Proteine, nach der zweistufigen Immunopräzipitation. Die Banden des Größenstandards wurden entsprechend ihrer Lage im Gel auf der linken Seite markiert, hierbei ist anzumerken, dass die Immunopräzipitation zusammen mit den Überständen nach der IP aufgetragen worden sind, so dass eine gemeinsame Bandenbeschriftung ermöglicht wurde.

5 Diskussion

5.1 Identifizierung von Komplex I-Biogeneseproteinen

Im postgenomischen Zeitalter bietet die Auswertung der vollständig bekannten Genomsequenzen verschiedenster Organismen vielfältige neuartige Möglichkeiten, etabliertes Wissen beispielsweise bekannter Gene oder Proteine auf orthologe Proteine in anderen Organismen zu übertragen. Im einfachsten Fall lässt sich durch Identifizierung eines bekannten Homologen in einem anderen Organismus die Funktion eines Genproduktes vorhersagen. Andererseits kann auch die Ermittlung homologer Gene, die nicht funktionell charakterisiert sind, wichtige Hinweise auf evolutionär konservierte Funktionen liefern.

Dieser Ansatz wurde zur Reduktion der 10.000 Gene in *N. crassa* genutzt, um eine sinnvolle Auswahl für potentielle Biogenesefaktoren zu gewinnen und nicht alle Proteine auf ihren Einfluss für den Komplex I zu untersuchen. Wie in Kapitel 4.1 beschrieben wurde als Prinzip zur Eingrenzung potentiell interessanter Gene ein differentieller Genomvergleich gewählt, der sich die Konservierung relevanter Proteine des Komplex I entweder als Untereinheit oder Biogenesefaktor zunutze gemacht hat. Basierend auf der Annahme, dass ein evolutionär entwickeltes Defizit des Komplexes I in einigen Hefen zu einem Verlust der hierfür ursprünglich notwendigen Gene führt, wurden orthologe Proteine, die ausschließlich in Organismen mit Komplex I vorliegen als mögliche Biogenesefaktoren berücksichtigt. Proteine, die in Hefen vorkommen, die sich durch die Absenz des Komplex I auszeichnen, wurden ausgeschlossen. Hierdurch war es möglich, die Gesamtzahl der Gene auf 491 potentielle Biogenesefaktoren zu reduzieren. Weitergehend wird dieser Ansatz im Kapitel 5.1.1 erläutert.

Als Alternative beziehungsweise als Ergänzung zum differentiellen Genomvergleich kann die Suche nach spezifischen Biogenesefaktoren über die Sequenzähnlichkeit zu anderen bisher bekannten Proteinfamilien dienen. In diesem Ansatz werden bisher bekannte Funktionen auf orthologe Proteine in *N. crassa* übertragen. Hierbei zeichnet sich besonders die Gruppe der Pentatricopeptid-Repeat-Domain Proteine aus, die eine Rolle in der Biogenese mitochondrial bzw. in Pflanzen zusätzlich plastidär kodierter Proteine ausüben. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang der Aspekt, dass sowohl allgemeine Aussagen wie auch spezifische

Aufgaben in der Transkription, Prozessierung oder Translation bekannt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die acht in *N. crassa* identifizierbaren PPR-Proteine bezüglich ihrer spezifischen Rolle für die Transkription und Translation der mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I untersucht und die Ergebnisse werden in Kapitel 5.1.2 dargestellt.

5.1.1 Differentieller Genomvergleich zur Eingrenzung potentieller Biogeneseproteine

Als sehr hilfreiche Unterstützung erweisen sich beim Ansatz des differentiellen Genomvergleichs die Informationen des *Génolevures*-Projektes. Dieses Genomprojekt stellt die Annotationen und Klassifizierungen der Gene respektive ihrer Proteine von inzwischen neun verschiedenen Hefen zur Verfügung, deren Genome vollständig sequenziert sind (Sherman, Martin et al. 2009). Die Einteilung in phylogenetisch relevante Proteinfamilien der homologen Proteine basiert auf einem Algorithmus für *Consensus Clustering*, der zu qualitativ hochwertigen Ergebnissen der Familienzuordnung führt, welche die biologischen Funktionen widerspiegeln (Nikolski und Sherman 2007). Basierend auf diesen Proteinfamilien wurden mit dem seit 2003 vollständig sequenzierten Genom von *Neurospora crassa* homologe Proteine identifiziert, die mit den orthologen Proteinen ausschließlich in Familien Homologien aufweisen, die in den beiden Komplex I-tragenden Hefen *D. hansenii* und *Y. lipolytica* vorkommen. Auf diesem Genomvergleich basierend gelang es, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, 491 Proteine von *N. crassa* mit einer möglichen Relevanz für den Komplex I auszuwählen.

Die Qualität der Auswahl lässt sich an der sehr hohen Übereinstimmung in der reziproken Identifizierung von Komplex I Untereinheiten erkennen. Von 32 bekannten Untereinheiten wurden 28 Proteinfamilien zugeordnet, die ausschließlich in den beiden Komplex I-beinhaltenen Hefen vorlagen. Darunter war auch die Untereinheit ncu04781, die aufgrund einer fehlenden Annotation als Komplex I-Untereinheit im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde und einen spezifischen Komplex I-Einfluss aufgewiesen hat. Zusätzlich sind die beiden Komplex I-Hilfsproteine CIA 30 und CIA 84 ebenfalls solchen Proteinfamilien zuzuordnen. Demnach entsprechen von diesen 34 Komplex I-relevanten Proteinen nur 4 nicht dem Eingrenzungskriterium. Hiervon zeigten zwei Untereinheiten Sequenzähnlichkeiten auch zu Proteinen von

Organismen ohne Komplex I. Die Untereinheit ncu05008 konnte aufgrund ihrer Acyl-Carrier-Funktion einer Proteinfamilie zugeordnet werden, die Mitglieder in allen betrachteten Organismen mit Funktionen in der Fettsäuresynthese aufwies. Bei dem Protein ncu08300 wurde aufgrund einer geringen Sequenzkonservierung lediglich eine Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie mit vielen Mitgliedern identifiziert, welche unterschiedliche bekannte Aufgaben im Membrantransport ausführen. Die geringe Sequenzähnlichkeit stellt diese Klassifizierung grundsätzlich in Frage.

Keiner Proteinfamilie angehörig waren zwei Untereinheiten. Die Untereinheit ncu00670 zeigte eine Sequenzähnlichkeit zum Protein YALIOE23749 aus *Y. lipolytica*, welches seinerseits keiner Proteinfamilie zugeordnet werden konnte, jedoch als Komplex I Untereinheit annotiert ist. Der gleiche Sachverhalt zeigte sich bei der Untereinheit ncu11258 mit einer geringen Homologie zum Protein YALIOD07216 ohne eindeutige Proteinfamilienzugehörigkeit.

Diese vier Proteine weisen die Grenzen eines differentiellen Genomvergleiches auf, welcher durch die geringe Konservierung mancher Sequenzen bedingt ist. Obwohl ein Protein eine spezifische Funktion für den Komplex I ausübt, kann sich die evolutionär entwickelte Divergenz der Sequenzen auf die Identifizierung auswirken, was zu einem fälschlichen Ausschluss dieser Proteine im Genomvergleich führt („*false negative*“).

Dass durch den Ansatz des differentiellen Genomvergleichs nicht alle essentiellen und spezifischen Biogenesefaktoren einzugrenzen sind, wird auch an den beiden in dieser Arbeit identifizierten PPR-Proteine der Gene ncu20711 und ncu07684 deutlich. Diese Proteine weisen eine geringe Homologie zu anderen Proteinen auf und nur im Falle des Proteins ncu07684 eine Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie ausschließlich mit Mitgliedern der Hefen *D. hansenii* und *Y. lipolytica* (Homologie zum Protein YALIOE07095g mit einem E-value von 0,81; Proteinfamilie GL3C4343). Die Identifizierung von PPR-Domänen lässt des Weiteren keinen spezifischen Einfluss auf die Komplex I-Biogenese vermuten. Dennoch legen die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit einen gezielten Einfluss auf die Transkription oder Translation der mitochondrial kodierten Untereinheiten des Komplex I nah.

Eine weitere Eingrenzung der Möglichkeiten des differentiellen Genomvergleichs zeigt sich ebenfalls an dem PPR-Protein ncu07684. Im ersten differentiellen Genomvergleich stellte es sich durch seine Sequenzähnlichkeit zum Protein YALIOE07095g als unauffällig dar, da der dazugehörigen Proteinfamilie GLR.1566

neben jeweils einem Vertreter aus *D. hansenii* und *Y. lipolytica* auch ein Protein aus *K. lactis* zugeordnet wurde und demnach die Kriterien nicht erfüllt waren. In der aktuellen *Génolevures*-Version wurden wie oben beschrieben die Kriterien für eine erfolgreiche Identifizierung durch den differentiellen Genomvergleich erfüllt. Hieran zeigt sich, dass diese Methode in erster Linie von der Qualität der Bildung der Proteinfamilien abhängig ist und bei einer Weiterentwicklung von bioinformatischen Determinationsmöglichkeiten veränderlich ist.

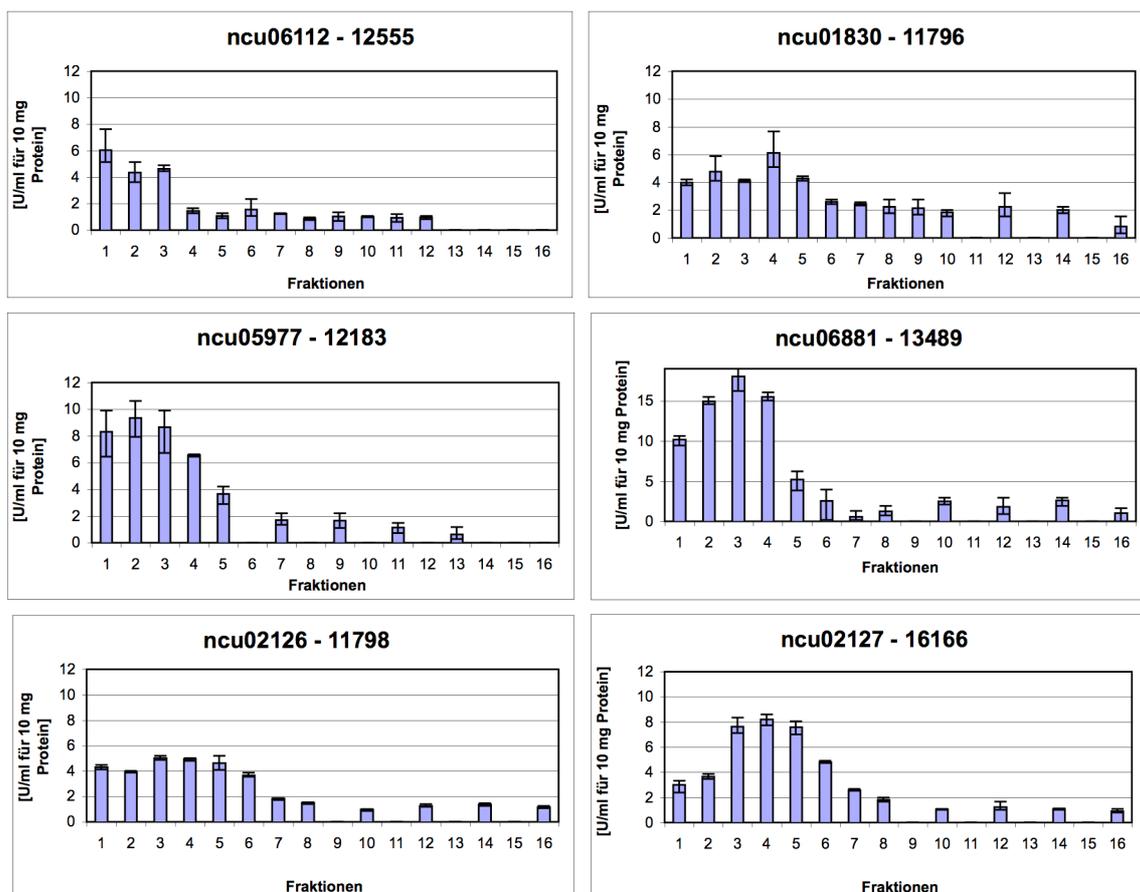
Dem nebenan zu stellen sind als weitere Grenze einer Identifizierung potentieller Biogenesefaktoren durch den differentiellen Genomvergleich Proteine, die aufgrund einer geringen Verwandtschaft zu einem Protein aus der Hefe *D. hansenii* und/oder *Y. lipolytica* die Kriterien erfüllen und erst ein manueller Sequenzvergleich eine höhere Homologie zu einem Protein eines Organismus ohne Komplex I aufweist („*false positive*“). Diese Proteine befinden sich fälschlicherweise in der Auswahl wie das Protein ncu05196. Dieses wurde der Familie GLC.2372 in der ersten *Génolevures*-Generation mit den beiden einzigen Mitgliedern DEHA0F11055g und YALI0F17292g zugeordnet, so dass die gewählten Auswahlkriterien erfüllt waren. Die genauere phylogenetische Untersuchung zeigte die deutliche Verwandtschaft zum Protein MDJ1 aus *S. cerevisiae*, jedoch nur eine geringere Homologie zu den zuvor genannten Proteinen. Die aktuelle Version von *Génolevures* trägt dieser Tatsache Rechnung, da die Proteine DEHA0F11055g und YALI0F17292g einer neuen Proteinfamilie zugeordnet worden sind, die Proteine von allen neun Hefen aufweist, ebenso das Protein MDJ1 aus *S. cerevisiae* (GL3C0020).

Nichtsdestotrotz zeigt sich die Qualität der Identifizierung durch diese Methode in der Entdeckung des B17.2L Proteins (Ogilvie, Kennaway et al. 2005) und in seiner Weiterentwicklung in der Aufdeckung der Relevanz des humanen Protein C8orf38 für die Komplex I-Biogenese (Pagliarini, Calvo et al. 2008).

In der letztgenannten Untersuchung von Pagliarini et al., wurden 42 Eukaryoten mit und ohne Komplex I in die phylogenetische Profilerstellung einbezogen und dadurch 40 mögliche Proteine mit Relevanz für die Komplex I-Biogenese postulierten. Als Ansatz wurde das *protein phylogenetic profiling* gewählt (Pellegrini, Marcotte et al. 1999). Die Überprüfung von vier vielversprechenden Kandidaten durch RNAi in Zelllinien humaner Fibroblasten führte zur Entdeckung des Proteins C8orf38. Die Charakterisierung von orthologen Proteinen zu den 40 möglichen Komplex I-Biogenesefaktoren in *N. crassa* konnte aufgrund fehlender Deletionsmutanten nur

für acht Proteine durchgeführt werden, da die anderen Mutanten zum Zeitpunkt der Untersuchung beim *Neurospora Genome Projects* nicht verfügbar waren. Die acht Deletionsmutanten zeigten jedoch bis auf eine Ausnahme einen aktivem Komplex I. Dargestellt sind die Aktivitätstests für die Proteine ohne Einfluss auf den Komplex I in der nachfolgenden Abbildung 5.1. Hervorzuheben ist hierbei das Protein ncu09517, welches eine hohe Sequenzähnlichkeit zum humanen C8orf38-Protein mit Relevanz für den Komplex I aufweist, jedoch dieses für das orthologe Protein in *N. crassa* nicht nachgewiesen werden konnte.

Das Protein mit nachweisbarem Komplex I-Effekt ncu03439 wies in der Deletionsmutante 21221, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, einen Einfluss auf die Komplex I-Biogenese auf und ist ebenfalls im Rahmen des in dieser Arbeit angewendeten differentiellen Genomvergleichs identifiziert worden (siehe Kapitel 4.2.6).



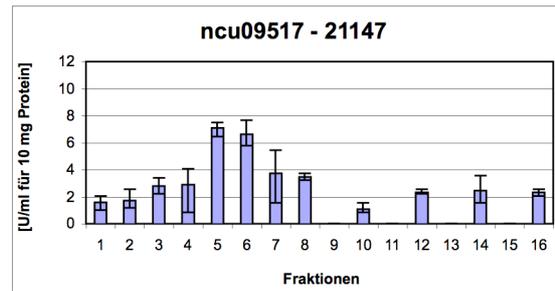


Abb. 5.1: Überprüfung von orthologen Proteinen zu den postulierten Komplex I-Biogenesefaktoren nach Pagliarini et al. ohne Komplex I-Defekt (Pagliarini, Calvo et al. 2008).

Das Prinzip des differentiellen Genomvergleichs weist trotz aller genannten Defizite den Vorzug auf, mit erhöhter Wahrscheinlichkeit spezifische Komplex I-Faktoren zu identifizieren. Die in dieser Arbeit identifizierten Proteine zeigten bis auf das MDJ1-homologe Protein ncu05196 keine betroffenen anderen Atmungskettenkomplexe, welches durch die Bestimmung der Cytochromgehalte und Komplex IV-Färbung in BlauNativ-Gelen gezeigt werden konnte. Dies offenbart den spezifischen Einfluss der Proteine auf die Komplex I-Biogenese und beweist das Vermögen der Eingrenzung durch den differentiellen Genomvergleich zur Identifizierung von spezifischen Faktoren für diesen Assemblierungsprozess.

Die Eingrenzung von 10.000 Genen auf 491 mögliche Biogenesefaktoren für den Komplex I führte zu einer Einschränkung auf 4,9% der gesamten Proteine in *N. crassa*. Bei der Untersuchung von 291 Deletionsmutanten dieser Gene zeigten 8 einen spezifischen Einfluss auf die Komplex I-Biogenese. Zusätzlich zu den 12 bekannten Biogenesefaktoren, welche in Kapitel 2.3.1 aufgeführt werden, ergibt dies 19 gesicherte oder potentielle Kandidaten (das Protein ncu03439 ist homolog zum bekannten humanen C20orf7 und wurde dementsprechend nur einmal gezählt). Bei 39 Untereinheiten in *N. crassa* ergäbe dies ein Verhältnis von ungefähr 2:1. Bemerkenswerterweise zeigt der Komplex IV mit seinen 13 Untereinheiten die Abhängigkeit von mehr 20 Assemblierungsfaktoren, von denen mindestens 14 spezifisch für diesen Komplex sind (Forsha, Church et al. 2001; Fontanesi, Soto et al. 2006; Stiburek, Hansikova et al. 2006; Zee und Glerum 2006; Fontanesi, Soto et al. 2008). Dies ergibt ein ungefähres Verhältnis von Untereinheiten zu Biogenesefaktoren von 1:1. Demzufolge ist nicht davon auszugehen, dass die zum heutigen Zeitpunkt identifizierten, potentiellen 19 Biogenesefaktoren des Komplex I die vollständige Anzahl an spezifischen Proteinen darstellen. Die Untersuchung der noch ausstehenden 146 eingegrenzten Proteine kann bei einer statistischen

Gleichverteilung der positiven Treffer zu möglicherweise weiteren 3-4 Biogenesefaktoren führen.

Eine abschließende Bewertung der Qualität des gewählten Eingrenzungsverfahrens lässt sich erst mit der finalen Aufklärung aller beteiligten Faktoren in der Komplex I-Assemblierung erstellen. Auch stellt sich die Frage nach der Konservierung der jeweiligen Proteinfunktion auch in anderen Organismen, welche in erster Linie von der grundsätzlichen Konservierung des Assemblierungsschemas des Komplex I abhängig ist.

Neben Ansätzen der High-throughput-Screenings, bei welchen mit automatisierten Verfahren eine Vielzahl von beispielsweise Mutanten auf bestimmte Kriterien überprüft werden, kann der Ansatz der sinnvollen Einschränkung möglicher Kandidaten die Identifizierung von relevanten Biogeneseproteinen erleichtern, jedoch ist nicht von der kompletten Identifizierung aller relevanter Faktoren auszugehen. Dem phylogenetischen Ansatz des differentiellen Genomvergleichs sollte also immer die Untersuchung und Identifizierung der genetischen Ursache in manifestierten Komplex I-defizienten Zelllinien verschiedenster Organismen nebenan gestellt sein. Hier zeichnete sich in der Vergangenheit besonders die Identifizierung der Genmutation im Menschen mit klinischem Komplex I-Defekt aus. Darüber hinaus kann die Untersuchung von Proteinen mit einer Zugehörigkeit zu Familien mit einem interessanten bekannten Funktionsspektrum weitere Biogenesefaktoren identifizieren, wie es im nachfolgenden Kapitel für die PPR-Proteine gezeigt werden konnte.

5.1.2 Identifizierung von Biogenesefaktoren durch Untersuchung der PPR-Proteinfamilie

Die bekannten Funktionen der PPR-Proteine in Transkriptions- und Translationsprozessen in Organellen verschiedener Organismen machten die Proteine zu geeigneten Kandidaten für eine Überprüfung ihres Einflusses auf die Komplex I-Biogenese. Beispielsweise zeigte sich ein PPR-Protein in *A. thaliana* (OTP43) verantwortlich für das spezifische Splicing eines Introns in der Komplex I-Untereinheit nad1 (de Longevialle, Meyer et al. 2007).

Insgesamt wurden acht potentielle PPR-Proteine in die Betrachtung einbezogen. Sieben hiervon waren in der MIPS-Online-Datenbank als PPR-Proteine annotiert,

das Protein ncu07684 dagegen wies zusätzlich zu den anderen sieben PPR-Proteinen eine Homologie zum OTP43-Protein auf, so dass die Klassifizierung als PPR-Protein mit Hilfe der Pfam-Datenbank durch Identifizierung einer eindeutigen PPR-Domäne vollzogen werden konnte.

Anzumerken ist hierbei, dass für das CIA84 Protein, welches in *N. crassa* als ein essentielles Komplex I-Chaperon identifiziert wurde (Kuffner, Rohr et al. 1998), als einziges Sequenzmotiv in der Pfam-Datenbank ein schwach konserviertes PPR-Motiv identifiziert werden konnte. Fragwürdig bleibt an dieser Stelle, ob es sich hierbei um eine signifikante Zuordnung oder lediglich eine zufällige Sequenzähnlichkeit handelt. Im Zusammenhang mit der Tatsache, dass das Protein ncu07684 nicht als PPR-Protein annotiert war, kann die Begrenzung der Proteinfamilie mit ihren sieben Mitgliedern in Frage gestellt werden.

Von den acht eindeutig identifizierbaren PPR-Proteinen konnten drei nicht untersucht werden, da ihre Deletionsmutanten lediglich als heterokaryotische Mutanten vorlagen (ncu02674, ncu07871, ncu20322 bzw. alternative Bezeichnung ncu01015). Demnach ist in diesen Genen von einer generellen und essentiellen Funktion des Proteins auszugehen. Ein spezifischer und singulärer Einfluss auf den Komplex I ist daher nicht anzunehmen. Die hypothetischen PPR-Proteine ncu03342 und ncu08674 zeigten keinen Einfluss auf die Biogenese des Komplex I oder IV. Das letztgenannte Protein ncu08674 zeigte zwar die höchste Verwandtschaft zum OTP43-Protein mit der Splicing-Funktion in *A. thaliana*, der intakte Komplex I in dieser Mutante deutet jedoch eine andere Funktion dieses Proteins in *N. crassa* an. Das PPR-Protein CYA-5 (ncu08692) besitzt eine essentielle Bedeutung als Transkriptionsfaktor für die Expression des mitochondrial kodierten COXI Gens (Coffin, Dhillon et al. 1997). Dies zeigte sich in der Abwesenheit eines detektierbaren Komplex IV in der BlauNativ-Gel-Färbung bei gleichzeitiger Anwesenheit eines funktionsfähigen Komplex I. Zwei PPR-Proteine zeigten einen spezifischen Einfluss auf die Komplex I-Biogenese und werden in Kapitel 5.4 diskutiert.

5.2 Eignung des Modellorganismus *Neurospora crassa* für die Identifizierung von Komplex I Biogenesefaktoren

Der eukaryotische Hyphenpilz *Neurospora crassa* ist ein etablierter Modellorganismus, der sich bereits in der Vergangenheit in vielerlei Forschungsgebieten durch seine Anwendung ausgezeichnet hat. Die vollständige

Sequenzierung und Annotation der bekannten Gene und etablierte experimentelle Methoden zeichnet die Anwendung von *N. crassa* aus (Galagan, Calvo et al. 2003; Mannhaupt, Montrone et al. 2003). Auch wenn die gezielte genetische Manipulation des Organismus aufgrund der stark bevorzugten ektopische Integration erschwert ist, so ermöglicht das aktuelle *Neurospora Genome Project* durch die Erzeugung der Deletionsmutanten für die 10.000 Gene eine sehr einfache Möglichkeit die Gene auf ihre Effekte im Falle einer Deletion zu untersuchen (Colot, Park et al. 2006). Dennoch kann beim Vorgang der gezielten Deletion eines Gens nicht ausgeschlossen werden, dass der Defekt im Phänotyp infolge einer ungewollten DNA-Insertion beim Transformationsvorgang verursacht wurde. Um diese Fehlerquellen zu minimieren werden in dem *Neurospora Genome Project* als Transformationsstamm so genannte *mus-52* oder *mus-51* Mutanten verwendet, in denen die Häufigkeit der heterologen Rekombination reduziert ist (Colot, Park et al. 2006).

Die Qualität der Deletionsmutanten kann durch die in dieser Arbeit erzeugten Komplementationsmutanten exemplarisch belegt werden. Es war möglich die Komplex I-Aktivität für die Mutanten 13958, 17876 und 19806 infolge einer ektopischen Geninsertion einer modifizierten Genkopie wiederherzustellen, was im Kapitel 4.2.1 dargelegt ist. Demnach ist der zuvor in den Mutanten identifizierte Komplex I-Defekt eindeutig durch die gewollte Gendeletion hervorgerufen gewesen und belegt die Reliabilität der Deletionsmutanten des *Neurospora Genome Projects*.

Eine Einschränkung in der Verwendung der Deletionsmutanten ist die Analyse essentieller Gene, die infolge der Deletion lediglich als heterokaryotische Deletionsmutanten zur Verfügung stehen. Hierbei wird der letale Defekt durch die intakte Genkopie eines anderen Kerns ausgeglichen und ein Einfluss der gewünschten Deletion ist in diesen Mutanten nicht feststellbar. Von den 491 eingegrenzten Proteinen zeigten 70 Deletionen einen letalen Effekt, so dass sie lediglich heterokaryotisch vorlagen. Bei diesen Genen bzw. ihren Proteinen ist jedoch kein spezifischer Komplex I-Einfluss anzunehmen, da der Verlust dieses Atmungskettenkomplexes durch die Existenz alternativer Oxidasen ausgeglichen werden kann (siehe Kapitel 2.5). Demnach sind sie für die Identifizierung von spezifischen Komplex I-Biogenesefaktoren nicht von Interesse.

Gerade die geringe Redundanz des Genoms im Vergleich zu anderen Organismen ermöglicht es die relevanten Biogenesefaktoren eindeutig zu identifizieren, ohne

dass eine Vielzahl an paralogen Genen respektive ihrer Proteine auf ähnliche Effekte untersucht werden müssten. Die in vielen experimentellen Bereichen bevorzugte Bäckerhefe *S. cerevisiae* weist beispielsweise 17,7 % paraloge Gene auf, bei *N. crassa* sind es lediglich 3,6 %, die einen möglichen Defekt im Falle einer Genmutation ihrer paralogen Gene diesen auszugleichen vermögen. Als Kriterium zur Bestimmung der Redundanz wurden Paraloge anhand einer hohen Sequenzidentität von über 40 % und einer maximalen Differenz in der Sequenzlänge des Proteins von 20 % identifiziert (Mannhaupt, Montrone et al. 2003). Dieser Aspekt konnte in dem in dieser Arbeit durchgeführten differentiellen Genomvergleich nur unter Einschränkungen bestätigt werden, da den 205 potentiell interessanten Proteinfamilien mit Homologen in *N. crassa* lediglich bei 151 Proteinfamilien ein eindeutiges singuläres Protein in *N. crassa* zugeordnet werden konnte. 54 Proteinfamilien wiesen mehrere homologe Proteine in *N. crassa* auf. An dieser Stelle kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei teilweise auch um paraloge Proteine handelt, jedoch wurde bei der Identifizierung der Orthologen zu den Proteinfamilienmitgliedern nicht auf eine höchstmögliche Sequenzähnlichkeit geachtet, sondern alle Treffer des BLAST-Algorithmus in die Eingrenzung potentieller Biogenesefaktoren mit aufgenommen. Auf eine manuelle Sequenzanalyse jedes einzelnen Proteins im Vergleich mit seinen homologen Proteinen wurde verzichtet, so dass eindeutige paraloge Proteine nach dem oben aufgeführten Kriterien nicht identifiziert worden sind.

Des Weiteren kann die Identifizierung von Biogenesefaktoren für den Komplex I in *N. crassa* den Sachverhalt untermauern, dass die Assemblierung dieses ungewöhnlich großen und aus vielen Untereinheiten bestehenden Multienzymkomplexes evolutionär stark konserviert ist, wenn man die entsprechend orthologen Gene ebenfalls in höheren Organismen wieder findet, wie es im Falle des zum CIA30 homologen menschlichen Proteins NDUFAB1 gezeigt werden konnte (Vogel, Janssen et al. 2005; Dunning, McKenzie et al. 2007; Vogel, van den Brand et al. 2007). Beobachtbare Unterschiede, die zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt sind, wie beispielsweise der unterschiedliche Zeitpunkt der Verankerung des peripheren Arms mit Teilen des Membranarms des Komplex I in *N. crassa* im Vergleich zu *H. sapiens* (Schulte 2001; Antonicka, Ogilvie et al. 2003; Vogel, Dieteren et al. 2007; Lazarou, Thorburn et al. 2009) oder die Existenz eines orthologen Proteins zum CIA84 Protein in *H. sapiens* (Gabaldon, Rainey et al. 2005)

können ihrerseits zu einem höheren Verständnis der evolutionären Vorgänge bei der Entwicklung dieses essentiellen Enzyms im Menschen führen. So ist die Identifizierung weiterer, sowohl in verschiedenen Organismen konservierter Biogenesefaktoren in *N. crassa* wie auch pilzspezifischer Faktoren dieses ersten Enzymkomplexes der Atmungskette in Ergänzung mit Arbeiten direkt am humanen Komplex I für ein umfassendes Wissen erstrebenswert, um diesen diffizilen Enzymkomplex besser zu verstehen.

Insbesondere zeichnen sich in diesem Zusammenhang die Proteine ncu05196, ncu00183, ncu02565, ncu07684, ncu06461 aus, da diese einen hohen Grad an Sequenzkonservierung aufweisen. Eine Sonderstellung nimmt hierbei das Protein ncu03439 ein, da das orthologe humane Protein im Menschen ebenfalls als Methyltransferase einen Komplex I-Einfluss zeigt. Eher zu den pilzspezifischen Biogenesefaktoren dürfen die in dieser Arbeit identifizierten Proteine ncu03088 und ncu02937 gezählt werden.

5.3 Einfluss der identifizierten Biogenesepoteine auf die NADH:Ubiquinone Oxidoreduktase

Die Ausprägung des jeweiligen Defektes auf den Komplex I zeigte sich in den verschiedenen Deletionsmutanten teilweise sehr unterschiedlich. Eine grobe erste Unterteilung kann durch den Phänotyp des Komplex I beziehungsweise seiner Assemblierungsintermediate geschehen. Die Gruppe mit einem defekten Komplex I unter Ausbildung des peripheren Arms beinhaltet drei Mitglieder. Der Einfluss des deletierten Proteins ist also bei der Assemblierung des Membranarms zu postulieren. Hierzu gehören die Proteine ncu05196, ncu03088, ncu04781. Die nächste Gruppe mit drei Vertretern bilden die Proteine, deren Deletionsmutanten einen stark verminderten Gehalt an vollständig assembliertem und aktivem Komplex I aufweisen. Die Proteine ncu02937 und die beiden zur Proteinfamilie DUF185 gehörenden Proteine ncu00183 und ncu02565 gehören hierzu. Die Funktion dieser Proteine ist nicht beim Einfluss auf eine der bekannten Assemblierungsintermediate zu suchen, sondern in der Aktivierung oder Stabilisierung des vollständigen Komplexes annehmbar. Lediglich eine Gendeletion führte zu einem assemblierten Membranarm unter vollständiger Abwesenheit eines peripheren Arms, woraus die Bedeutung für die Assemblierung dieses Intermediates annehmbar ist. Dies zeigte sich bei der

Deletion des Gens *ncu03439* in der Mutante 21221. Die beiden PPR-Proteine *ncu20711* und *ncu07684* werden aufgrund ihrer Rolle bei dem mitochondrialen RNA-Metabolismus gesondert im Kapitel 5.4 betrachtet.

Bei allen Proteinen kann zum jetzigen Zeitpunkt der Untersuchungen von einem spezifischen Komplex I-Einfluss ausgegangen werden, da bis auf die Deletionsmutante 11632 die Cytochromgehalte vom Komplex III und IV unauffällig erschienen und die Komplex IV-Aktivität in spezifischen Anfärbungen der BlauNative-Gele sichtbar war.

Nachfolgend wird der Einfluss jedes einzelnen Proteins diskutiert.

Das Protein *ncu05196* zeigte in seiner Deletionsmutante 11632 eine Bildung des peripheren Arms und ebenfalls einen Einfluss auf die Komplexe III und IV, da die Cytochromgehalte a und b reduziert erschienen. Die Abwesenheit des Membranarms untermauert die Annahme, dass der Einfluss dieses Proteins auf die mitochondrial kodierten Untereinheiten anzunehmen ist, welche essentielle Bestandteile des Membranarms sind. Die Überprüfung des mitochondrialen Genoms aufgrund des Verwandtschaftsgrades zum MDJ1-Protein aus *S. cerevisiae* zeigte den generellen Einfluss bei der Aufrechterhaltung des mitochondrialen Genoms. Demnach kann ein spezifischer Einfluss auf den Komplex I negiert werden.

Das Protein *ncu02937* zeigte in seiner Deletionsmutante 13958 geringe Mengen an assembliertem Komplex I und möglicherweise unbetroffene Komplexe III und IV aufgrund der Cytochromgehalte und einer detektierbaren Komplex IV Aktivität in der BlauNative-PAGE. Die entfernte Homologie zu TIM-Proteinen (*translocase of the inner membrane*) und die Vorhersage von zwei Transmembrandomänen legt den Schluss nahe, dass eine spezifische Funktion beim posttranslationalen Import von Komplex I Untereinheiten oder eines relevanten Biogeneseprotein für diesen Enzymkomplex ausgeübt wird.

Das Protein *ncu03088* offenbart einen essentiellen Einfluss auf die Bildung des Membranarms, da der periphere Arm und seine NADH-Oxidationsfähigkeit detektierbar ist. Die Komplexe III und IV schienen nicht beeinträchtigt zu sein. Des Weiteren weist es eine mitochondriale Präsequenz auf, eine Funktion in den Mitochondrien ist also annehmbar. Interessant an diesem Protein ist die Zuordnung zu einer Proteinfamilie mit Mitgliedern, die keinerlei bekannte Funktionen haben (DUF3375) mit einer Häufung in Bakterien. Homologe in Pflanzen und Tieren sind unterrepräsentiert. Dies würde einer Konservierung des Proteins bei der

Assemblierung des Komplex I widersprechen, jedoch sollte hierbei der prokaryotische Ursprung der Mitochondrien beachtet werden. Möglicherweise handelt es sich um ein konserviertes Protein in Prokaryoten und niederen Eukaryoten für die Assemblierung des Komplex I.

Die beiden Proteine ncu00183 und ncu02565 mit ihrer eindeutigen Zuordnung zur Proteinfamilie DUF185 mit einigen wenigen Vertretern mit bekannten Funktionen zeigten beide einen ähnlichen Phänotyp mit minimalen Mengen an assembliertem und aktivem Komplex I. Die Komplexe III und IV erschienen nicht betroffen zu sein aufgrund der Cytochromgehalte und eines detektierbaren Komplex IV. Die Überprüfung der mitochondrialen Transkription, welche aufgrund einer entfernten Verwandtschaft zum ATP synthase β Untereinheit Transkriptionsfaktor / ρ Protein und den mitochondrialen Präsequenzen durchgeführt wurde, zeigte keinen Einfluss beider Proteine auf diese Vorgänge, so dass eine andere Rolle annehmbar ist. Hier können die Untersuchung an dem Modellorganismus *Dictyostelium discoideum* an dem Protein midA als bedeutsam eingestuft werden (Torija, Vicente et al. 2006), welches ebenfalls in die Proteinfamilie DUF185 eingeordnet werden kann und möglicherweise eine rRNA Methyltransferase Funktion ausübt (Sadreyev, Baker et al. 2003). Die Bedeutung einer Methyltransferase zur Aktivierung des Komplex I ist für das nachfolgend genannte Protein ncu03439 ebenfalls diskutierbar und daher nicht auszuschließen. In dem Modellorganismus *D. discoideum* war ein Einfluss auf die Atmung feststellbar. Aufgrund der Anordnung der drei Proteine ncu00183, ncu02565 und midA im phänetischen Stammbaum (siehe Abbildung 4.22) mit einer enge Verwandtschaft von ncu00183 (17876 im Stammbaum) zu midA und der entfernten Position des Proteins ncu02565 (19806) lässt die Überlegung zu, ob beide *N. crassa* Proteine eine ähnliche Funktion wie das Protein midA ausüben und als paraloge Proteine eingestuft werden können.

Für das Protein ncu03439 konnte eindeutig eine Relevanz für die erfolgreiche Assemblierung des peripheren Arm nachgewiesen werden. Bei einer vollständigen Abwesenheit von NADH-Oxidationsaktivität zeigte der immunochemische Nachweis des Membranarms eine Häufung kosedimentierter Membranarmuntereinheiten, die auf ein Assemblierungsintermediat rückschließen lassen (Abb. 4.28). Konträr hierzu waren die Erwartungen aufgrund des bekannten Einflusses des homologen Proteins in *H. sapiens*, da hier die Relevanz des C20orf7 Proteins für die Anwesenheit der mitochondrial kodierten Untereinheit ND1 gezeigt werden konnte (Sugiana, Pagliarini

et al. 2008). Aufgrund der Lokalisation der ND1 Untereinheit im Membranarm war von einer Anhäufung des peripheren Arms auszugehen. Ob diese Beobachtungen auf unterschiedliche Funktionen in den Organismen hindeuten oder bei einer detaillierteren Untersuchung ein sich ergänzendes Bild ergeben, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beurteilt werden. Des Weiteren ist in diesem Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Methyltransferaseaktivität auszugehen, da die Homologie zu bekannten Methyltransferasen evident ist (siehe Abb. 4.26).

5.4 Bedeutung der PPR-Proteine für die mitochondriale Proteinsynthese von Komplex I-Untereinheiten

In dieser Arbeit zeigte sich ein spezifischer Einfluss der PPR-Proteine ncu07684 und ncu20711 für die Assemblierung des Komplex I. Die Möglichkeit den peripheren Arm sowohl im enzymatischen Aktivitätstest wie auch in der Färbung der BlauNativ-PAGE zu detektieren zeigt die Relevanz beider Proteine für die Ausbildung des Membranarms auf. Des Weiteren war der Komplex IV in seiner spezifischen Anfärbung in der BlauNativ-PAGE nicht betroffen. Die Zuordnung zur Familie der Pentatricopeptid-Repeat-Domain-Proteine legte die Untersuchung des mitochondrialen RNA-Metabolismus nah, da bisher alle bekannten Funktionen von Proteinen dieser Familie einen Einfluss auf die RNA-Prozessierung in Organellen zeigten (Meierhoff, Felder et al. 2003; Beick, Schmitz-Linneweber et al. 2008; O'Toole, Hattori et al. 2008; Schmitz-Linneweber und Small 2008).

Die Untersuchung der Prozessierung in den Mitochondrien ist gekennzeichnet durch einen vielstufigen Vorgang bei der Reifung der mRNA. Hierbei finden sowohl Splicingvorgänge der Introns wie auch die Spaltung von polycistronischen Prä-mRNA Transkripten zur final monocistronischen mRNA statt (siehe Kapitel 2.5.2). Hierdurch kann die Untersuchung der vielfältigen Einflussmöglichkeiten der PPR-Proteine aufgrund der Komplexität der Vorgänge als diffizil bezeichnet werden.

Die direkte Untersuchung der mitochondrialen Proteinsynthese ist aufgrund der beschränkten Nachweisbarkeit der Proteine nur im geringen Maße möglich. Zum einen existieren aufgrund des stark hydrophoben Charakters der mitochondrial kodierten Untereinheiten keine Antikörper, die für den Proteinnachweis anhand von Western Blots genutzt werden können. Zum anderen kodiert das mitochondriale Genom nicht ausschließlich Komplex I-Untereinheiten, sondern ebenfalls

Untereinheiten der anderen Atmungskettenkomplexe. Die radioaktive Markierung von mitochondrial kodierten Proteinen führt also zu einer unspezifischen Sichtbarmachung aller 14 Atmungskettenkomplex-Untereinheiten und damit ist der Nachweis einzelner Untereinheiten erschwert. Nichtsdestotrotz können wie nachfolgend aufgeführt Aussagen zur Bedeutung der PPR-Proteine gemacht werden.

Es zeigte sich im Fall des Proteins *ncu20711* (untersuchte Deletionsmutante 20112) die polycistronische mRNA Spezies mit ND4 und ND1 auffällig. Hier war sowohl mit der Sonde gegen die Untereinheit ND4 wie auch ND1 eine signifikante Bande bei ~5.5 kb sichtbar, die in den anderen Deletionsmutanten und im Wildtyp nicht detektierbar war. Aufgrund der nachfolgenden erkennbaren Prozessierung in der Deletionsmutante ist ein Einfluss bei der Beschleunigung der Prozessierung des Primärtranskriptes vermutbar. Interessanterweise zeigte sich bei der Markierung der mitochondrial kodierten Untereinheiten ein deutlicher Mangel an der ND5-Untereinheit, die jedoch in der Prozessierung der mRNA unauffällig erschien. Die Präsenz der Untereinheit ND1 ließ sich nicht final klären, da sie im Autoradiogramm von Untereinheiten der Komplexe III und IV verdeckt wurde. Die Untereinheit ND4 hingegen erscheint im Wildtyp deutlich sichtbar in der Nähe der COX1-Untereinheit, die beiden Deletionsmutanten lassen einen stark reduzierten oder völligen Mangel an dieser Komplex I-Untereinheit vermuten. Möglicherweise überdeckt das Signal der COX1-Untereinheit dieses Signal ebenfalls teilweise. Dies lässt auf eventuell noch weitere Effekte im RNA-Metabolismus durch das Protein *ncu20711* schließen oder einer Wechselwirkung der betroffenen ND1 und ND4 Untereinheiten mit der ND5 Untereinheit. Der spezifische Einfluss auf den Komplex I zeigte sich hier ebenfalls durch die in Erscheinung tretenden mitochondrialen Untereinheiten des Komplex III und IV.

In der Deletionsmutante 20449 des Gens *ncu07684* waren im untersuchten mitochondrialen RNA-Metabolismus die Untereinheiten ND2 und ND3 auffällig durch ein vollständiges Fehlen von Signalen bzw. es waren lediglich marginale Mengen festzustellen. Die Rolle des Proteins *ncu07684* ist demnach in der Transkriptionsinitiierung oder bei der Sicherstellung der Stabilität des Primärtranskriptes zu vermuten. Die Markierung der mitochondrial kodierten Untereinheiten führte hierbei zu keiner weiteren Aufklärung, da die Untereinheiten ND2 und ND3 entweder nicht sichtbar waren oder durch das Signal der COXI-

Untereinheit überlagert sein konnten. Sichtbar war jedoch ein reduzierter Gehalt der ND5 Untereinheit im Vergleich zum Wildtyp und ein fehlendes Signal für die ND4 Untereinheit. Ob dieser Effekt auf die Funktion des Proteins ncu07684 oder einen Abbau zwar translatierter, jedoch unbenötigter Komplex I Untereinheiten und Assemblierungsintermediate zurückzuführen ist, kann an dieser Stelle nicht abschließend erörtert werden.

Alle Ergebnisse deuten auf einen spezifischen Einfluss beider PPR-Proteine auf die mitochondriale Proteinsynthese von Komplex I-Untereinheiten hin.

5.5 Funktionelle Charakterisierung der Biogeneseproteine

In dieser Arbeit stand die Identifizierung und Charakterisierung der Deletionsmutanten im Vordergrund. Für weitere funktionelle Charakterisierungen der identifizierten Biogenesefaktoren wurden zwei Ansätze verfolgt.

Zum einen sollten ausgewählte Deletionsmutanten mit modifizierten Gensequenzen komplementiert werden, um eine Aussage über die Reliabilität der Gendeletion treffen zu können und final das Protein mit Hilfe chromatographischer Verfahren anzureichern und nachweisen zu können. Hierfür sollten die Proteine mit einer Tag-Sequenz fusioniert in *N. crassa* exprimiert werden. Zum anderen sollten die PPR-Proteine für in-vitro Studien heterolog in *E. coli* exprimiert werden, um beispielsweise in RNA-Bindungsstudien die Funktion der beiden Proteine aufzuklären.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich erfolgreiche Komplementationen der Deletionsmutanten 13958, 17876 und 19806 durchzuführen. Eine wiederhergestellte Komplex I-Aktivität zeigt zum einen den spezifischen Einfluss des zuvor deletierten Gens auf die Biogenese des Komplex I und zum anderen bot sich die Möglichkeit, über Modifizierungen des Gens das Protein den Anforderungen weiterer Untersuchungen anzupassen. Hierbei ist die Fusion des Proteins mit Affinitätsmarkern hervorzuheben, um hierdurch das in das Genom reintegrierte Gen beziehungsweise die Existenz des dadurch kodierten Proteins nachzuweisen. Final kann dies als eine Strategie zur Aufreinigung des Proteins genutzt werden. Problematisch zeigte sich die Tatsache, dass durch die Transformation von mehrkernigen Makrokonidien die einzelnen Transformanden ein heterokaryotisches Erbgut aufwiesen und somit der komplementierte Effekt durch die Existenz nicht-komplementierter Kerne in seiner Ausprägung reduziert war. Als Lösungsansatz

kann die Erzeugung einkerniger Mikrokonidien dienen, welcher zwar zeitintensiv ist, jedoch bei erfolgreicher Selektion einer komplementierten Mutante zu einer signifikanten Erhöhung des Komplementationeffektes durch eine wildtypähnliche Komplex I-Aktivität führen sollte. Dieses konnte für die komplementierte Deletionsmutante 19806 gezeigt werden, bei denen die heterokaryotischen Mutanten nach der erfolgreichen Selektion der erzeugten homokaryotischen Mikrokonidien eine Vervielfältigung der Aktivität aufgewiesen haben mit einem annähernd gleich hohen Aktivitätsmaximum wie der Wildtyp (15 U/ml zu 18 U/ml bei 10 mg Protein).

Um in-vitro RNA-Bindungsstudien mit den Pentatricopeptid-Repeat-Domain Proteinen durchzuführen, wurde die heterologe Expression zur Proteinsynthese in *E. coli* etabliert. Nach der Klonierung der beiden Gene in Expressionsvektoren und -stämmen mit der Modifizierung der Proteine um N- oder C-terminal fusionierte Affinitätstags zeigte sich trotz der Variation verschiedener Expressionsparameter die Expression als schwierig. Das Protein ncu20711 mit einer kalkulierten molekularen Masse von 115 kDa wies nur geringe Proteinmengen nach der Expression auf mit einer vollständigen Abwesenheit detektierbaren löslichen Proteins. Hier bietet sich eventuell die Klonierung in einen anderen eukaryotischen Wirtsorganismus an, beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, um höhere Expressionsraten und gesteigerte Löslichkeit des gebildeten Proteins zu erreichen. Diese Strategie kann erfolgsversprechend sein, da eukaryotische Organismen eine ähnliche Nutzung des Codon-Systems haben (Kane 1995) und insbesondere die mögliche Existenz anderer Chaperone aufweisen, die bei der Faltung der heterolog exprimierten Proteine unterstützen können. Die Expression des 72 kDa Proteins ncu07684 war durch die Bildung großer Mengen an Protein in Einschlusskörperchen (sogenannte *inclusion bodies*) problematisch, so dass nur wenig lösliches Protein detektierbar war (Prouty, Karnovsky et al. 1975). Auf die Rückfaltung dieses Proteins wurde verzichtet, da keine Möglichkeit der Aktivitätsüberprüfung aufgrund der unbekanntenen Funktion dieses Proteins gegeben war und somit das Ziel bestand möglichst hohe Mengen löslichen Proteins zu exprimieren. Als Möglichkeit die hohe Expressionsrate zu reduzieren und ferner Assemblierungshelfer einzusetzen, empfiehlt sich die Expression in *E. coli* bei niedrigen Temperaturen und die Coexpression von homologen Proteinen zur GroEL/ES-Familie, die sich bei den gewählten Temperaturen durch eine hohe Aktivität auszeichnen. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die Proteine Cpn60/10 aus *Oleispira antarctica* (Amrein,

Takacs et al. 1995; Ferrer, Chernikova et al. 2003; Ferrer, Lunsdorf et al. 2004). Darüber hinaus kann eine Verkürzung der Proteinsequenz um die N-terminale mitochondriale Präsequenz zu einer Erhöhung der Löslichkeit führen, um die mögliche Aggregation über diese Bereiche zu vermeiden.

Die Möglichkeit der Aufklärung der spezifischen Funktion der beiden PPR-Proteine im mitochondrialen RNA-Metabolismus der Komplex I-Untereinheiten kann zunächst durch den Nachweis der spezifischen RNA-Bindung mit bestimmten mRNA-Spezies erfolgen, weitergehend die eindeutige Identifizierung des Bindungsbereichs mit RNA-footprint Methoden. Die Komplementierung der Deletionsmutanten 20112 und 20449 kann darüber hinaus einen eindeutigen Nachweis einer Rolle der PPR Proteine in den Mitochondrien erbringen mit einer Identifizierung ihrer zellulären Lokalisation.

5.6 Ausblick

Die Aufklärung der Assemblierung und der hierfür essentiellen Biogenesefaktoren des größten und kompliziertesten Atmungskettenkomplexes ist in jüngster Vergangenheit durch viele neue Erkenntnisse und der Aufklärung der Kristallstruktur beschleunigt worden. Als Beitrag weiterer Identifizierungen von Biogenesefaktoren kann die vollständige Untersuchung aller Deletionsmutanten, die den Kriterien des differentiellen Genomvergleichs entsprechen, zu weiteren Identifizierungen führen. Zum jetzigen Zeitpunkt ist dies aufgrund der beschränkten Verfügbarkeit aller Deletionsmutanten durch das *Neurospora Genome Projects* nicht abschließend möglich. Für eine vollständige Bewertung des bioinformatischen Ansatzes sollte der komplette Datensatz erfasst und ausgewertet werden. Dies sollte in absehbarer Zeit erfolgt sein.

Eine interessante Fragestellung ist bezogen auf die Tatsache, ob die in dieser Arbeit identifizierten Proteine einen direkten Einfluss auf den Komplex I ausüben, oder über Sekundäreffekte die erfolgreiche Assemblierung beeinträchtigen.

Die Aufklärung der verschiedenen Funktionen der identifizierten Biogenesepoteine kann durch verschiedene biochemische Ansätze erfolgen. Hierbei ist der phylogenetischen Betrachtung jedes einzelnen Kandidaten Rechnung zu tragen, da dieser erste Hinweise auf Funktionen der Proteine liefern kann.

Im Falle der DUF 185 Proteine kann die Identifizierung der Interaktionspartner durch Bindungsstudien mit immobilisiertem, nativem Protein durch *cross-linking*-Studien ein erster Hinweis auf die Funktionsweise dieser Proteine liefern. Es stellt sich hierbei des Weiteren die Frage, ob die beiden Proteine ähnliche Funktionen ausüben und als paraloge Proteine zu klassifizieren sind.

Die Aufklärung der spezifischen Rolle der beiden Pentatricopeptide-Repeat-Domain Proteine ncu20711 und ncu07684 im RNA-Metabolismus kann durch RNA-Bindungsstudien erfolgen und mit footprint-Analysen die Region der Interaktion genauer verifiziert werden. Hierbei können ergänzend weitere Anhaltspunkte und Erkenntnisse der mitochondrialen Prozessierung der Untereinheiten vom Komplex I erlangt werden und weitergehend ein Zusammenhang zur Ausprägung der Translation mitochondrial kodierter Untereinheiten geschaffen werden.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter und J. E. Walker (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**(6491): 621-8.
- Acin-Perez, R. und M. P. Bayona-Bafaluy (2004). "Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria." Mol Cell Biol **5**(9): 2272-2278.
- Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos und J. A. Enriquez (2008). "Respiratory active mitochondrial supercomplexes." Mol Cell **32**(4): 529-39.
- Al Chab, H. (2009). "Expression von Genen der mitochondrialen Biogenese aus *Neurospora crassa* in *Escherichia coli*." Bachelorarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Al-Samarrai, T. H. und J. Schmid (2000). "A simple method for extraction of fungal genomic DNA." Lett Appl Microbiol **30**(1): 53-6.
- Albrandt, A. (2011). "Expression von Pentatricopeptid-Repeat-Genen aus *Neurospora crassa* in *Escherichia coli*." Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Düsseldorf
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers und D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." J Mol Biol **215**(3): 403-10.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller und D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-402.
- Alves, P. C. und A. Videira (1994). "Disruption of the gene coding for the 21.3-kDa subunit of the peripheral arm of complex I from *Neurospora crassa*." J Biol Chem **269**(10): 7777-84.
- Amrein, K. E., B. Takacs, M. Stieger, J. Molnos, N. A. Flint und P. Burn (1995). "Purification and characterization of recombinant human p50csk protein-tyrosine kinase from an *Escherichia coli* expression system overproducing the bacterial chaperones GroES and GroEL." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1048-52.
- Antonicka, H., I. Ogilvie, T. Taivassalo, R. P. Anitori, R. G. Haller, J. Vissing, N. G. Kennaway und E. A. Shoubridge (2003). "Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency." J Biol Chem **278**(44): 43081-8.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart und H. Schagger (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." EMBO J **17**(24): 7170-8.
- Bateman, A., P. Coggill und R. D. Finn (2010). "DUFs: families in search of function." Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun **66**(Pt 10): 1148-52.
- Bateman, A. und D. H. Haft (2002). "HMM-based databases in InterPro." Brief Bioinform **3**(3): 236-45.

- Baum, J. A. und N. H. Giles (1985). "Genetic control of chromatin structure 5' to the qa-x and qa-2 genes of *Neurospora*." J Mol Biol **182**(1): 79-89.
- Beadle, G. W. und E. L. Tatum (1941). "Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*." Proc Natl Acad Sci U S A **27**(11): 499-506.
- Beick, S., C. Schmitz-Linneweber, R. Williams-Carrier, B. Jensen und A. Barkan (2008). "The pentatricopeptide repeat protein PPR5 stabilizes a specific tRNA precursor in maize chloroplasts." Mol Cell Biol **28**(17): 5337-47.
- Beisenherz, G., H. J. Boltze, T. Bücher, R. Czok, K. H. Garbade, E. Meyer-Arendt und G. Pfeiderer (1953). "Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang." Z. Naturforsch. **8b**: 555-557.
- Berry, E. A. und B. L. Trumpower (1985). "Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes." J Biol Chem **260**(4): 2458-67.
- Biemann, S. (2009). "Heterologe Expression von Assemblierungsfaktoren des mitochondrialen Atmungskettenkomplex I." Bachelorarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Bittner-Eddy, P., A. F. Monroy und R. Brambl (1994). "Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*." J Mol Biol **235**(3): 881-97.
- Bourges, I., C. Ramus, B. Mousson de Camaret, R. Beugnot, C. Remacle, P. Cardol, G. Hofhaus und J. P. Issartel (2004). "Structural organization of mitochondrial human complex I: role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin." Biochem J **383**(Pt. 3): 491-9.
- Breitenberger, C. A., K. S. Browning, B. Alzner-DeWeerd und U. L. RajBhandary (1985). "RNA processing in *Neurospora crassa* mitochondria: use of transfer RNA sequences as signals." EMBO J **4**(1): 185-95.
- Budde, S. M., L. P. van den Heuvel, A. J. Janssen, R. J. Smeets, C. A. Buskens, L. DeMeirleir, R. Van Coster, M. Baethmann, T. Voit, J. M. Trijbels und J. A. Smeitink (2000). "Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene." Biochem Biophys Res Commun **275**(1): 63-8.
- Bych, K., S. Kerscher, D. J. Netz, A. J. Pierik, K. Zwicker, M. A. Huynen, R. Lill, U. Brandt und J. Balk (2008). "The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly." EMBO J **27**(12): 1736-46.
- Campell, J. W., C. S. Enderlin und C. P. Selitrennikoff (1994). "Vectors for expression and modification of cDNA sequences in *Neurospora crassa*." Fungal Genet. Newsl. **41**: 20-21.
- Capitanio, N., G. Capitanio, E. De Nitto, G. Villani und S. Papa (1991). "H⁺/e⁻ stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome c oxidase vesicles." FEBS Lett **288**(1-2): 179-82.
- Cardol, P., F. Vanrobaeys, B. Devreese, J. Van Beeumen, R. F. Matagne und C. Remacle (2004). "Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from

- Chlamydomonas reinhardtii: 31 conserved components among eukaryotes." Biochim Biophys Acta **1658**(3): 212-24.
- Carneiro, P., M. Duarte und A. Videira (2004). "The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria." Biochim Biophys Acta **1608**(1): 45-52.
- Carneiro, P., M. Duarte und A. Videira (2007). "The external alternative NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*." J Mol Biol **368**(4): 1114-21.
- Carroll, J., I. M. Fearnley, R. J. Shannon, J. Hirst und J. E. Walker (2003). "Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria." Mol Cell Proteomics **2**(2): 117-26.
- Carroll, J., I. M. Fearnley, J. M. Skehel, M. J. Runswick, R. J. Shannon, J. Hirst und J. E. Walker (2005). "The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria." Mol Cell Proteomics **4**(5): 693-9.
- Chen, R., I. M. Fearnley, S. Y. Peak-Chew und J. E. Walker (2004). "The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria." J Biol Chem **279**(25): 26036-45.
- Claros, M. G. und P. Vincens (1996). "Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences." Eur J Biochem **241**(3): 779-86.
- Coffin, J. W., R. Dhillon, R. G. Ritzel und F. E. Nargang (1997). "The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein." Curr Genet **32**(4): 273-80.
- Colot, H. V., G. Park, G. E. Turner, C. Ringelberg, C. M. Crew, L. Litvinkova, R. L. Weiss, K. A. Borkovich und J. C. Dunlap (2006). "A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(27): 10352-7.
- Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon und G. Deleage (2000). "NPS@: network protein sequence analysis." Trends Biochem Sci **25**(3): 147-50.
- Cruciat, C. M., S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert und R. A. Stuart (2000). "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria." J Biol Chem **275**(24): 18093-8.
- da Silva, M. V., P. C. Alves, M. Duarte, N. Mota, A. Lobo-da-Cunha, T. A. Harkness, F. E. Nargang und A. Videira (1996). "Disruption of the nuclear gene encoding the 20.8-kDa subunit of NADH: ubiquinone reductase of *Neurospora* mitochondria." Mol Gen Genet **252**(1-2): 177-83.
- Das, A. K., P. W. Cohen und D. Barford (1998). "The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions." EMBO J **17**(5): 1192-9.
- Davis, R. H. (2000). Neurospora: Contributions of a model organism. Oxford, Oxford University Press.
- Davis, R. H. und F. J. de Serres (1970). "Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*." Methods Enzymol **17A**: 79-143.

- de Longevialle, A. F., E. H. Meyer, C. Andres, N. L. Taylor, C. Lurin, A. H. Millar und I. D. Small (2007). "The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 Intron 1 in *Arabidopsis thaliana*." Plant Cell **19**(10): 3256-65.
- de Vries, S. und L. A. Grivell (1988). "Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." Eur J Biochem **176**(2): 377-84.
- de Vries, S. und C. A. Marres (1987). "The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism." Biochim Biophys Acta **895**(3): 205-39.
- DeCorby, A., D. Gaskova, L. C. Sayles und B. D. Lemire (2007). "Expression of Ndi1p, an alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase, increases mitochondrial membrane potential in a *C. elegans* model of mitochondrial disease." Biochim Biophys Acta **1767**(9): 1157-63.
- DeIvecchio, V. G., V. Kapatral, R. J. Redkar, G. Patra, C. Mujer, T. Los, N. Ivanova, I. Anderson, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, G. Reznik, L. Jablonski, N. Larsen, M. D'Souza, A. Bernal, M. Mazur, E. Goltsman, E. Selkov, P. H. Elzer, S. Hagius, D. O'Callaghan, J. J. Letesson, R. Haselkorn, N. Kyrpides und R. Overbeek (2002). "The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(1): 443-8.
- Diaz, F., H. Fukui, S. Garcia und C. T. Moraes (2006). "Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts." Mol Cell Biol **26**(13): 4872-81.
- Douce, R. und M. Neuburger (1989). "The uniqueness of plant mitochondria." Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**: 371-414.
- Duarte, M., M. Peters, U. Schulte und A. Videira (2003). "The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria." Biochem J **371**(Pt 3): 1005-11.
- Duarte, M. und A. Videira (2009). "Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*." Mol Microbiol **72**(1): 246-58.
- Duchniewicz, M., A. Germaniuk, B. Westermann, W. Neupert, E. Schwarz und J. Marszalek (1999). "Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast." Mol Cell Biol **19**(12): 8201-10.
- Dudkina, N. V., H. Eubel, W. Keegstra, E. J. Boekema und H. P. Braun (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(9): 3225-9.
- Dunlap, J. C., K. A. Borkovich, M. R. Henn, G. E. Turner, M. S. Sachs, N. L. Glass, K. McCluskey, M. Plamann, J. E. Galagan, B. W. Birren, R. L. Weiss, J. P. Townsend, J. J. Loros, M. A. Nelson, R. Lambrechts, H. V. Colot, G. Park, P. Colopy, C. Ringelberg, C. Crew, L. Litvinkova, D. DeCaprio, H. M. Hood, S. Curilla, M. Shi, M. Crawford, M. Koerhsen, P. Montgomery, L. Larson, M. Pearson, T. Kasuga, C. Tian, M. Basturkmen, L. Altamirano und J. Xu (2007). "Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project." Adv Genet **57**: 49-96.
- Dunning, C. J., M. McKenzie, C. Sugiana, M. Lazarou, J. Silke, A. Connelly, J. M. Fletcher, D. M. Kirby, D. R. Thorburn und M. T. Ryan (2007). "Human CIA30 is involved in the

- early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease." EMBO J **26**(13): 3227-37.
- Efremov, R. G., R. Baradaran und L. A. Sazanov (2010). "The architecture of respiratory complex I." Nature **465**(7297): 441-5.
- Emanuelsson, O., H. Nielsen, S. Brunak und G. von Heijne (2000). "Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence." J Mol Biol **300**(4): 1005-16.
- Escobar, M. A., K. A. Franklin, A. S. Svensson, M. G. Salter, G. C. Whitelam und A. G. Rasmusson (2004). "Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes." Plant Physiol **136**(1): 2710-21.
- Eubel, H., J. Heinemeyer und H. P. Braun (2004). "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." Plant Physiol **134**(4): 1450-9.
- Fearnley, I. M. und J. E. Walker (1992). "Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins." Biochim Biophys Acta **1140**(2): 105-34.
- Fecke, W., V. D. Sled, T. Ohnishi und H. Weiss (1994). "Disruption of the gene encoding the NADH-binding subunit of NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulphur cluster N-3." Eur J Biochem **220**(2): 551-8.
- Felsenstein, J. (1988). "Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability." Annu Rev Genet **22**: 521-65.
- Fernie, A. R., F. Carrari und L. J. Sweetlove (2004). "Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport." Curr Opin Plant Biol **7**(3): 254-61.
- Ferreirinha, F., M. Duarte, A. M. Melo und A. Videira (1999). "Effects of disrupting the 21 kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*." Biochem J **342 Pt 3**: 551-4.
- Ferrer, M., T. N. Chernikova, M. M. Yakimov, P. N. Golyshin und K. N. Timmis (2003). "Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures." Nat Biotechnol **21**(11): 1266-7.
- Ferrer, M., H. Lunsdorf, T. N. Chernikova, M. Yakimov, K. N. Timmis und P. N. Golyshin (2004). "Functional consequences of single:double ring transitions in chaperonins: life in the cold." Mol Microbiol **53**(1): 167-82.
- Fincham, J. R. S. und P. R. Day (1979). Fungal Genetics (Botanical Monographs). Oxford, Blackwell.
- Finn, R. D., J. Mistry, J. Tate, P. Coggill, A. Heger, J. E. Pollington, O. L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E. L. Sonnhammer, S. R. Eddy und A. Bateman (2010). "The Pfam protein families database." Nucleic Acids Res **38**(Database issue): D211-22.
- Finnegan, P. M., J. Whelan, A. H. Millar, Q. Zhang, M. K. Smith, J. T. Wiskich und D. A. Day (1997). "Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase." Plant Physiol **114**(2): 455-66.

- Fontanesi, F., I. C. Soto und A. Barrientos (2008). "Cytochrome c oxidase biogenesis: new levels of regulation." IUBMB Life **60**(9): 557-68.
- Fontanesi, F., I. C. Soto, D. Horn und A. Barrientos (2006). "Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process." Am J Physiol Cell Physiol **291**(6): C1129-47.
- Forsha, D., C. Church, P. Wazny und R. O. Poyton (2001). "Structure and function of Pet100p, a molecular chaperone required for the assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 436-41.
- Frank, V. und B. Kadenbach (1996). "Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios." FEBS Lett **382**(1-2): 121-4.
- Friedrich, T. (2001). "Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump?" J Bioenerg Biomembr **33**(3): 169-77.
- Friedrich, T., G. Hofhaus, W. Ise, U. Nehls, B. Schmitz und H. Weiss (1989). "A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*." Eur J Biochem **180**(1): 173-80.
- Friedrich, T. und H. Weiss (1997). "Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules." J Theor Biol **187**(4): 529-40.
- Gabaldon, T., D. Rainey und M. A. Huynen (2005). "Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I)." J Mol Biol **348**(4): 857-70.
- Galagan, J. E., S. E. Calvo, K. A. Borkovich, E. U. Selker, N. D. Read, D. Jaffe, W. FitzHugh, L. J. Ma, S. Smirnov, S. Purcell, B. Rehman, T. Elkins, R. Engels, S. Wang, C. B. Nielsen, J. Butler, M. Endrizzi, D. Qui, P. Ianakiev, D. Bell-Pedersen, M. A. Nelson, M. Werner-Washburne, C. P. Selitrennikoff, J. A. Kinsey, E. L. Braun, A. Zelter, U. Schulte, G. O. Kothe, G. Jedd, W. Mewes, C. Staben, E. Marcotte, D. Greenberg, A. Roy, K. Foley, J. Naylor, N. Stange-Thomann, R. Barrett, S. Gnerre, M. Kamal, M. Kamvysselis, E. Mauceli, C. Bielke, S. Rudd, D. Frishman, S. Krystofova, C. Rasmussen, R. L. Metzenberg, D. D. Perkins, S. Kroken, C. Cogoni, G. Macino, D. Catcheside, W. Li, R. J. Pratt, S. A. Osmani, C. P. DeSouza, L. Glass, M. J. Orbach, J. A. Berglund, R. Voelker, O. Yarden, M. Plamann, S. Seiler, J. Dunlap, A. Radford, R. Aramayo, D. O. Natvig, L. A. Alex, G. Mannhaupt, D. J. Ebbole, M. Freitag, I. Paulsen, M. S. Sachs, E. S. Lander, C. Nusbaum und B. Birren (2003). "The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*." Nature **422**(6934): 859-68.
- Genova, M. L., C. Bianchi und G. Lenaz (2003). "Structural organization of the mitochondrial respiratory chain." Ital J Biochem **52**(1): 58-61.
- Gerards, M., W. Sluiter, B. J. van den Bosch, L. E. de Wit, C. M. Calis, M. Frentzen, H. Akbari, K. Schoonderwoerd, H. R. Scholte, R. J. Jongbloed, A. T. Hendrickx, I. F. de Coo und H. J. Smeets (2010). "Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome." J Med Genet **47**(8): 507-12.
- Giles, N. H., M. E. Case, J. Baum, R. Geever, L. Huiet, V. Patel und B. Tyler (1985). "Gene organization and regulation in the qa (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*." Microbiol Rev **49**(3): 338-58.

- Giles, N. H., R. F. Geever, D. K. Asch, J. Avalos und M. E. Case (1991). "The Wilhelmine E. Key 1989 invitational lecture. Organization and regulation of the qa (quinic acid) genes in *Neurospora crassa* and other fungi." J Hered **82**(1): 1-7.
- Göklü, I. (2008). "Einfluss des mitochondrialen Chaperones Mdj auf die Assemblierung des Atmungskettenkomplex I." Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Gonzalez, A., A. Jimenez, D. Vazquez, J. E. Davies und D. Schindler (1978). "Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes." Biochim Biophys Acta **521**(2): 459-69.
- Griffiths, A. J. F., R.A. Collins, and F.E. Nargang (1995). Mitochondrial genetics of *Neurospora*. The Mycota. U. Kück. Berlin, Springer-Verlag. **2**: 93-105.
- Haft, D. H., J. D. Selengut und O. White (2003). "The TIGRFAMs database of protein families." Nucleic Acids Res **31**(1): 371-3.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-80.
- Handa, N., Y. Noguchi, Y. Sakuraba, P. Ballario, G. Macino, N. Fujimoto, C. Ishii und H. Inoue (2000). "Characterization of the *Neurospora crassa* mus-25 mutant: the gene encodes a protein which is homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Rad54 protein." Mol Gen Genet **264**(1-2): 154-63.
- Harkness, T. A., R. A. Rothery, J. H. Weiner, S. Werner, J. E. Azevedo, A. Videira und F. E. Nargang (1995). "Disruption of the gene encoding the 78-kilodalton subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation (RIP)." Curr Genet **27**(4): 339-50.
- Hatakeyama, S., C. Ishii und H. Inoue (1995). "Identification and expression of the *Neurospora crassa* mei-3 gene which encodes a protein homologous to Rad51 of *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **249**(4): 439-46.
- Hinchliffe, P., J. Carroll und L. A. Sazanov (2006). "Identification of a novel subunit of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*." Biochemistry **45**(14): 4413-20.
- Hinchliffe, P. und L. A. Sazanov (2005). "Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I." Science **309**(5735): 771-4.
- Hirst, J., J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon und J. E. Walker (2003). "The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria." Biochim Biophys Acta **1604**(3): 135-50.
- Hunte, C., J. Koepke, C. Lange, T. Rossmann und H. Michel (2000). "Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment." Structure **8**(6): 669-84.
- Hunte, C., V. Zickermann und U. Brandt (2010). "Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I." Science **329**(5990): 448-51.
- Ise, W., H. Haiker und H. Weiss (1985). "Mitochondrial translation of subunits of the rotenone-sensitive NADH:ubiquinone reductase in *Neurospora crassa*." EMBO J **4**(8): 2075-80.

- Ishibashi, K., K. Suzuki, Y. Ando, C. Takakura und H. Inoue (2006). "Nonhomologous chromosomal integration of foreign DNA is completely dependent on MUS-53 (human Lig4 homolog) in *Neurospora*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(40): 14871-6.
- Iwata, S., J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy und B. K. Jap (1998). "Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex." Science **281**(5373): 64-71.
- Iwata, S., C. Ostermeier, B. Ludwig und H. Michel (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." Nature **376**(6542): 660-9.
- Kane, J. F. (1995). "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*." Curr Opin Biotechnol **6**(5): 494-500.
- Kao, M. C., S. Di Bernardo, E. Nakamaru-Ogiso, H. Miyoshi, A. Matsuno-Yagi und T. Yagi (2005). "Characterization of the membrane domain subunit NuoJ (ND6) of the NADH-quinone oxidoreductase from *Escherichia coli* by chromosomal DNA manipulation." Biochemistry **44**(9): 3562-71.
- Kao, M. C., A. Matsuno-Yagi und T. Yagi (2004). "Subunit proximity in the H⁺-translocating NADH-quinone oxidoreductase probed by zero-length cross-linking." Biochemistry **43**(12): 3750-5.
- Kao, M. C., E. Nakamaru-Ogiso, A. Matsuno-Yagi und T. Yagi (2005). "Characterization of the membrane domain subunit NuoK (ND4L) of the NADH-quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*." Biochemistry **44**(27): 9545-54.
- Kashani-Poor, N., K. Zwicker, S. Kerscher und U. Brandt (2001). "A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I." J Biol Chem **276**(26): 24082-7.
- Kennell, J. C. und A. M. Lambowitz (1989). "Development of an in vitro transcription system for *Neurospora crassa* mitochondrial DNA and identification of transcription initiation sites." Mol Cell Biol **9**(9): 3603-13.
- Kleidon, J., N. Plesofsky und R. Brambl (2003). "Transcripts and transcript-binding proteins in mitochondria of *Neurospora crassa*." Mitochondrion **2**(5): 345-60.
- Kotlyar, A. B., V. D. Sled, D. S. Burbaev, I. A. Moroz und A. D. Vinogradov (1990). "Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles." FEBS Lett **264**(1): 17-20.
- Krause, F., N. H. Reifschneider, D. Vocke, H. Seelert, S. Rexroth und N. A. Dencher (2004). ""Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." J Biol Chem **279**(46): 48369-75.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne und E. L. Sonnhammer (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-80.
- Krüll, C. (1995). "Spezifische Mutagenese der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*." Dissertation Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kubelik, A. R., J. C. Kennell, R. A. Akins und A. M. Lambowitz (1990). "Identification of *Neurospora* mitochondrial promoters and analysis of synthesis of the mitochondrial

- small rRNA in wild-type and the promoter mutant [poky]." J Biol Chem **265**(8): 4515-26.
- Kuffner, R., A. Rohr, A. Schmiede, C. Krull und U. Schulte (1998). "Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I)." J Mol Biol **283**(2): 409-17.
- Lazarou, M., M. McKenzie, A. Ohtake, D. R. Thorburn und M. T. Ryan (2007). "Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I." Mol Cell Biol **27**(12): 4228-37.
- Lazarou, M., D. R. Thorburn, M. T. Ryan und M. McKenzie (2009). "Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 78-88.
- Lightowers, R. N. und Z. M. Chrzanowska-Lightowers (2008). "PPR (pentatricopeptide repeat) proteins in mammals: important aids to mitochondrial gene expression." Biochem J **416**(1): e5-6.
- Loiselay, C., N. J. Gumpel, J. Girard-Bascou, A. T. Watson, S. Purton, F. A. Wollman und Y. Choquet (2008). "Molecular identification and function of cis- and trans-acting determinants for petA transcript stability in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts." Mol Cell Biol **28**(17): 5529-42.
- Lowry, R. J., T. L. Durkee und A. S. Sussman (1967). "Ultrastructural studies of microconidium formation in *Neurospora crassa*." J Bacteriol **94**(5): 1757-63.
- Lurin, C., C. Andres, S. Aubourg, M. Bellaoui, F. Bitton, C. Bruyere, M. Caboche, C. Debast, J. Gualberto, B. Hoffmann, A. Lecharny, M. Le Ret, M. L. Martin-Magniette, H. Mireau, N. Peeters, J. P. Renou, B. Szurek, L. Taconnat und I. Small (2004). "Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis." Plant Cell **16**(8): 2089-103.
- Mannhaupt, G., C. Montrone, D. Haase, H. W. Mewes, V. Aign, J. D. Hoheisel, B. Fartmann, G. Nyakatura, F. Kempken, J. Maier und U. Schulte (2003). "What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence." Nucleic Acids Res **31**(7): 1944-54.
- Manthey, G. M. und J. E. McEwen (1995). "The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*." EMBO J **14**(16): 4031-43.
- Marella, M., B. B. Seo, B. B. Thomas, A. Matsuno-Yagi und T. Yagi (2010). "Successful amelioration of mitochondrial optic neuropathy using the yeast NDI1 gene in a rat animal model." PLoS One **5**(7): e11472.
- Marella, M., B. B. Seo, T. Yagi und A. Matsuno-Yagi (2009). "Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the Ndi1 therapy." J Bioenerg Biomembr **41**(6): 493-7.
- Marques, I., N. A. Dencher, A. Videira und F. Krause (2007). "Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria." Eukaryot Cell **6**(12): 2391-405.

- Marques, I., M. Duarte und A. Videira (2003). "The 9.8 kDa subunit of complex I, related to bacterial Na(+)-translocating NADH dehydrogenases, is required for enzyme assembly and function in *Neurospora crassa*." J Mol Biol **329**(2): 283-90.
- Mathiesen, C. und C. Hagerhall (2003). "The 'antiporter module' of respiratory chain complex I includes the MrpC/NuoK subunit -- a revision of the modular evolution scheme." FEBS Lett **549**(1-3): 7-13.
- McKenzie, M., M. Lazarou, D. R. Thorburn und M. T. Ryan (2006). "Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients." J Mol Biol **361**(3): 462-9.
- Meier, T., P. Polzer, K. Diederichs, W. Welte und P. Dimroth (2005). "Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*." Science **308**(5722): 659-62.
- Meierhoff, K., S. Felder, T. Nakamura, N. Bechtold und G. Schuster (2003). "HCF152, an Arabidopsis RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs." Plant Cell **15**(6): 1480-95.
- Melo, A. M., T. M. Bandejas und M. Teixeira (2004). "New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases." Microbiol Mol Biol Rev **68**(4): 603-16.
- Melo, A. M., M. Duarte, I. M. Moller, H. Prokisch, P. L. Dolan, L. Pinto, M. A. Nelson und A. Videira (2001). "The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria." J Biol Chem **276**(6): 3947-51.
- Melo, A. M., M. Duarte und A. Videira (1999). "Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria." Biochim Biophys Acta **1412**(3): 282-7.
- Michalecka, A. M., A. S. Svensson, F. I. Johansson, S. C. Agius, U. Johanson, A. Brennicke, S. Binder und A. G. Rasmusson (2003). "Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light." Plant Physiol **133**(2): 642-52.
- Michel, H. (1999). "Cytochrome c oxidase: catalytic cycle and mechanisms of proton pumping--a discussion." Biochemistry **38**(46): 15129-40.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-8.
- Mitchell, P. (1976). "Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems." J Theor Biol **62**(2): 327-67.
- Moller, I. M. (2001). "PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **52**: 561-591.
- Moseler, R. (2011). "Charakterisierung modifizierter Biogenesepoteine des Atmungskettenkomplex I." Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Nehls, U., T. Friedrich, A. Schmiede, T. Ohnishi und H. Weiss (1992). "Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora* mitochondria by gene disruption." J Mol Biol **227**(4): 1032-42.

- Nelson, M. A. und G. Macino (1987). "Structure and expression of the overlapping ND4L and ND5 genes of *Neurospora crassa* mitochondria." Mol Gen Genet **206**(2): 307-17.
- Nelson, M. A. und G. Macino (1987). "Three class I introns in the ND4L/ND5 transcriptional unit of *Neurospora crassa* mitochondria." Mol Gen Genet **206**(2): 318-25.
- Niebisch, A. und M. Bott (2003). "Purification of a cytochrome bc-aa3 supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa3 oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c1." J Biol Chem **278**(6): 4339-46.
- Nielsen, H., J. Engelbrecht, S. Brunak und G. von Heijne (1997). "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." Protein Eng **10**(1): 1-6.
- Niini, S. S. und M. Raudaskoski (1993). "Response of ectomycorrhizal fungi to benomyl and nocodazole: growth inhibition and microtubule depolymerization." Mycorrhiza **3**: 83-91.
- Nikolski, M. und D. J. Sherman (2007). "Family relationships: should consensus reign?--consensus clustering for protein families." Bioinformatics **23**(2): e71-6.
- Ninomiya, Y., K. Suzuki, C. Ishii und H. Inoue (2004). "Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(33): 12248-53.
- Nosek, J. und H. Fukuhara (1994). "NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts." J Bacteriol **176**(18): 5622-30.
- Nouws, J., L. Nijtmans, S. M. Houten, M. van den Brand, M. Huynen, H. Venselaar, S. Hoefs, J. Gloerich, J. Kronick, T. Hutchin, P. Willems, R. Rodenburg, R. Wanders, L. van den Heuvel, J. Smeitink und R. O. Vogel (2010). "Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I." Cell Metab **12**(3): 283-94.
- Nowrousian, M. (2007). "*Neurospora crassa* als Modellorganismus im "postgenomischen" Zeitalter." BIOspektrum **07.07**(13. Jahrgang): 708-710.
- O'Toole, N., M. Hattori, C. Andres, K. Iida, C. Lurin, C. Schmitz-Linneweber, M. Sugita und I. Small (2008). "On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants." Mol Biol Evol **25**(6): 1120-8.
- Ogilvie, I., N. G. Kennaway und E. A. Shoubridge (2005). "A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy." J Clin Invest **115**(10): 2784-92.
- Ohnishi, T. (2010). "Structural biology: Piston drives a proton pump." Nature **465**(7297): 428-9.
- Ohnishi, T. und J. C. Salerno (2005). "Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)." FEBS Lett **579**(21): 4555-61.
- Okuda, K., F. Myouga, R. Motohashi, K. Shinozaki und T. Shikanai (2007). "Conserved domain structure of pentatricopeptide repeat proteins involved in chloroplast RNA editing." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 8178-83.

- Okuda, K., T. Nakamura, M. Sugita, T. Shimizu und T. Shikanai (2006). "A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing." J Biol Chem **281**(49): 37661-7.
- Orbach, M. J., E. B. Porro und C. Yanofsky (1986). "Cloning and characterization of the gene for beta-tubulin from a benomyl-resistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker." Mol Cell Biol **6**(7): 2452-61.
- Page, C. C., C. C. Moser, X. Chen und P. L. Dutton (1999). "Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction." Nature **402**(6757): 47-52.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr und V. K. Mootha (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." Cell **134**(1): 112-23.
- Pandit, A. und R. Maheshwari (1993). "A simple method of obtaining pure microconidia in *Neurospora crassa*." Fungal Genet Newsl. **40**: 64-65.
- Papa, S., N. Capitanio, G. Capitanio, E. De Nitto und M. Minuto (1991). "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H⁺/e⁻ stoichiometry." FEBS Lett **288**(1-2): 183-6.
- Park, J. S., Y. F. Li und Y. Bai (2007). "Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation." Biochim Biophys Acta **1772**(5): 533-42.
- Patel, V. B., M. Schweizer, C. C. Dykstra, S. R. Kushner und N. H. Giles (1981). "Genetic organization and transcriptional regulation in the qa gene cluster of *Neurospora crassa*." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(9): 5783-7.
- Paumard, P., J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D. M. Mueller, D. Brethes, J. P. di Rago und J. Velours (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." EMBO J **21**(3): 221-30.
- Pellegrini, M., E. M. Marcotte, M. J. Thompson, D. Eisenberg und T. O. Yeates (1999). "Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(8): 4285-8.
- Perales-Clemente, E., E. Fernandez-Vizarra, R. Acin-Perez, N. Movilla, M. P. Bayona-Bafaluy, R. Moreno-Loshuertos, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva und J. A. Enriquez (2010). "Five entry points of the mitochondrially encoded subunits in mammalian complex I assembly." Mol Cell Biol **30**(12): 3038-47.
- Perkins, D. D. und R. H. Davis (2000). "Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses." Appl Environ Microbiol **66**(12): 5107-9.
- Prouty, W. F., M. J. Karnovsky und A. L. Goldberg (1975). "Degradation of abnormal proteins in *Escherichia coli*. Formation of protein inclusions in cells exposed to amino acid analogs." J Biol Chem **250**(3): 1112-22.
- Raghavendra, A. S. und K. Padmasree (2003). "Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation." Trends Plant Sci **8**(11): 546-53.
- Raju, T. N. (1999). "The Nobel chronicles. 1958: George Wells Beadle (1903-89), Edward Lawrie Tatum (1909-75) and Joshua Lederberg (b 1925)." Lancet **353**(9169): 2082.

- Rao, R. N., N. E. Allen, J. N. Hobbs, Jr., W. E. Alborn, Jr., H. A. Kirst und J. W. Paschal (1983). "Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*." Antimicrob Agents Chemother **24**(5): 689-95.
- Robinson, B. H. (1998). "The role of manganese superoxide dismutase in health and disease." J Inherit Metab Dis **21**(5): 598-603.
- Rowley, N., C. Prip-Buus, B. Westermann, C. Brown, E. Schwarz, B. Barrell und W. Neupert (1994). "Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding." Cell **77**(2): 249-59.
- Saada, A., S. Edvardson, M. Rapoport, A. Shaag, K. Amry, C. Miller, H. Lorberboum-Galski und O. Elpeleg (2008). "C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I." Am J Hum Genet **82**(1): 32-8.
- Saada, A., R. O. Vogel, S. J. Hoefs, M. A. van den Brand, H. J. Wessels, P. H. Willems, H. Venselaar, A. Shaag, F. Barghuti, O. Reish, M. Shohat, M. A. Huynen, J. A. Smeitink, L. P. van den Heuvel und L. G. Nijtmans (2009). "Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease." Am J Hum Genet **84**(6): 718-27.
- Sadreyev, R. I., D. Baker und N. V. Grishin (2003). "Profile-profile comparisons by COMPASS predict intricate homologies between protein families." Protein Sci **12**(10): 2262-72.
- Sakuraba, Y., A. L. Schroeder, C. Ishii und H. Inoue (2000). "A *Neurospora* double-strand-break repair gene, mus-11, encodes a RAD52 homologue and is inducible by mutagens." Mol Gen Genet **264**(4): 392-401.
- Sanz, A., M. Soikkeli, M. Portero-Otin, A. Wilson, E. Kemppainen, G. McIlroy, S. Ellila, K. K. Kemppainen, T. Tuomela, M. Lakanmaa, E. Kiviranta, R. Stefanatos, E. Dufour, B. Hutz, A. Naudi, M. Jove, A. Zeb, S. Vartiainen, A. Matsuno-Yagi, T. Yagi, P. Rustin, R. Pamplona und H. T. Jacobs (2010). "Expression of the yeast NADH dehydrogenase Ndi1 in *Drosophila* confers increased lifespan independently of dietary restriction." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(20): 9105-10.
- Sazanov, L. A. (2007). "Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain." Biochemistry **46**(9): 2275-88.
- Sazanov, L. A. und P. Hinchliffe (2006). "Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*." Science **311**(5766): 1430-6.
- Schagger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 154-9.
- Schagger, H. und K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." EMBO J **19**(8): 1777-83.
- Schmitz-Linneweber, C. und I. Small (2008). "Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression." Trends Plant Sci **13**(12): 663-70.
- Schmitz-Linneweber, C., R. Williams-Carrier und A. Barkan (2005). "RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates." Plant Cell **17**(10): 2791-804.

- Schneider, R., M. Massow, T. Lisowsky und H. Weiss (1995). "Different respiratory-defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein." Curr Genet **29**(1): 10-7.
- Schulte, U. (2001). "Biogenesis of respiratory complex I." J Bioenerg Biomembr **33**(3): 205-12.
- Schulte, U., W. Fecke, C. Krull, U. Nehls, A. Schmiede, R. Schneider, T. Ohnishi und H. Weiss (1994). "In vivo dissection of the mitochondrial respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I)." Biochim Biophys Acta **1187**(2): 121-4.
- Schulte, U., V. Haupt, A. Abelmann, W. Fecke, B. Brors, T. Rasmussen, T. Friedrich und H. Weiss (1999). "A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex." J Mol Biol **292**(3): 569-80.
- Schwitzguebel, J. P. und J. M. Palmer (1982). "Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*." J Bacteriol **149**(2): 612-9.
- Sebald, W., W. Neupert und H. Weiss (1979). "Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria." Methods Enzymol **55**: 144-8.
- Seo, B. B., E. Nakamaru-Ogiso, T. R. Flotte, A. Matsuno-Yagi und T. Yagi (2006). "In vivo complementation of complex I by the yeast Ndi1 enzyme. Possible application for treatment of Parkinson disease." J Biol Chem **281**(20): 14250-5.
- Shear, C. L. und B. O. Dodge (1927). "Life histories and heterothallism of red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group." J. Agric. Res. **34**: 1019-1042.
- Sheftel, A. D., O. Stehling, A. J. Pierik, D. J. Netz, S. Kerscher, H. P. Elsasser, I. Wittig, J. Balk, U. Brandt und R. Lill (2009). "Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I." Mol Cell Biol **29**(22): 6059-73.
- Sherman, D. J., T. Martin, M. Nikolski, C. Cayla, J. L. Souciet und P. Durrens (2009). "Genolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D550-4.
- Simons, B. H., F. F. Millenaar, L. Mulder, L. C. Van Loon und H. Lambers (1999). "Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato." Plant Physiol **120**(2): 529-38.
- Singh, A., D. Ursic und J. Davies (1979). "Phenotypic suppression and misreading *Saccharomyces cerevisiae*." Nature **277**(5692): 146-8.
- Small, I. D. und N. Peeters (2000). "The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins." Trends Biochem Sci **25**(2): 46-7.
- Smeitink, J., L. van den Heuvel und S. DiMauro (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." Nat Rev Genet **2**(5): 342-52.
- Solioz, M., E. Carafoli und B. Ludwig (1982). "The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system." J Biol Chem **257**(4): 1579-82.
- Staben, C., B. Jensen, M. Singer, J. Pollock, M. Schechtmann, J. Kinsey und E. Selker (1989). "Use of a bacterial hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation." Fung. Genet. Newsl. **36**: 79-81.

- Stiburek, L., H. Hansikova, M. Tesarova, L. Cerna und J. Zeman (2006). "Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase." Physiol Res **55 Suppl 2**: S27-41.
- Stroh, A., O. Anderka, K. Pfeiffer, T. Yagi, M. Finel, B. Ludwig und H. Schagger (2004). "Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*." J Biol Chem **279**(6): 5000-7.
- Sugiana, C., D. J. Pagliarini, M. McKenzie, D. M. Kirby, R. Salemi, K. K. Abu-Amero, H. H. Dahl, W. M. Hutchison, K. A. Vascotto, S. M. Smith, R. F. Newbold, J. Christodoulou, S. Calvo, V. K. Mootha, M. T. Ryan und D. R. Thorburn (2008). "Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease." Am J Hum Genet **83**(4): 468-78.
- Svensson, A. S. und A. G. Rasmusson (2001). "Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves." Plant J **28**(1): 73-82.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins und T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res **22**(22): 4673-80.
- Torija, P., J. J. Vicente, T. B. Rodrigues, A. Robles, S. Cerdan, L. Sastre, R. M. Calvo und R. Escalante (2006). "Functional genomics in *Dictyostelium*: MidA, a new conserved protein, is required for mitochondrial function and development." J Cell Sci **119**(Pt 6): 1154-64.
- Tsukihara, T., H. Aoyama, E. Yamashita, T. Tomizaki, H. Yamaguchi, K. Shinzawa-Itoh, R. Nakashima, R. Yaono und S. Yoshikawa (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." Science **272**(5265): 1136-44.
- Tuschen, G., U. Sackmann, U. Nehls, H. Haiker, G. Buse und H. Weiss (1990). "Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits." J Mol Biol **213**(4): 845-57.
- Ugalde, C., R. Vogel, R. Huijbens, B. Van Den Heuvel, J. Smeitink und L. Nijtmans (2004). "Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies." Hum Mol Genet **13**(20): 2461-72.
- Uyttewaal, M., H. Mireau, M. Rurek, K. Hammani, N. Arnal, M. Quadrado und P. Giege (2008). "PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria." J Mol Biol **375**(3): 626-36.
- Vahsen, N., C. Cande, J. J. Briere, P. Benit, N. Joza, N. Larochette, P. G. Mastroberardino, M. O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F. Madeo, M. Piacentini, J. M. Penninger, H. Schagger, P. Rustin und G. Kroemer (2004). "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation." EMBO J **23**(23): 4679-89.
- Videira, A. (1998). "Complex I from the fungus *Neurospora crassa*." Biochim Biophys Acta **1364**(2): 89-100.
- Vogel, H. J. (1956). "A convenient growth media for *Neurospora crassa*." Microbiol Genet Bull **13**: 42-47.

- Vogel, R. O., C. E. Dieteren, L. P. van den Heuvel, P. H. Willems, J. A. Smeitink, W. J. Koopman und L. G. Nijtmans (2007). "Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUFS3 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits." J Biol Chem **282**(10): 7582-90.
- Vogel, R. O., R. J. Janssen, C. Ugalde, M. Grovenstein, R. J. Huijbens, H. J. Visch, L. P. van den Heuvel, P. H. Willems, M. Zeviani, J. A. Smeitink und L. G. Nijtmans (2005). "Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUFAF1." FEBS J **272**(20): 5317-26.
- Vogel, R. O., R. J. Janssen, M. A. van den Brand, C. E. Dieteren, S. Verkaart, W. J. Koopman, P. H. Willems, W. Pluk, L. P. van den Heuvel, J. A. Smeitink und L. G. Nijtmans (2007). "Cytosolic signaling protein Ecsit also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUFAF1 and functions in complex I assembly." Genes Dev **21**(5): 615-24.
- Vogel, R. O., M. A. van den Brand, R. J. Rodenburg, L. P. van den Heuvel, M. Tsuneoka, J. A. Smeitink und L. G. Nijtmans (2007). "Investigation of the complex I assembly chaperones B17.2L and NDUFAF1 in a cohort of CI deficient patients." Mol Genet Metab **91**(2): 176-82.
- Wang, Z., Y. Zou, X. Li, Q. Zhang, L. Chen, H. Wu, D. Su, Y. Chen, J. Guo, D. Luo, Y. Long, Y. Zhong und Y. G. Liu (2006). "Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing." Plant Cell **18**(3): 676-87.
- Wu, J. und B. P. Rosen (1991). "The ArsR protein is a trans-acting regulatory protein." Mol Microbiol **5**(6): 1331-6.
- Xia, D., C. A. Yu, H. Kim, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu und J. Deisenhofer (1997). "Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria." Science **277**(5322): 60-6.
- Yadava, N. und I. E. Scheffler (2004). "Import and orientation of the MWFE protein in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase." Mitochondrion **4**(1): 1-12.
- Yagi, T. und A. Matsuno-Yagi (2003). "The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked." Biochemistry **42**(8): 2266-74.
- Yagi, T., B. B. Seo, S. Di Bernardo, E. Nakamaru-Ogiso, M. C. Kao und A. Matsuno-Yagi (2001). "NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine." J Bioenerg Biomembr **33**(3): 233-42.
- Zee, J. M. und D. M. Glerum (2006). "Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast." Biochem Cell Biol **84**(6): 859-69.
- Zhang, J., W. Zhang, D. Zou, G. Chen, T. Wan, M. Zhang und X. Cao (2002). "Cloning and functional characterization of ACAD-9, a novel member of human acyl-CoA dehydrogenase family." Biochem Biophys Res Commun **297**(4): 1033-42.
- Zhang, Z., L. Huang, V. M. Shulmeister, Y. I. Chi, K. K. Kim, L. W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry und S. H. Kim (1998). "Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1." Nature **392**(6677): 677-84.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
bidest.	bidestilatus
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
°C	Grad Celsius
Da	Dalton (Masseneinheit)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DDM	Dodecyl-b-maltopyranosid
<i>D. hansenii</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DUF	domain of unknown function
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FMN	Flavinmononukleotid
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitäts-Chromatographie
KCN	Kaliumcyanid
<i>K. lactis</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPR	Pentatricopeptid-Repeat-Protein
QA	Chinasäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethoxy)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
<i>Y. lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Biochemie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich bei diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Ulrich Schulte, der mir die Möglichkeit gegeben hat am Komplex I zu forschen und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand! Vielen Dank für seine menschliche Art, die vielen Diskussionen und sein Engagement!

Danken möchte ich auch Prof. Dr. Lutz Schmitt für die Übernahme des Koreferats und die immerwährende Unterstützung unserer Komplex I-Gruppe.

Was wäre diese Zeit ohne Martina Wesemann, Yasmin Golestani und Ricarda Moseler gewesen? Bestimmt nur halb so schön! Vielen Dank für Eure Ratschläge, Ideen und gute Gespräche, die nicht nur den Komplex I zum Thema hatten...

Unser Büro werde ich bestimmt vermissen! Danke an Silke, Tatu, Nino und Jan, dass ihr nicht nur nette Sitznachbarn, sondern darüber hinaus gute Freunde geworden seid!

Ein Dank gilt auch an Sander, der mit großem Engagement und Leidenschaft die Gruppe motiviert. Danke für „The Others“ und alles drumherum!

Vielen Dank an die großartige Truppe, die diesen Ort besonders werden ließ: Andre, Britta, Christian, Diana, Lolita, Marianne, Miro, Nacera, Nils, Patrick, Petra, Philipp, Rakesh, Sabrina und Susanne.

Ein großer Dank an all die Studenten und Schüler, die meine Arbeit unterstützt haben: Andreas, Christine, Iren, Kristian, Stefan, Hussein, Gabriel und Anastasia!

Meinen ehemaligen Kommilitonen Antje und Andreas, Marco, Garlef und Susanne möchte ich für die tolle Zeit des Studentenlebens und ihre Freundschaft danken!

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für alles – für ihre Liebe und die Unterstützung! Ihr habt mir ermöglicht meinen Weg zu gehen!

Meiner großen Liebe Georg danke ich für das Verständnis und seinen bedingungslosen Rückhalt! Danke, dass Du der Mensch bist, der Du bist!

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, den 23.05.2011

Veronika Ilona Solotoff