

**Der Membranarm des Atmungskettenkomplex I von
Neurospora crassa: Versuche zur Kristallisation und
Isolation mit Hilfe von Peptid-Tags.**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Andreas Drexler
aus Kassel

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. H. Weiss
Korreferent: Prof. Dr. M. Bott

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2002

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1	Die oxidative Phosphorylierung	3
2.2	Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)	5
2.3	Stabile Fragmente und Assemblierungsintermediate von Komplex I	7
2.4	<i>Neurospora crassa</i> - ein Modellorganismus	10
2.5	Kristallisation von Proteinen	12
2.6	Affinitätschromatographie mit Tag-Systemen	15
2.7	Thema der Arbeit	16
3.	Material und Methoden	18
3.1	Lösungen und Medien	18
3.2	Mikroorganismen, Vektoren, Oligonukleotide	20
3.3	Bezugsquellen verwendeter Materialien	21
3.4	Anzucht der Mikroorganismen	21
3.5	Isolierung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	22
3.6	Kristallisation des Membranarms von Komplex I	25
3.7	Verschiedene proteinchemische Methoden	26
3.8	Molekularbiologische Methoden	28
4.	Ergebnisse	33
4.1	Isolierung des Membranarms von Komplex I aus <i>N. crassa</i>	33
4.2	Kristalle des Membranarms von Komplex I	37
4.3	Strategie zur Einführung von Affinitäts-Tags in Untereinheiten des Membranarms von Komplex I	38
4.4	Erzeugung der Doppelmutante <i>nuo21,3/78</i>	39
4.5	Analyse der Doppelmutanten	40
4.6	Erzeugung des Plasmids p19EBF	41
4.7	Amplifikation und Mutation der cDNA der 20,9 und 31,3 kDa Untereinheiten	42

4.8	Erstellen der Expressionsvektoren	45
4.9	Transformation von <i>N. crassa</i> und Analyse der Transformanten	47
4.10	Affinitätschromatographie der Transformanten von <i>nuo21,3</i>	51
5.	Diskussion	53
5.1	Kristallisation des Membranarms von Komplex I	53
5.2	Affinitäts-Tags für Untereinheiten des Membranarms	54
6.	Literatur	58

1. Zusammenfassung

Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, der sog. Atmungskettenkomplex I, ist Teil des universellen Systems der Oxidativen Phosphorylierung. Verwandte Formen des Komplex I kommen in der Cytoplasmamembran vieler Prokaryoten und in der inneren Mitochondrienmembran der meisten Eukaryoten vor. Wegen des sehr komplexen Aufbaus und fehlender hochaufgelöster Strukturdaten ist der Mechanismus des Komplex I noch unbekannt.

In unserem Institut wird der mitochondriale Komplex I aus dem Pilz *Neurospora crassa* untersucht. Dieser Komplex besitzt wie der Komplex I von Tieren eine molare Masse von etwa 1 MDa und besteht aus ca. 40 verschiedenen Untereinheiten, die in zwei sog. Armen angeordnet sind und dem Komplex eine L-förmigen Struktur geben. Die NADH-Bindestelle und alle bisher bekannten Redoxgruppen, ein Flavinmononucleotid (FMN) und 6 Eisen-Schwefel-Zentren (FeS-Zentren), liegen im peripheren Arm, der weit in die mitochondriale Matrix ragt. Im Membranarm liegt die Ubichinon-Bindestelle und möglicherweise eine strukturell noch unbestimmte chinoide Redoxgruppe. Frühere Untersuchungen mit Deletionsmutanten von *N. crassa*, in denen Gene von Untereinheiten entweder des peripheren Arms oder des Membranarms zerstört worden waren, hatten gezeigt, daß die beiden Arme des Komplexes unabhängig voneinander assembliert und dann als Fertigbauteile zum Komplex zusammengefügt werden.

In dieser Arbeit wurde als Alternative zur Kristallisation des Gesamtkomplex I die Kristallisation des Membranarms verfolgt. Dieser wurde zunächst durch Spaltung des Komplex I mit dem chaotrop wirkenden Kaliumrhodanid und folgender Zuckergradientenzentrifugation und Größenausschlußchromatographie isoliert. Mit der Methode des liegenden Tropfens und der Gasphasendiffusion bildeten sich in Dodecylmaltosid-haltiger Lösung mit PEG 4000 stäbchenförmige Kristalle, die aber mit Kantenlängen von unter 20 µm zu klein für eine Röntgenstrukturanalyse blieben.

Im zweiten Teil der Doktorarbeit wurde deshalb versucht, Untereinheiten des Membranarms mit einer Affinitätsmarkierung zu versehen, um den Membranarm dann schonender über Affinitätschromatographie zu isolieren. Ausgegangen wurde

von Deletionsmutanten in denen Gene von Untereinheiten entweder des peripheren Arms oder des Membranarms von Komplex I zerstört worden waren. In der Mutante *nuo78* (*nuo* von NADH:Ubichinon Qxidoreduktase) fehlte das Gen der 78 kDa Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I. Diese Mutante konnte nur noch dem Membranarm des Komplexes assemblieren. In den Mutanten *nuo20,9* und *nuo21,3* fehlten die Gene für die 20,9 kDa bzw. die 21,3 kDa Untereinheit des Membranarms. Diese Mutanten bildeten nur den periphere Arm und Vorstufen des Membranarms von Komplex I.

Zunächst wurden durch Kreuzung die Doppelmutanten *nuo21,3/78* bzw. *nuo20,9/78* hergestellt. Diese wurden dann mit Genen der Untereinheiten 21,3 bzw. 20,9, die mit Sequenzen für Peptid-Tags ausgestattet waren, transformiert. Das DNA-Konstrukt für die Transformation bestand jeweils aus dem Promoter des mitochondrialen Acylcarrierproteins von *Aspergillus niger* und der jeweiligen um die Sequenz des Tags verlängerten cDNA der Untereinheit.

Die mit einem Strep-II Tag versehene 20,9 kDa Untereinheit konnte in keiner der erhaltenen Transformanten nachgewiesen werden. Die um den His-Tag verlängerte 20,9 kDa Untereinheit wurde zwar synthetisiert, aber nicht in die Mitochondrien importiert. In den Transformanten, in die das Gen der 21,3 kDa Untereinheit mit den Sequenzen für ein His-Tag oder ein Strep-II Tag eingebracht worden war, wurde die Untereinheit gebildet und in die Mitochondrien importiert. Die Assemblierung des Membranarms blieb jedoch auf der sog. kleine „Membranarmvorstufe“ stehen. Der Membranarm wurde nicht assembliert.

2. Einleitung

2.1 Die oxidative Phosphorylierung

Der wichtigsten energieumwandelnde Prozeß heterotropher Organismen ist die oxidative Phosphorylierung, die der Zelle den größten Teil des ATP zur Verfügung stellt (Abb. 1). Drei transmembrane Atmungskettenkomplexe, die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), die Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) koppeln den Elektronentransport von NADH auf Sauerstoff mit der Translokation von Protonen über die Membran. Sie erzeugen damit ein transmembranes elektrochemisches Protonenpotential. Die ATPase (Komplex V) nutzt dieses Potential für die endergonische Phosphorylierung von ADP zu ATP (Mitchel, 1961; Hatefi, 1985; Nicholls und Ferguson, 1992).

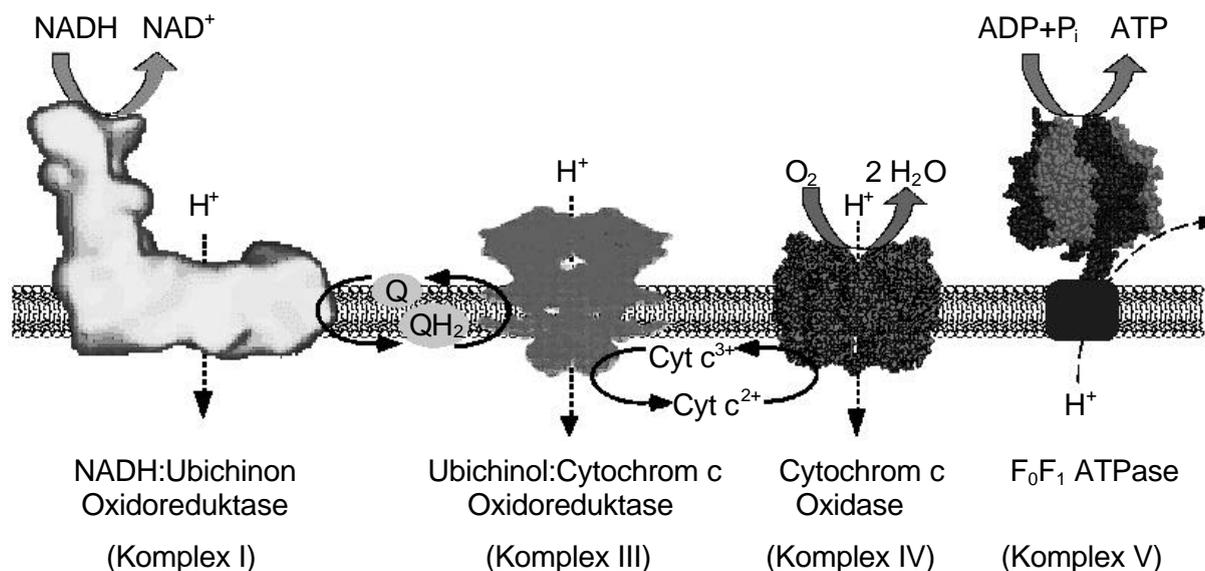


Abb. 1: Das mitochondriale System der Oxidativen Phosphorylierung: Dargestellt sind eine Rekonstruktion von Komplex I aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Kugelmodelle der Kristallstrukturen der Komplexe III, IV und V. Der Membranteil des Komplex V ist aufgrund fehlender Strukturdaten als Quadrat gezeichnet. Q, Ubichinon; QH₂, Ubichinol; Cyt c, Cytochrom c.

In Eukaryoten sind alle vier Enzymkomplexe dualen genetischen Ursprungs. Die meisten Untereinheiten werden im Kern der Zelle kodiert, an den cytosolischen

Ribosomen translatiert und in die Mitochondrien transportiert. Die genetische Information für sehr hydrophobe, membranständige Untereinheiten befindet sich dagegen auf der mitochondrialen DNA. Ihre Gene werden in den Mitochondrien transkribiert und translatiert. Cytosolische und mitochondriale Untereinheiten werden in der inneren Mitochondrienmembran zu den Atmungskettenkomplexen assembliert (Attardi und Schatz, 1988).

Pilze und höhere Pflanzen besitzen neben den energieumwandelnden Atmungskettenkomplexen nicht-protonenpumpende Enzyme, die Reaktionen der Zellatmung übernehmen können ohne zum Aufbau des Protonengradienten beizutragen. Bei ihnen handelt es sich um zwei bis drei alternative NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen und eine alternative Ubichinol Oxidase (Schwitzguébel, 1982; Douce, 1989; de Vries, 1988; Marres *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; Luttik *et al.*, 1998; Small, 1998). Da die Affinitäten dieser Enzyme zu NADH bzw. Ubichinol niedriger sind als die der Atmungskettenkomplexe, werden sie als Überlaufventile für überschüssige Redoxäquivalente angesehen (Siedow, 1990). Sie erlauben die experimentelle genetische Inaktivierung von Atmungskettenkomplexen, da sie den Pilzen das Überleben ohne diese Komplexe ermöglichen.

Durch Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse ist es in den letzten Jahren gelungen die dreidimensionale Feinstruktur des Komplex III aus Rinderherz (Yu *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1997), Hefe (Lange und Hunte, 2002) und Huhn (Zhang *et al.*, 1998), des Komplex IV aus *Paracoccus denitrificans* (Iwata *et al.*, 1995) und Rinderherz (Tsukihara *et al.*, 1995), sowie des peripheren F₁-Teils des Komplex V aus Rinderherz (Abrahams *et al.*, 1994) zu bestimmen. Aufgrund dieser Strukturdaten wurde es möglich, die Elektronen- und Protonenwege detailliert zu untersuchen (Pomès *et al.*, 1998; Mills, 1998; Yu *et al.*, 1999). Dagegen ist es noch nicht gelungen, Komplex I zu kristallisieren. Dreidimensionale Strukturdaten dieses Enzymkomplexes basieren ausschließlich auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die die Auflösung auf 30 Å begrenzen (Guénebaut *et al.*, 1998).

2.2 Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)

Komplex I ist der größte Enzymkomplex der Atmungskette. Er koppelt die exergonische Übertragung der zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon mit der endergonischen Translokation von vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran nach folgender Gleichung.



In dieser Gleichung stehen die Indizes I für die negativ geladene Innenseite der Membran und A für die positiv geladene Außenseite der Membran. Q_0 steht für Ubichinon-10 und Q_{10}H_2 für Ubichinol-10.

Nahe verwandte Formen von Komplex I kommen in Prokaryoten und Eukaryoten vor. Der prokaryotische Komplex I besitzt eine molare Masse von 550 kDa und besteht aus 14 Untereinheiten. Er stellt eine strukturelle Minimalform des Komplexes dar. Der mitochondriale Komplex I umfaßt zusätzlich zu den Homologen des prokaryotischen Komplexes etwa 25 weitere Untereinheiten und besitzt eine Molmasse von ca. 1 MDa. Am Besten untersucht sind der mitochondriale Komplex I aus *Bos taurus* (Walker, 1992) und *Neurospora crassa* (Schulte und Weiss, 1997) und der bakterielle Komplex I aus *Escherichia coli* (Leif *et al.*, 1995) und *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1993). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Komplex I Präparationen aus *N. crassa* und *E. coli* zeigen eine L-förmige Struktur (Abb. 1) mit zwei ca. 25 nm langen Teilen (Hofhaus *et al.*, 1991; Guénebaut *et al.*, 1997). Sie stehen etwa im rechten Winkel aufeinander und werden aufgrund ihrer Lage als Membranarm und peripherer Arm bezeichnet. Das gezielte Ausschalten der Gene einzelner Untereinheiten und Puls-Chase-Experimente in *N. crassa* haben gezeigt, daß beide Arme unabhängig voneinander assembliert und anschließend zum Gesamtkomplex zusammengefügt werden (Tuschen *et al.*, 1990; Nehls *et al.*, 1992; Schulte und Weiss, 1995).

Alle bisher bekannten Redoxgruppen des Komplex I liegen auf Untereinheiten des peripheren Arm. Es sind ein Flavinmononucleotid (FMN) und bis zu sieben Eisen-Schwefel-Zentren (FeS-Zentren; Wang *et al.*, 1991). Die 51 kDa Untereinheit bildet

die Bindestellen für NADH und FMN, und für das FeS-Zentrum N-3 (Chen und Guillory, 1981; Deng *et al.*, 1990; Mathews, 1991; Fecke *et al.*, 1994). Die FeS-Zentren N-1 und N-4 werden auf der 24 kDa bzw. der 78 kDa Untereinheit vermutet (Wang *et al.*, 1991). Das vierte ESR-spektroskopisch nachweisbare FeS-Zentrum N-2 befindet sich auf einer ca. 25 kDa großen Untereinheit (PSST in *B. taurus*; Pilkington *et al.*, 1993) an der Grenze zwischen peripheren und membranintegralen Arm. Zwei ESR-spektroskopisch nicht nachweisbare FeS-Zentren (N-6a und N-6b) befinden sich auf einer 21,3 kDa großen Untereinheit des peripheren Arms (TYKY in *B. taurus*) mit einem hochkonservierten Sequenzbindemotiv eines 8Fe-Ferredoxin (Rasmussen *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 1997). Auf bekannten 8Fe-Ferredoxinen können zwei FeS-Zentren lokalisiert sein, die magnetisch gekoppelt und deshalb ESR-spektroskopisch nicht nachweisbar sind. (Mathews *et al.*, 1974). Das Vorhandensein weiterer konservierter Bindemotive für FeS-Zentren (Preis *et al.*, 1991; Azevedo *et al.*, 1994) und der hohe Gehalt an Eisen und säurelabilem Sulfid (Friedrich *et al.*, 1989; Finel *et al.*, 1992; Leif *et al.*, 1995) deuten auf zusätzliche FeS-Zentren in Komplex I hin. Der Membranarm enthält die Ubichinon-Bindestelle, die der mitochondrial kodierten ND1-Untereinheit zugeordnet wird (Earley *et al.*, 1987; Friedrich *et al.*, 1993). Über die Funktion der anderen Untereinheiten des Membranarms ist noch wenig bekannt.

Auf der Grundlage der bekannten Redoxgruppen (Weiss und Friedrich, 1991) wird folgender Elektronenweg durch den Komplex I angenommen: Im proximalen Abschnitt des Elektronenweges werden zwei Elektronen des NADH (Mittenredoxpotential $E_{m,7} = -320$ mV) auf das FMN ($E_{m,7} = -319$ mV) übertragen und dieses zu FMNH₂ reduziert. Von dort fließen sie nacheinander über die FeS-Zentren N-1, N-3 und N-4 ($E_{m,7} = -300$ bis -270 mV) auf die Zentren N-6a und N-6b ($E_{m,7} = -270$ mV). Der weitere Elektronenweg führt zum Zentrum N-2 ($E_{m,7} = -160$ mV; Ingledew und Ohnishi, 1980). Neben dem linearen Elektronenweg wird im proximalen Teil auch ein verzweigter Elektronenweg diskutiert (Rasmussen, 2000). Im distalen Abschnitt des Elektronenweges gelangen die Elektronen auf das Substrat Ubichinon ($E_{m,7} = +60$ mV). Aufgrund der großen Potentialspanne zwischen FeS-Zentrum N-2 und Ubichinon wird eine zusätzliche Redoxgruppe angenommen (Gutman *et al.*, 1972). Die Potentialdifferenz zwischen dem FeS-Zentrum N-2 und Ubichinon würde sonst eine Umkehr des Elektronenflusses nicht zulassen. Aus unserem Institut gibt es

UV-Vis-spektroskopische Hinweise auf eine solche, strukturell noch nicht bestimmte Redoxgruppe mit einem Redoxpotential von -80 mV (Schulte *et al.*, 1998; Abelmann, 2000; Friedrich *et al.*, 2000). Die Kopplung des Elektronentransfer mit der Protonentranslokation ist noch unverstanden. Ein Arbeitsmodell zum Elektronenweg durch den Komplex I ist in Abb. 2 dargestellt.

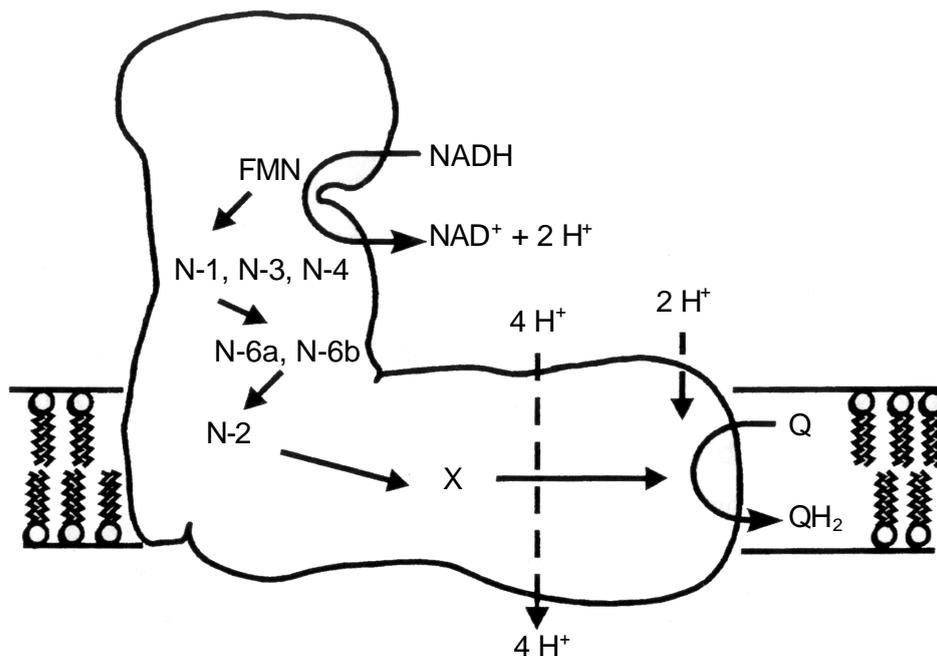


Abb. 2: Modell des Elektronenwegs durch Komplex I: Dieses Modell zeigt die bekannten und nach ihrem Potential geordneten Redoxgruppen. Die durchgezogenen Pfeile symbolisieren den Elektronenweg, die gestrichelten Pfeile deuten die Protonentranslokation an.

2.3 Stabile Fragmente und Assemblierungsintermediate von Komplex I

Sequenzvergleiche von Komplex I Untereinheiten mit löslichen und membranständigen Hydrogenasen und Membrantransportproteinen zeigten, daß Komplex I modular aufgebaut ist (Friedrich und Weiss, 1997). Um die Struktur und Funktion der einzelnen Module besser untersuchen zu können, wurden Teile des Komplexes isoliert und charakterisiert. Grundsätzlich stehen zwei Wege zur

Verfügung, um solche Teile zu erhalten. Zum Einen kann der Gesamtkomplex isoliert und durch anschließende Behandlung mit Detergentien oder chaotropen Salzen zerlegt werden. Die Fragmente werden dann getrennt und unabhängig von einander untersucht. Ein anderer Ansatz besteht in der Inaktivierung von Genen von Komplex I-Untereinheiten oder der selektiven Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese, was zum unvollständigem Zusammenbau des Komplexes und zur Anhäufung von Intermediaten der Assemblierung führt.

Der Rinderherz-Komplex I lässt sich durch Behandlung mit Perchlorat in ein hydrophobes und zwei wasserlösliche Fragmente spalten (Hatefi, 1985; Ragan, 1987). In einem der wasserlöslichen Fragmente wurde die NADH-Bindestelle und das FMN identifiziert (Ragan *et al.*, 1982). Durch Spaltung mit β -Mercaptoethanol und N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO) wurde aus dem Rinderherz-Komplex I ein wasserlösliches Fragment mit dem FMN und den ESR-spektroskopisch sichtbaren FeS-Zentren sowie ein hydrophobes Fragment erhalten. (Finel *et al.*, 1992). Durch Behandlung des wasserlöslichen Fragmentes mit Kaliumphosphat und Laurylsarcosin konnten weitere Untereinheiten abgespalten werden (Finel *et al.*, 1994). Der Komplex I aus *E. coli* wurde durch Erhöhung des pH-Wertes in ein wasserlösliches NADH-Dehydrogenase Fragment aus drei Untereinheiten mit der NADH Bindestelle, dem FMN und den FeS-Zentren N-1, N-3, und N-4 und ein hydrophobes Ubichinon-Reduktase Fragment aus 10 Untereinheiten mit den FeS-Zentren N-6a, N-6b und N-2 sowie der Ubichinon-Bindestelle gespalten (Böttcher *et al.*, 2002, Hesterberg, 2002). Das wasserlösliche NADH-Dehydrogenasefragment konnte auch durch Überexpression der entsprechenden Gengruppe und anschließende chromatographische Aufreinigung erhalten werden (Braun *et al.*, 1998, Bungert *et al.*, 1999).

Versetzt man *N. crassa* mit Chloramphenicol, einem Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese, so wird die Synthese der 7 mitochondrial kodierten Untereinheiten stark eingeschränkt und der Pilz akkumuliert den peripheren Arm als Assemblierungsintermediat (Friedrich *et al.*, 1989).

Die Assemblierung des Komplex I kann auch durch Geninaktivierung blockiert werden. Schaltet man Gene von Untereinheiten des Membranarms aus, so

beeinflussen diese die Bildung des peripheren Arms nicht, und umgekehrt. Eine Ausnahme stellt die ACP-Untereinheit (*nuo9,6*) dar. Ihre Inaktivierung beeinträchtigt die Assemblierung sowohl des peripheren Arms als auch des Membranarms (Schneider *et al.*, 1995). Eine Aufstellung der Deletionen, die zur Isolation von teilassemblierten Subkomplexen führten, sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Mutanten *nuo20,9*, *nuo21,3* und *nuo78* sind für diese Arbeit von besonderem Interesse und werden im Anschluß beschrieben.

Tab. 1: Assemblierung von Subkomplexen des Komplex I nach Deletion von Untereinheiten: *nuo* steht für NADH:Ubichinon Qxidoreduktase und die Zahl für die Molmasse der Untereinheit.

Mutante	Lokalisation der Untereinheit	Nachweisbare Subkomplexe	Literatur
<i>nuo78</i>	peripherer Arm	Membranarm, kleine Teile des peripheren Arms	Harkness <i>et al.</i> , 1995; Wobschall, Dissertation 1997
<i>nuo49</i>	peripherer Arm	Membranarm	Schneider Dissertation 1994
<i>nuo29,9</i>	peripherer Arm	Membranarm	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo21,3a</i>	Membranarm	peripherer Arm, große Membranarmvorstufe, kleine Membranarmvorstufe ohne 21,3 kDa Untereinheit	Nehls <i>et al.</i> , 1992
<i>nuo20,9</i>	Membranarm	peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Küffner <i>et al.</i> , 1998
<i>nuo12,3</i>	Membranarm	peripherer Arm, Membranarm ohne 12,3 kDa Untereinheit	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo10,4</i>	Membranarm	peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Krüll, Dissertation 1995
<i>nuo9,6</i>	peripherer Arm	unvollständiger Membranarm	Schneider <i>et al.</i> , 1995

Die Assemblierung des Membranarms erfolgt über zwei vorgefertigte Subkomplexe, die sogenannte kleine und große Membranarmvorstufe (Schulte *et al.*, 1994). Schaltet man das Gen der 20,9 kDa Untereinheit aus (Krüll, 1995), so reichert sich in den Mitochondrien nur die kleine Membranarmvorstufe aus 7 kernkodierten und 2 mitochondrial kodierten Untereinheiten an. Eine Zerstörung des Gens der 21,3 kDa Untereinheit (Nehls, 1992) führt dagegen zu einer Assemblierung der großen

Membranarmvorstufe, aus 6 kernkodierten und 5 mitochondrial kodierten Untereinheiten. In beiden Mutanten wird der periphere Arm gebildet, während der Membranarm nicht über die beschriebenen Vorstufen hinaus aufgebaut wird. Eine Inaktivierung des Gens der 78 kDa Untereinheit des peripheren Arms (Wobschall, 1997) führt zu einem Verlust des peripheren Arms, während die Bildung des Membranarms ungestört bleibt.

2.4 *Neurospora crassa* - ein Modellorganismus

N. crassa ist ein Hyphenpilz, der weite Verbreitung als eukaryotischer Modellorganismus gefunden hat. Seine natürlichen Habitate sind tropische und subtropische Regionen. In Mitteleuropa tritt er gelegentlich als roter Brotschimmel auf. Er lässt sich leicht und schnell anziehen und benötigt neben Kohlenstoff- und Stickstoffquellen nur wenige Mineralsalze und Biotin zu seiner Kultivierung (Davis und de Serres, 1970). Ein großer Teil der Biologie von *N. crassa* ist verstanden und der größte Teil seines Genoms sequenziert. Man gelangt schnell an große Mengen Hyphen deren Mitochondrien gut zugänglich sind. Aus ihnen kann der Komplex I durch ausgearbeitete Methoden isoliert werden (Schulte *et al.*, 1998). Zusätzlich besteht die Möglichkeit der gentechnischen Veränderung von Untereinheiten des Komplexes. Die oben genannte alternative NADH:Ubichinon Oxidoreduktase ermöglicht es *N. crassa* auch ohne Komplex I zu überleben.

Als Vertreter der Ascomyceten bildet *N. crassa* schlauchförmige Sporangien, die als Ascus bezeichnet werden. Das vegetative Mycel besteht aus verzweigten, septierten multinuklearen Hyphen, deren zentraler Porus einen Austausch von Zellorganellen ermöglicht. Die durch Septen abgegrenzten Cytoplasmabereiche enthalten durchschnittlich 2-3 haploide Kerne. *N. crassa* ist ein monözischer aber selbstinkompatibler Pilz mit den Paarungstypen A und a. Die vegetative Vermehrung des Pilzes findet durch Ausbildung mehrkerniger Makrokonidien statt (Huebschmann, 1952). In einer späteren Entwicklungsphase kommt es zur Ausbildung von einkernigen Mikrokonidien.

Das Genom von *N. crassa* besteht aus 7 Chromosomen (Orbach *et al.*, 1988). Seine momentan durchgeführte Sequenzierung ist fast abgeschlossen (Schulte *et al.*, 2002). Es sind etwa 700 Mutanten des Pilzes bekannt (Perkins *et al.*, 1982), und es ist möglich Pilzprotoplasten mit heterologer DNA zu transformieren (Case *et al.*, 1979). Da in der Regel nur ein Kern der mehrkernigen Protoplastenzellen transformiert wird, werden die heterokaryoten Transformanten mit den Ausgangsstämmen gekreuzt, um durch Untersuchung der Ascosporen genetisch einheitliche Stämme zu erhalten. In *N. crassa* und anderen filamentösen Pilzen konnten bisher keine autonom replizierenden Plasmide gefunden werden (Yang und Griffiths, 1993; Arganoza *et al.*, 1994; Griffiths *et al.*, 1995). Es gibt synthetische, cytoplasmatische Plasmide für einige Vertreter dieser Pilze (Lemke und Peng, 1995), jedoch nicht für *N. crassa*. Daher ist eine stabile Transformation nur durch DNA-Integration in das Genom möglich.

Prinzipiell sind drei Integrationstypen zu unterscheiden, die ungekoppelte (ektopische) Integration als Folge eines einfachen Crossovers in einem nicht homologen Bereich des Genoms, die gekoppelte Insertion durch homologe Integration der fremden DNA durch einfaches Crossover, und der Austausch des Originalgens gegen die Fremdkopie durch homologe Rekombination mit doppeltem Crossover bzw. gekoppelter Insertion mit anschließender Deletion. Bei *N. crassa* erfolgt die Integration in das Genom vor allem ektopisch an beliebiger Stelle (Fincham, 1989) und nur gelegentlich an homologen Bereichen durch doppeltes Crossover (Hinnen *et al.*, 1978). Die gekoppelte Insertion kommt sehr selten vor.

Für *N. crassa* sind verschiedene selektionierbare Transformationsmarker entwickelt worden (Fincham, 1989; Lemke und Peng, 1995). Das NADP Glutamat Dehydrogenase-Gen (am-Gen) oder das katabole Dehydroquinase-Gen (qa2-Gen) werden zur Komplementation auxotropher Mutanten verwendet (Kinsey und Rambosek, 1984; Case *et al.*, 1979). Das homologe, mutierte β -Tubuli-Gen (*ben¹*) kann als dominanter Selektionsmarker verwendet werden. Heterologe dominante Marker sind nur in geringer Zahl verfügbar. Oft wird das Gen für die bakterielle Hygromycin B Phosphotransferase (*hph*-Gen aus *Streptomyces hygrosopicus*) eingesetzt (Staben *et al.*, 1989). Das Aminoglycosidantibiotikum Hygromycin B hemmt die Proteinsynthese in pro- und eukaryotischen Zellen (Gonzales *et al.*, 1978;

Singh *et al.*, 1979). Als weiterer heterologer, dominanter Marker steht das bakterielle *bar*-Gen aus *S. hygrosopicus* zur Verfügung. Hierbei wird die Resistenz gegen das Herbizid BASTA mit dem Wirkstoff Phosphinothricin (PPT, Glufosinat Ammonium, Bayer *et al.*, 1972) bzw. gegen das mikrobielle Stoffwechselprodukt Bialaphos (PPT-Ala-Ala) übermittelt.

Die Fähigkeit von *N. crassa* DNA homolog und heterolog in sein Genom zu integrieren eröffnet in Kombination mit den etablierten Selektionsmarkern ein breites Spektrum an Möglichkeiten zur gentechnischen Manipulation des Komplex I. Diese Möglichkeiten wurden in unserem Institut angewandt und führten schon zu Erkenntnissen über den modularen Aufbau des Komplexes und die Bedeutung einzelner Untereinheiten für seine Assemblierung (Schulte und Weiss, 1995).

2.5 Kristallisation von Proteinen

Für die Strukturbestimmung von Proteinen auf atomarer Ebene kommen zwei Verfahren zum Einsatz, die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie hochkonzentrierter Proteinlösungen und die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen. Die NMR-Spektroskopie ist heute nur bei Proteinen bis zu einer Größe von 50 kDa anwendbar und somit für große Proteine oder Proteinkomplexe wie Komplex I nicht geeignet. Bei der Röntgenstrukturanalyse gibt es diese große Einschränkung nicht, jedoch werden Proteinkristalle ausreichender Qualität und Größe benötigt. Mit Synchrotron-Strahlenquellen können heute Kristalle von 50 μm Kantenlänge vermessen werden. Zur Zuordnung der gemessenen Elektronendichten zu den einzelnen Aminosäureseitenketten müssen die Kristalle bis zu einer Auflösung von etwa 3 \AA beugen.

Proteinkristalle werden durch langsame Überführung einer Proteinlösung in einen übersättigten Zustand erzeugt. Übersättigung wird durch Variation der Temperatur, des pH-Wertes, der Protein- oder der Präzipitantenkonzentration erreicht. Salze, organische Lösungsmittel und Polymere finden als Präzipitanten Verwendung. Während Salze um die Hydrathülle der solvatisierten Proteine konkurrieren, senkt die Zugabe von organischen Lösungsmitteln die Dielektrizitätskonstante. Polymere, wie

Polyethylenglykol (PEG), verbinden beide Eigenschaften. Ein Phasendiagramm (Abb. 3) verdeutlicht die Zusammenhänge.

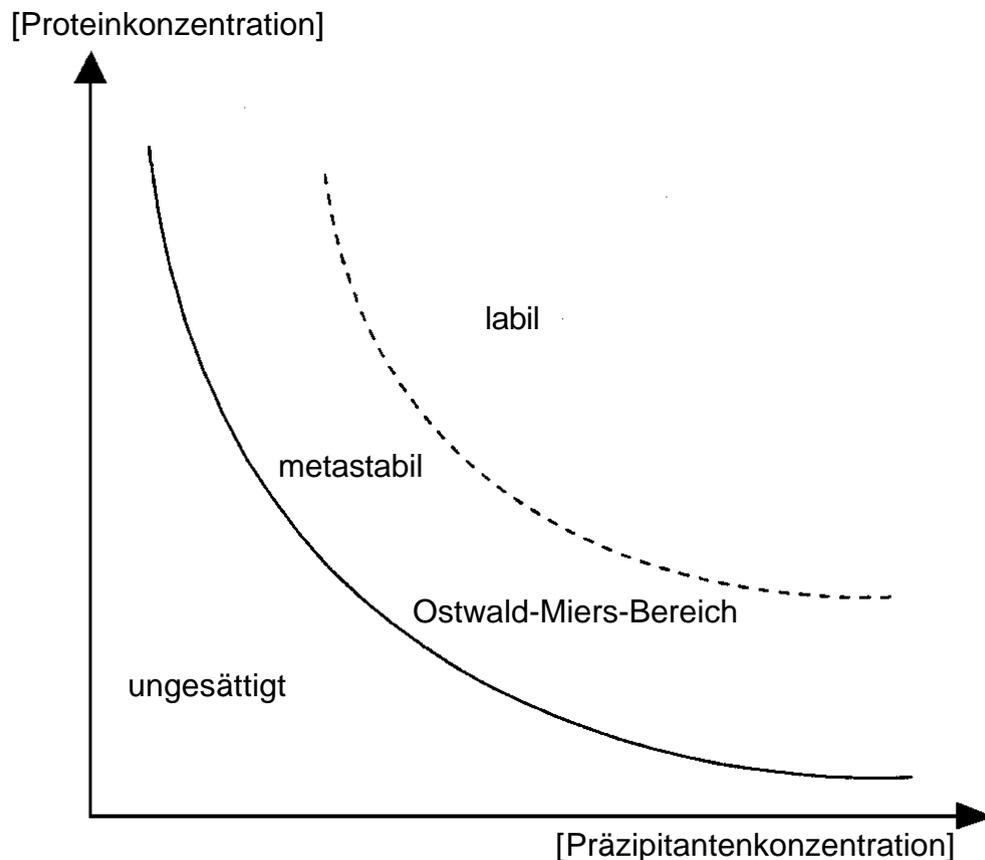


Abb. 3: Konzentrationsdiagramm zur Veranschaulichung der Löslichkeit des Proteins in Abhängigkeit von der Protein- und Präzipitantenkonzentration. — Grenze der Löslichkeit, - - - Ende des Ostwald-Miers-Bereiches (weitere Erläuterungen im Text.)

Bei Kristallisationsansätzen werden Protein und Präzipitant so miteinander vermischt, daß sich die anfängliche Proteinkonzentration in der ungesättigten Region in der Nähe der metastabilen Region befindet. Durch Wasserentzug tritt die Lösung in den metastabilen Ostwald-Miers-Bereich ein. Da sich Kristallkeime erst in der labilen Region bilden, aber idealer Weise nur wenige Keime gebildet werden sollen, darf die Lösung die Phasengrenze zum labilen Bereich nur kurz überschreiten (Ducruix und Giege, 1992). Durch des Kristallwachstum sinkt die Proteinkonzentration in der Lösung, und die metastabile Phase wird wieder erreicht. Die entstandenen Keime können hier weiter wachsen, ohne daß neue Keime gebildet werden. Verweilt die Lösung zu lang im labilen Bereich, so bilden sich viele sehr kleine oder polykristalline

Kristalle. Gerät die Proteinlösung zu schnell in den labilen Bereich, fällt das Protein als amorphes Präzipitat aus. Somit entscheidet das Verhältnis zwischen Keimbildungs- und Wachstumsgeschwindigkeit, ob es zur Kristallisation des Proteins kommt.

Als Standardmethode der Kristallzucht von Proteinen wurde die Gasphasendiffusionsmethode angewendet. (Abb. 4).

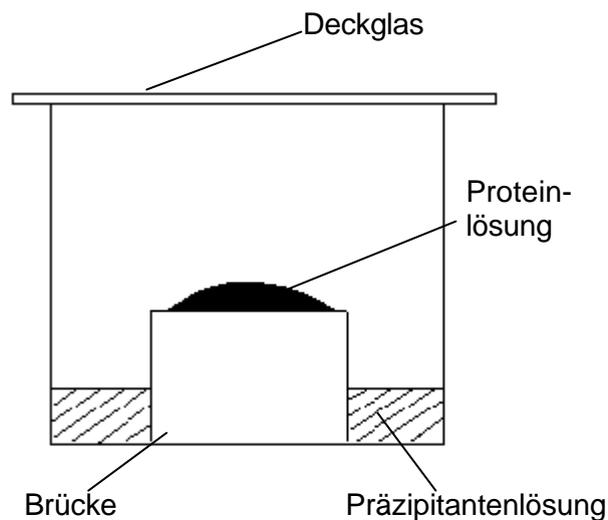


Abb. 4: Kristallisationsansatz mit der Gasphasendiffusionsmethode

Bei der Gasphasendiffusionsmethode werden Protein- und Präzipitantenlösung auf einer Brücke vermischt und stehen mit dem Präzipitantenreservoir über die Gasphase in Verbindung. Der Proteinlösung wird durch die Präzipitantenlösung so lange Wasser entzogen, bis sich beide Lösungen im Gleichgewicht befinden. Das Gleichgewicht liegt idealer Weise im Ostwald-Miers-Bereich.

Neben Temperatur, pH-Wert, Protein- und Präzipitantenkonzentration kommen der Reinheit und Homogenität des isolierten Proteins große Bedeutung zu. Besonders die Homogenität der Oberflächen der Proteine ist direkt von der Isolationsmethode abhängig. Sie kann durch jeden zusätzlichen Reinigungsschritt und jede Adsorption an eine Oberfläche negativ beeinflusst werden. Schnelle Methoden mit wenigen Schritten sind daher erstrebenswert. Bei der Kristallisation von Proteinen mit membranständigen oder transmembranen Anteilen kommt als weiterer Parameter das verwendete Detergens hinzu. Je nach Art des Detergens und seinem

Mischungsverhältnis mit dem Puffer bilden sich verschiedene Phasen, die die Kristallisation erschweren können. Aufgrund der Größe, der Komplexität und der Notwendigkeit der Verwendung von Detergentien stellt die Kristallisation des Membranarms von Komplex I eine große Herausforderung dar.

2.6 Affinitätschromatographie mit Tag-Peptiden

Eine verbreitete Methode, um ein Protein selektiv und in wenigen Schritten aufzureinigen, ist die Affinitätschromatographie. Bei vielen Enzymen kann dies durch immobilisierte Substratanaloga realisiert werden. Ist die Affinität zu Substratanaloga zu niedrig oder sind hochspezifische Säulenmaterialien nicht verfügbar, setzt man Affinitäts-Tags ein. Es handelt sich dabei um kleine Aminosäureoligomere, die gentechnisch an dem zu isolierenden Protein angebracht werden. Hierzu wird das Gen des Proteins um die für den Tag kodierende Sequenz erweitert und das rekombinante Gen exprimiert. Zwei gängige Systeme hierfür stellen der Histidin-Tag (His-Tag) und das Strep-Tag II/Strep Tactin System (Strep-II Tag) dar.

Der His-Tag besteht aus einem mindestens 6 Histidine langen Peptid, das an den C- oder N-Terminus angefügt werden kann. Als Bindungspartner dient ein chelatisierendes Säulenmaterial, das zuvor mit Nickel- oder Cobaltionen beladen wurde. Über die freien Elektronenpaare können die Stickstoffatome in den Histidinen koordinativ an die immobilisierten Metallionen binden. Die Elution erfolgt durch Zugabe von Imidazol, das um die freien Bindungsplätze der Metallionen konkurriert. Verfahren, bei denen der Tag an Metallionen adsorbiert wird, bezeichnet man als immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC).

Ein anderes, häufig verwendetes System basiert auf der hohen Affinität ($K_D = 10^{-5}$ M) von Avidin bzw. Streptavidin zu D-Biotin (Voss und Skerra, 1997). Avidin ist ein aus vier Untereinheiten bestehendes Glycoprotein, das zum antibakteriellen System des Hühnereis gehört. Es wirkt durch Entzug des Biotins aus seiner Umgebung antibiotisch. In dem Strep-II Tag System stellt der trägergebundene Ligand, das Strep Tactin, ein molekulares Abbild des Avidins dar. Die kurze Peptidsequenz aus 8 Aminosäuren trägt das Bindungsmuster des Biotins und wird selektiv adsorbiert

(Schmidt *et al.*, 1996). Die Elution erfolgt mit Desthiobiotin, einer dem Biotin sehr ähnlichen Verbindung, die sich in anschließenden Waschschritten wieder von der Säule trennen läßt. Der Strep-II Tag wurde in unserem Institut schon zur Reinigung des NADH-Dehydrogenasefragments des Komplex I aus *E. coli* eingesetzt (Bungert, 1999).

2.7 Thema der Arbeit

Der Mechanismus der protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase ist aufgrund fehlender Strukturdaten noch weitgehend unverstanden. Die bisher bekannte Topologie des Komplex I beruht auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Einzelpartikeln und zweidimensionalen Membrankristallen, deren Auflösung jedoch auf etwa 30 Å begrenzt ist. Weder die Lage der einzelnen Untereinheiten ist bekannt, noch die Anordnung der prostetischen Gruppen. Als Grundlage für die Aufklärung des Mechanismus von Elektronen- und Protonentransport ist die atomar aufgelöste Struktur notwendig, die nur durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden kann. Dazu ist es erforderlich, Komplex I oder Teile des Komplexes zu kristallisieren.

Nach bisher ergebnislosen Bemühungen vieler Gruppen Kristalle von Komplex I zu züchten, wird in unserem Institut versucht, die beiden Arme des Komplex I getrennt zu kristallisieren. Ein Ziel dieser Arbeit war die Kristallisation des durch Spaltung aus Komplex I gewonnen Membranarms. Zudem sollte parallel zu der etablierten Präparationsmethode für den Membranarm die Isolation mit Hilfe der Tag-Chromatographie ausgearbeitet werden. Ein mit Tag-Chromatographie isoliertes Fusionsprotein sollte konformativ einheitlich und in großen Mengen verfügbar sein, da es durch Affinitätschromatographie in wenigen Schritten schnell isolierbar ist. Durch das Anbringen von Histidin und Strep-II Tags an die 20,9 und 21,3 kDa Untereinheiten in den Doppelmutanten *nuo20,9/78* und *nuo21,3/78* sollte ein mit Tag versehener Membranarm erzeugt werden. Heterologe Integration der Gene dieser modifizierten Untereinheiten in die Einfachmutanten *nuo20,9* und *nuo21,3* sollte zudem zur Erzeugung eines mit Tag versehenen Komplex I in den Mitochondrien

führen. Gleichzeitig wurde in unserem Institut an Projekten zum Anbringen von Tags an den peripheren Arm gearbeitet.

3. Material und Methoden

3.1 Lösungen und Medien

DNA- Probenpuffer:	50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 0,25 % (w/v) Xylencyanol, 10 mM Ethylendiaminteraessigsäure (EDTA), 445 mM Tris-Borat, pH 8,3
Elektrophorese- kammerpuffer:	50 mM Tris-Cl, 0,4 M Glycin, 0,1 % (w/v) (SDS)
Isolierungspuffer:	50 mM Tris-Ac, pH 7,0, 15 % Saccharose, 0,2 mM Phenylmethyl- -sulfonylfluorid (PMSF)
Kreuzungsmedium:	1 g/l KNO ₃ , 0,7 g/l K ₂ HPO ₄ , 0,5 g/l KH ₂ PO ₄ , 0,5 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0,1 g/l NaCl, 5 µg/l Biotin, 0,1 ml/l Spuren- elementlösung, 15 g/l Saccharose, 16 g/l Agar, optional 200 mg/l Hygromycin (Calbiochem) oder 800 mg/l Basta (Aventis CropScience S.A.)
Luria-Broth (LB):	10 g/l Casein-Hydrolysat (Peptone No. 140, Gibco), 5 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt (Gibco), optional 16 g/l Agar, optional Ampicillin (Endkonzentration 50 mg/l)
Lysepuffer:	50 mM EDTA, pH 8,0, 0,2 % SDS, 100 µg/ml RNase A
PBS:	130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM K ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBST:	PBS mit 0,1 % Tween-20
Protein- Probenpuffer (4x):	4 % (w/v) SDS, 1 M Saccharose, 0,2 % Bromphenolblau, 0,1 M Tris-Acetat, pH 6,8, 2,5 mM EDTA, 3,5 mM Dithioerythrit

SM:	100 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 10 mM MgSO ₄ , 0,01 % (w/v) Gelatine
SOB:	20 g/l Casein-Hydrolysat (Peptone No. 140, Gibco), 5 g/l Hefe- Extrakt (Gibco), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂
SOC:	wie SOB mit 20 mM Glucose
Spurenelement- lösung:	50 g/l Citronensäure·H ₂ O, 50 g/l ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,5 g/l MnSO ₄ , 10 g/l Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O, 2,5 g/l CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,5 g/l H ₃ BO ₄ , 0,5 g/l Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O (Davies und de Serres, 1970)
SSC:	150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0
STET:	0,1 M NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 5 % (w/v) Triton X-100
TBE:	89 mM Tris-Borat, pH 8,3, 1 mM EDTA
TE:	10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA
Transformations- medium:	20 ml/l 50 x Vogelsmedium, 5 µg/l Biotin, 182 g/l Sorbit, 0,1 ml/l Spurenelementlösung, 15 g/l L-Sorbose, 0,5 g/l Fructose, 0,5 g/l Glucose, 16 g/l Agar, optional 200 mg/l Hygromycin (Calbiochem) oder 800 mg/l Basta (Aventis CropScience S.A.)
Vogelsmedium:	3 g/l Na ₃ Citrat, 5 g/l KH ₂ PO ₄ , 2 g/l NH ₄ NO ₃ , 0,2 g/l MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0,1 g/l CaCl ₂ ·2H ₂ O, 5 µg/l Biotin, 0,1 ml/l Spurenelementlösung, 20 g/l Saccharose, optional 16 g/l Agar (Vogel, 1956) optional 200 mg/l Hygromycin (Calbiochem) oder 800 mg/l Basta (Aventis CropScience S.A.)

Western-Blot-Puffer:	25 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, Roth)-Cl, 200 mM Glycin, 15 % (v/v) Methanol, 0,05 % (w/v) Natrium-dodecylsulfat (SDS)
----------------------	---

3.2 Mikroorganismen, Vektoren, Oligonukleotide

Neurospora crassa:

Wildtyp SL 74 OR23 1a	(FGSC 987)
Mutante <i>nuo20,9</i>	(Krüll, 1995)
Mutante <i>nuo21,3</i>	(Nehls, 1992)
Mutante <i>nuo78</i>	(Wobschall, 1997)
Mutante <i>nuo78/20,9</i>	(Heimlich, 1999)

Escherichia coli:

DH5 α :	(Hanahan, 1983)
MB 406:	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)

Vektoren/Genbank:

pUC19	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pNGAN-2	(Krüll, 1995)
λ AD5	(Brunelli <i>et al.</i> , 1993)

Oligonucleotide:

EBFNot1	5'-TTGCGGCCGCATGTTCCGTTCCGCCGTCGTCC-3'
EBFNot2	5'-TTGCGGCCGCATGGCAGGGAGGTGAAGCTGAAAAGAG AGG-3'
Not-c20,9-A	5'-AAGCGGCCGCATGTCCAGCACTTCARCCCCG-3'
20,9-H-Tag	5'-TTGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGCATCGAC-3'
20,9-S-Tag	5'-TTGAATTCTCACTTTTTCGAACTGGGGATGAGACCAC-3'
Not-c21,3-A	5'-AAGCGGCCGCATGGCGGCTCAAGGGGACGACAC-3'
21,3-H-Tag	5'-TTGAATTCTCAATGATGATGATGATGATGCATAGCAGAA GCAACGTTGGGGTCCGCAGAGACGGGCTTGACC-3'

21,3-S-Tag 5'-TTGAATTCTCACTTTTTCGAACTGGGGATGAGACCAAGCA
GAAGCAACGTTGGGGTCCGCAGAGACGGGCTTGACC-3'

3.3 Bezugsquellen verwendeter Materialien

Alle Materialien wurden, wenn im Text nichts anderes erwähnt ist, von den Firmen Fluka, VWR, Riedel de Haen, Serva oder SIGMA bezogen. Für die enzymatischen Reaktionen wurden Enzyme der Firmen Roche Molecular Biochemicals, MBI Fermentas, New England Biolabs, Amersham Biosciences, Promega und SIGMA verwendet. Die verwendeten Antikörper stammten aus Institutsvorräten.

3.4 Anzucht der Mikroorganismen

N. crassa: Makrokonidien des Wildtyps wurden auf 3 ml Schrägagarröhrchen oder in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Vogelsmedium und 1,6 % Agar nach Animpfen mit Makrokonidien gewonnen. Die Kulturen wurden bei 26-28 °C für 3–4 Tage inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Mutanten wurden nach Zugabe von 200 mg/l Hygromycin (ICN) oder 800 mg/l Basta (Aventis CropScience S.A.) angezogen. Hyphen wuchsen in mit Preßluft belüfteten 8 l Batchkulturen mit Vogelsmedium (Weiss *et al.*, 1970; Davis und de Serres, 1970). Nach 28-34 h Wachstum bei 26-28 °C wurde das Myzel über einen 40 cm Büchnertrichter abfiltriert und mit 1–2 l Wasser gewaschen. Die abfiltrierten Hyphen wurden in Aluminiumfolie eingeschlagen und bis zur Weiterverarbeitung bei –70 °C gelagert.

E. coli: *E. coli* wurde in LB- bzw. LB-Ampicillin Medium auf einem Rotationsschüttler (180 UpM, Braun, Centromat) bei 37 °C über Nacht angezogen. 4 ml Kulturen wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft. Diese Übernachtskulturen dienten zur analytischen DNA-Isolierung, zum Animpfen größerer Kulturen oder zum Anlegen von Stammkulturen. Stammkulturen wurden in 50 % (v/v) Glycerin bei –70 °C gelagert.

3.5 Isolierung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Isolierung von Mitochondrienmembranen im präparativen Maßstab: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. 1,6 kg tiefgefrorene Hyphen wurden zerkleinert und in 10 l Isolierungspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 15 % Saccharose) in einem Küchenmixer (Braun) homogenisiert. Nach dem Zellaufschluß in einer Korundmühle (Weiss *et al.*, 1970) wurde in der Zellsuspension eine Endkonzentration von 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) eingestellt, um Proteasen zu inhibieren. Mit einer 10 min Zentrifugation bei 6000 g (4500 UpM, Rotor H6000A, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Du Pont Sorvall) wurden Zellkerne und Hyphenwände abgetrennt. Die Mitochondrien wurden in 80 min bei 14000 g (9000 UpM, Rotor A 6.9, Centrikon Kühlzentrifuge H-401 Kontron) sedimentiert. Das Mitochondriensediment wurde in 0,2 M Natriumphosphatpuffer pH 7,5 aufgenommen und in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator resuspendiert (insgesamt maximal 520 ml). Die Mitochondrien wurden in einer French Press (SLM Aminco) bei 1100 psi aufgeschlossen. Durch eine 20 min Zentrifugation bei 50000 g (20000 UpM, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) wurden nicht aufgeschlossene Mitochondrien abgetrennt. Die Mitochondrienmembranen wurden anschließend durch eine 2 h Zentrifugation bei 175000 g (50000 UpM, Rotor 60 Ti, Ultrazentrifuge L7-65, Beckmann) sedimentiert, zu 40 g (Feuchtmasse) portioniert und bei -70 °C aufbewahrt.

Isolierung des Komplex I: Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. In einem Teflon-in-Glas Homogenisator wurden 40 g Membransediment (Feuchtmasse) mit 80 ml 7,5 % (w/v) n-Octyl- β -D-glucopyranosid (Octylglycosid, Glycon Biotech) und 20 mM Tris-Cl, pH 8,0 homogenisiert und nicht solubilisiertes Protein mit einer 20 min Zentrifugation bei 50000 g (20000 UpM, Rotor A 8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mit 400 ml 20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 % (w/v) Octylglucosid äquilibrierte 530 ml Sephacryl S-300 Säule (5,5 cm x 22 cm; Amersham Biosciences) mit einer Flußgeschwindigkeit von 3 ml/min aufgetragen. Die Fraktionen bis zur halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt und anschließend durch eine Ultrafiltration (400 ml Ultrafiltrationskammer, Amicon) mit einer Diaflo XM-300 Membran (Amicon) auf 30 ml eingeengt. Die konzentrierte Lösung wurde auf sechs 40 ml Zuckergradienten aus 15 – 35 % Saccharose, 1–

0,1 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (Dodecylmaltosid, Calbiochem), 20 mM Tris-Cl, pH 8,0 aufgetragen und 17,5 h bei 150000 g (30000 UpM, Rotor 630 Ti, Sorvall, Ultrazentrifuge L7-65, Beckman) zentrifugiert. Die Gradienten wurden in 2 ml Portionen fraktioniert. Komplex I-haltige Fraktionen wurden durch Messung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt. Alle Fraktionen bis herab zur halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt (maximal 48 ml) und durch Ultrafiltration in einer 50 ml Kammer (Amicon) durch eine Diaflo XM-300 Membran (Amicon) auf 18 ml konzentriert. Um die Zuckerkonzentration zu verringern wurde zweimal mit dem gleichen Volumen 0,05 % Dodecylmaltosid, 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 aufgefüllt und erneut auf 18 ml konzentriert.

Isolierung des Membranarms von Komplex I: Die konzentrierte Lösung wurde durch Zugabe von festem KSCN auf 0,5 M eingestellt und auf sechs 40 ml Zuckergradienten aus 10 – 30 % (w/v) Saccharose, 50 mM Tris-Cl, pH 8, 0,05 % Dodecylmaltosid, 0,5 M KSCN gegeben. Nach 19 h Zentrifugation bei 150000 g (30000 UpM, Rotor 630 Ti, Sorvall, Ultrazentrifuge L7-65, Beckman) wurden die Gradienten in 1 ml Portionen unter gleichzeitiger Messung der Absorption bei 280 nm mit einem Diodenarray-Spektrometer mit Durchflußzelle und Lichtleiteroptik der Firma J& M Analysetechnik (Aalen) portioniert. Die Fraktionen des Membranarms mit mindestens halbmaximaler Absorption wurden als Gipfelfraktionen vereinigt. Die Fraktionen der Flanken der Gipfelfraktionen wurden als Randfraktionen gesammelt. Die Gipfelfraktionen (ca. 30 ml) wurden durch Ultrafiltration mittels einer Diaflo XM-300 Membran (Amicon) auf 5 ml konzentriert. Die konzentrierte Lösung wurde auf eine mit 270 ml 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid äquilibrierte 340 ml Sephacryl S-300 High Resolution Gelfiltrationssäule (2,6 cm x 64 cm, Amersham Biosciences) mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 12 ml/h gegeben. Die Fraktionen mit mindestens halbmaximaler Absorption wurden als Gipfelfraktionen vereinigt. Die Fraktionen der Flanken der Gipfelfraktionen wurden als Randfraktionen gesammelt. Die Gipfelfraktionen wurden zu 20 ml vereinigt und durch Ultrafiltration durch eine Diaflo XM-300 Membran (Amicon) auf 2– 3 ml konzentriert. Diese wurden mit einer Flußgeschwindigkeit von 6 ml/h auf eine mit 100 ml 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid äquilibrierte 120 ml Sephacryl S-300 High Resolution Gelfiltrationssäule (1,6 cm x 60 cm, Amersham Biosciences) gegeben. Es wurden, wie oben beschrieben, Gipfel und Randfraktionen bestimmt.

Die Gipfelfractionen (4 – 5 ml) wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in einer 10 ml Ultrafiltrationskammer (Amicon) auf 0,5 ml konzentriert. Um die Dodecylmaltosid- und die NaCl-Konzentration zu verringern, wurde mit 250 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0 aufgefüllt und anschließend auf 100 µl konzentriert. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden in einem Diodenarray-Spektrometer mit Durchflußzelle und Lichtleiteroptik der Firma J & M Analysetechnik (Aalen) 1,5 µl der Membranarmlösung zu 800 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid gegeben, die Absorption im Bereich von 250 – 600 nm gemessen und bei 280 nm ausgewertet. Die erhaltene Membranarmlösung wurde zur Kristallisation verwendet. Randfraktionen der nach der Kaliumrhodanid-Spaltung durchgeführten Gelfiltration wurden vereinigt, mittels Druckfiltration auf 2 – 3 ml konzentriert und anschließend auf eine mit 100 ml 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid äquilibrierte 120 ml Sephacryl S-300 High Resolution Gelfiltrationssäule (1,6 cm x 60 cm, Amersham Biosciences) gegeben. Je nach vorhandener Proteinkonzentration wurde die Membranarmlösung entweder direkt oder nach Konzentrierung durch Ultrafiltration für die Kristallisation eingesetzt.

Isolierung von Mitochondrien im analytischen Maßstab: 3 – 6 g Hyphen aus 250 ml Flüssigkultur (Vogels Medium mit 2 % Saccharose) wurden mit 5 ml Isolierungspuffer im Mörser gleichmäßig zerrieben. Zusammen mit 15 ml Glasperlen wurde die Masse in ein 70 ml-Kugelmühlengefäß gegeben, mit Isolierungspuffer auf 50 ml aufgefüllt und durch 10 s schütteln in der Kugelmühle aufgeschlossen. Der Überstand wurde 5 min bei 4 °C und 2500 g (5000 UpM, Rotor JS-13.1, Beckmann Kühlzentrifuge J2-21) zentrifugiert, um Zellreste abzutrennen. Eine erneute 20 min Zentrifugation bei 4 °C und 17000 g (13000 UpM, Rotor JS-13.1, Beckmann Kühlzentrifuge J2-21) sedimentierte die Mitochondrien. Nach Aufnahme in 300 µl zuckerfreiem Isolierungsmedium wurden die Mitochondrien bei –70 °C gelagert.

Isolierung von Komplex I im analytischen Maßstab: 300 µl Mitochondriensuspension wurden mit 180 µl 20 % Triton X-100 versetzt und auf 20 ml-Zuckergradienten (7,5 – 25 % Saccharose, 50 mM Tris-Acetat, pH7,5, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM PMSF) aufgetragen. Nach 16 h Zentrifugation bei 180000 g (Kontron Ultrazentrifuge T-2060, 36000 UpM, Rotor TST 41.14, 4 C) wurden die Gradienten in

200 µl Fraktionen aliquotiert und die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt. Der so gewonnene Komplex I ist für Western-Blot-Analysen geeignet.

3.6 Kristallisation des Membranarms von Komplex I

Für Kristallisationsversuche wurden die vereinigten, durch Ultrafiltration konzentrierten Gipffractionen eingesetzt. Eine Vorfällung in drei Stufen mit 1%, 2 % und 2,5 % Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000, VWR), 20 min Inkubation auf Eis und 5 min Zentrifugation bei 21000 g bei 4 °C (13000 UpM, Eppendorf Centrifuge 9417 R) trennte einen großen Teil des Proteins ab. Durch anschließendes Einstellen auf 2,5 – 2,8 % PEG 4000 wurde die Proteinkonzentration auf etwa ein Viertel der Ausgangskonzentration eingestellt. Nach der Fällung wurde die Konzentration der Proteinlösung in einem Diodenarray-Spektrometer mit Durchflußzelle und Lichtleiteroptik der Firma J& M Analysetechnik (Aalen) durch Vorlage von 800 µl 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid, Zugabe von 1,5 µl der Membranarmlösung und Messung der Absorbtion bei 280 nm bestimmt. Durch Zugabe von PEG 4000 in 0,2 % Schritten wurde die Proteinkonzentration weiter reduziert. Nach jeder Zugabe wurde das ausgefallene Protein wie oben abgetrennt, die Konzentration bestimmt und weitere 6µl zur Kristallisation abgenommen. Die Kristallisation mittels Gasphasendiffusion (sitzender Tropfen, Mc Pherson, 1990) wurde mit 6 µl einer 15 – 20 mg/ml Proteinlösung angesetzt. Die eingesetzten Polystyrene Brücken (CIS bio international) wurden mit jeweils 6 µl Proteinlösung über ein Reservoir von 1,5 ml Kristallisationspuffer aus 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 M NaCl, 0,05 % Dodecylmaltosid und 10 % (w/v) PEG 4000 in die Vertiefungen von Zellkulturplatten (Sarstedt) gestellt. Die Vertiefungen der Zellkulturplatten wurden mit Schliffett (mittelviskos, Bayer) und Glasplättchen gasdicht verschlossen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 6, 12 und 16 °C inkubiert.

3.7 Verschiedene proteinchemische Methoden

Strep-II Tag Affinitätschromatographie: Auf eine Säule (10 cm x 0,7 cm, Amersham Biosciences) mit 1 ml Strep-Taktin Gelbett (IBA) wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 0,3 ml/min 2 ml vereinigte Zuckergradientenfractionen der Isolierung von Komplex I im analytischen Maßstab aufgetragen. Nach Waschen mit 6 ml Waschpuffer (50 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM PMSF) wurde mit 1 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-Acetat, pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 0,2 mM PMSF, 2,5 mM Desthiobiotin) eluiert. Nach weiterem Waschen mit 6 ml Waschpuffer wurde mit 10 ml Regenerationspuffer (0,1 M Tris-Cl, pH 8,0, 0,15 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Hydroxyazophenylbenzoesäure) gewaschen bis die Säule tiefrot gefärbt war. Equilibriert wurde die Säule durch Spülen mit 10 ml Waschpuffer. Durchfluß und Eluat wurden auf 1 bis 2 ml fraktioniert und durch SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität: Die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität wurde photometrisch bei Raumtemperatur gemessen (Shimadzu UV 120-02 Spektralphotometer). Die zeitliche Extinktionsänderung bei 410 nm wurde nach Zugabe von 2-5 µl Probe zu 1 ml Testpuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 0,1 mM NADH) verfolgt. Der molare Extinktionskoeffizient von $K_3[Fe(CN)_6]$ beträgt $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Friedrich *et al.*, 1989).

Proteinbestimmung: Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Biuret-Methode (Beisenherz *et al.*, 1953) oder nach der Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur UV/Vis-spektroskopischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurden an einem Diodenarray Spektrometer (Spectrocord S10 UV-VIS, Zeiss) mit dem Programm ASPECT Spektren von 220 bis 800 nm bei Raumtemperatur mit einer Quarzglasküvette der Schichtdicke 0,2 bzw. 1 cm und dem jeweiligen Puffer als Referenz aufgenommen. Als apparenter molarer Extinktionskoeffizient von Komplex I bei 280 nm wurde $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Amling, 1996). Unter der vereinfachten Annahme der halben Masse des Membranarms bezüglich des Komplex I wurde bei 280 nm ein apparenter molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 0,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet

SDS-Gelelektrophorese: Es wurden je 50 µl Probe mit 20 µl Probenpuffer (2 % SDS, 0,5 M Saccharose, 0,1 % Bromphenolblau, 0,1 M Tris, 2,5 mM EDTA, 3,5 mM Dithioerythriol) versetzt, etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf ein diskontinuierliches Gel aus einem 3 % Sammel- und einem 16 % Trenngel (Laemmli, 1970) aufgetragen. Die Proteine wurden bei 180 V und 35 mA in 16 bis 18 h aufgetrennt. Der Kammerpuffer bestand aus 0,4 M Glycin, 0,05 M Tris, pH 8,3, 0,1 % SDS. Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel 2 h in 0,1 % Coomassie-Blau R 250, 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure gefärbt und anschließend in 12,5 % Isopropanol und 10 % Essigsäure über mehrere Stunden entfärbt. Zur Silberfärbung wurde das Gel 1 h in 10 % Essigsäure und 30 % Ethanol fixiert und 3 Mal 15 min in 30 % Ethanol gewaschen. Nach 1 min Inkubation in 0,8 mM Na-thiosulfat wurde das Gel zwei Mal 1 min mit Wasser gewaschen und 25 min in einer Lösung aus 12 mM Silbernitrat und 0,03 % Formaldehyd inkubiert. Anschließend wurde das Gel zwei Mal 1 min mit Wasser gewaschen und in einer Lösung aus 0,6 M Na-carbonat, 16 µM Na-thiosulfat und 0,02 % Formaldehyd so lange entwickelt, bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 10 ml konzentrierter Essigsäure gestoppt (Dunbar, 1987).

Western-Blot-Analyse: 10 - 100 µg Protein wurden durch SDS-Page aufgetrennt und in einer Tank-Blot-Apparatur in Blotpuffer auf Cellulosenitratmembranen (Schleicher & Schuell) bei 4 °C und 1 mA/cm² für 1 – 3 h transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde anschließend 1 h in PBS mit 3 % (w/v) Magermilchpulver und dann 5 min mit PBST gewaschen. Die Membran wurde 2–4 h mit den polyklonalen Antikörpern gegen einzelne Untereinheiten des Komplex I in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBST gewaschen und dann mit 1:3000 verdünnter Antikörper-gekoppelter Meerrettichperoxidase (Bio-Rad) 1 h geschüttelt. Nach Waschen mit PBS und 50 mM Na-phosphatpuffer pH 7,4 wurde die Membran mit 0,05 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin, 0,03 % (w/v) NiSO₄, 0,03 % (w/v) CoSO₄ und 0,1 % (v/v) H₂O₂ gefärbt (De Blas *et al.*, 1983).

3.8 Molekularbiologische Methoden

Isolierung von genomischer DNA aus *N. crassa*: 300 - 500 mg (Feuchtmasse) frisches, in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenes Mycel wurde fein gemörstert und in ein 2 ml Eppendorfgefäß mit 0,9 ml Lysepuffer versetzt und 5 min geschüttelt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit ca. einem Volumen äquilibriertem Phenol (0,1 M Tris-Cl, pH 8,0) und einmal mit Chloroform extrahiert. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt und mit einem am Brenner dünn ausgezogenen Glashaken gefischt. Nach Waschen in 70 % Ethanol und Abzentrifugieren (30 s, 14000 g Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) wurde das DNA-Sediment kurz an der Luft getrocknet und in 50 - 100 µl Wasser aufgenommen.

Isolierung von Plasmid DNA: Die Plasmidisolierung erfolgte in Anlehnung an die Boiling-Lysis-Methode (Holmes *et al.*, 1981). 4 ml LB/Amp-Medium wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml der Kultur wurden 30 s bei 14000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 500 µl kaltem STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl Lysozymlösung (40 mg/ml) wurde der Ansatz 5 min auf Eis, 2 min in kochendem Wasser und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl Isopropanol 10 min bei -20 °C gefällt, durch 15 min Zentrifugation bei 14000 g sedimentiert und mit 50 µl kaltem, 70 % Ethanol gewaschen. Die getrocknet DNA wurde in 30 µl TE-Puffer aufgenommen. Für die Plasmidisolierung im großen Maßstab wurden die Zellen aus einer 50 ml LB/Amp-Übernachtskultur geerntet, die DNA mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) isoliert und in 100 µl TE gelöst.

Vermehrung der cDNA-Bank λAD5: Die exprimierende *N. crassa* cDNA-Genbibliothek λAD5 wurde zur Infektion des *E. coli* Stamms MB 406 verwendet. Nach Anzucht über Nacht in 50 ml LB Medium mit 0,2 % Maltose wurde die Kultur durch 5 min Zentrifugation bei 5000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) sedimentiert und mit 10 mM MgSO₄ gewaschen. Das Sediment wurde in 10 mM MgSO₄ aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. 5 ml der Suspension wurden mit 2 · 10⁶ Phagen in 500 µl SM 30 min inkubiert, mit 100 ml LB Medium mit

0,2 % Maltose aufgenommen und bei 37 °C geschüttelt (180 rpm, Centromat, Braun) bis die OD₆₀₀ nach dem ersten Anstieg auf 0,4 gesunken war. Nach kurzer Inkubation mit 100 µl Chloroform wurde mit der Isolierung der Phagen-DNA fortgefahren.

Isolierung der Phagen-DNA: 100 ml mit Phagen infizierte Bakterienkultur wurden auf eine Endkonzentration von 0,9 M NaCl eingestellt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterienreste durch 10 min Zentrifugation bei 10000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abgetrennt. Nach Zugabe von 7,5 g PEG 6000 und 30 min Inkubation auf Eis wurden die präzipitierten Phagen 10 min bei 12000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert. Das Phagensediment wurde in 2,5 ml SM resuspendiert. Zur Entfernung bakterieller Nukleinsäuren wurden 50 µg RNase A und 12,5 µg Dnase I zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Aufschluß der Phagenköpfe wurden 2,5 ml 300 mM Tris-Cl, pH 9,0, 100 mM EDTA, 1,25 % SDS zugegeben und 10 min bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden 2,5 ml eiskaltes 3 M Kaliumacetat, pH 4,8 zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Gefällte Proteine wurden 10 min bei 12000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert. 7 ml des Überstandes wurden mit 5 ml Isopropanol versetzt und die DNA 5 min bei 12000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 150 µl TE gelöst.

DNA-Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR): Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde im GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) vorgenommen (Mullis und Faloona, 1987). Alle Reaktionen wurden als Heißstart-PCR (D'Aquila *et al.*, 1991) in einem Gesamtvolumen von 50 µl in dünnwandigen 200 µl Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt. Verwendet wurden der 10 x Expand Puffer und der Enzymmix des Expand™ High Fidelity PCR System (Roche). 50–200 ng DNA wurden als Matrize mit je 100 pmol Oligonukleotid-Primer in Expand Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ 5 min bei 95 °C denaturiert. Nach Abkühlung des Reaktionsgemisches auf die Annelingtemperatur wurden 0,75 µl Enzymmix zugegeben. Es wurden unter variierenden Bedingungen 20 - 30 Zyklen der Primerhybridisierung, DNA-Synthese und Denaturierung durchgeführt. Nach Beendigung der Zyklen wurde zur vollständigen DNA-Synthese 10 min bei 72 °C inkubiert. Die amplifizierte DNA wurde aus 0,8 % Agarosegel mit

dem QIAEX II Kit (Qiagen) gereinigt und isoliert. Als Farbstoff zur Markierung der DNA diente Gelstar (Biozym).

Restriktion von DNA: Ansätze von 0,2 - 2 µg Plasmid oder genomische DNA wurden in 15 µl Gesamtvolumen mit 5-10 U Restriktionsenzym für 1-4 h gespalten. Restriktionen im großen Maßstab wurden in 50 µl Gesamtvolumen mit 5–10 U Restriktionsenzym pro µg DNA für 1–4 h durchgeführt.

Southern-Blot-Analyse: Aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente auf Nylonmembranen (Biodyne B, Pall) mit 0,4 M NaOH über Nacht bei Raumtemperatur übertragen (Southern, 1975). Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran mit 250 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 7 % SDS, 2,5 mM EDTA 1 h bei 65 °C prähybridisiert. Nach Zugabe von hitzedenaturierter, radioaktiv markierter DNA-Sonde in 10 ml frischer Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen hybridisiert (Church, 1984). Die Nylonmembran wurde anschließend drei mal mit 2x SSC, 0,3 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Die autoradiographische Analyse wurde mit einer ImagePlate (BAS-IP MP 2025, Fuji) und dem elektronischen Bioanalyzer Fuji BAS 1800 durchgeführt.

Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA: Die DNA wurde nach Sambrook *et al.* (1989) dephosphoryliert. Die linearisierte DNA wurde in Dephosphorylierungspuffer (Roche) aufgenommen und mit 1 U alkalischer Phosphatase (Roche) pro 100 pmol DNA 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Enzymzugabe wurde 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 15 min Hitzedenaturierung bei 65 °C gestoppt. Zur Phosphorylierung wurde der Ansatz mit der entsprechenden Menge Polynukleotidkinase 10 x Puffer versetzt, mit einer Einheit T4 Polynukleotidkinase pro 50 pmol 5'-Enden bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989).

Ligation: Linearisierte DNA Fragmente wurden in einem Verhältnis 3:1 Insert zu Vektor eingesetzt. Die DNA wurde mit 1-2 µl 10 x Ligationspuffer und 1 U T4 DNA-Ligase (Roche) in einem Gesamtvolumen von 10–20 µl durchgeführt. Das Reaktionsgemisch wurde 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zu

einer weiteren Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde 1 U T4 DNA-Ligase zugegeben. 10 – 30 ng DNA des Ligationsansatzes wurden zur Transformation eingesetzt.

Elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten: In Abhängigkeit von der DNA-Fragmentgröße wurden 0,5 - 1 % Agarosegele (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer bei einer Spannung von 2-8 V/cm verwendet (Sambrook et al., 1989). In analytischen Gelen wurden die DNA-Fragmente durch UV-Fluoreszenz des Ethidiumbromid-Komplexes bei 254 nm sichtbar gemacht. In präparativen Gelen wurde GelStar-Farbstoff (Biozym) verwendet. Nach gelelektrophoretischer Trennung von 5 - 20 µg DNA wurden die Gelbereiche der zu isolierenden Fragmente mit einer Rasierklinge ausgeschnitten. Die DNA wurde nach Herstellerangaben mit dem QIAEX II Kit (Qiagen) direkt aus dem Agarosegel isoliert.

Radioaktive Markierung von DNA und Hybridisierung: Die radioaktive Markierung wurde mit [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP (3 Ci/mmol) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) durchgeführt. Die Biohybe B Nylonmembran wurde in 250 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 7 % SDS, 2,5 mM EDTA 1 h bei 65 °C prähybridisiert. Nach Zugabe von hitzedenaturierten, radioaktiv markierten DNA-Sonden und 10 ml frischer Hybridisierungslösung wurde über Nacht unter den gleichen Bedingungen hybridisiert (Church & Gilbert, 1984). Die Membran wurde anschließend drei mal mit 2x SSC, 0,3 % SDS bei Raumtemperatur gewaschen. Die autoradiographische Analyse wurde mit einer ImagePlate (BAS-IP MP 2025, Fuji) und dem elektronischen Analyser Fuji AS 1800 vorgenommen.

Transformation von *E. coli*: *E. coli*-Zellen wurden durch Elektroporation transformiert (Potter, 1988). Die Bakterien wurden bei 37 °C in 200 ml LB Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen, 15 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 2500 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien drei mal mit kaltem, sterilem und bidestilliertem Wasser gewaschen und im 1,5 fachen Eigenvolumen Wasser aufgenommen. 60 µl der Zellsuspension wurden mit 10 - 30 ng DNA versetzt und mit einem Stromstoß von 5 ms und 1700 V behandelt (Multiporator, Eppendorf). Direkt nach der Elektroporation wurden die Zellen in 500 µl SOC Medium aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugieren bei 2500g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) für 5 min und Aufnehmen in 200 µl

sterilem Wasser wurden die Zellen auf vorgewärmten LB Platten ausplattiert (optional mit Ampicillin, X-Gal oder IPTG). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von *N. crassa* und Kreuzung der Mutanten: Die Makrokonidien von 2 Agarböden wurden in 50 ml sterilem Wasser aufgenommen und über sterile Glaswolle von Hyphen abgetrennt. Durch 10 min Zentrifugation bei 1000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) wurden die Konidien sedimentiert und mit 1M Sorbit aufgenommen, so daß die Konzentration der Konidien $6 \cdot 10^8$ pro ml betrug. 20 min Inkubation mit 20 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma L-1412) erzeugte die zur Transformation benötigten Protoplasten. Diese wurden durch Zentrifugation bei 1000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) sedimentiert, 2x mit 1 M Sorbit und einmal mit 1 M Sorbit und 1 % PEG 4000 gewaschen. Nach Aufnehmen in 1 M Sorbit mit 1 % PEG 4000 wurde die Konzentration der Konidien auf $2 \cdot 10^8$ pro ml eingestellt. 400 µl der Protoplastensuspension wurden mit 4 µg DNA versetzt und nach 20 min Inkubation auf Eis 3x im Abstand von je 1min elektroporiert (750 V, $\tau = 250 \mu\text{s}$, Eppendorf Multiporator). Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml Vogelsmedium mit 1 M Sorbit zugegeben und 60 min bei 28 °C geschüttelt. Ausplattiert wurde auf Platten mit Vogels Medium und 20 g/l Sorbose, 1 M Sorbit und 1,2 g/l Basta durch Aufnehmen in 10 ml Topagarose (0,7 % Low Melting Agarose, BioRad) mit 20 g/l Sorbose, 1 M Sorbit und 1,2 g/l Basta. Zur Kreuzung der Mutanten wurden Agaroseplatten mit Kreuzungsmedium mit Makrokonidien aus Schrägagarröhrchen an gegenüberliegenden Seiten angeimpft. Die Platten wurden zwei Wochen bei 25 °C in Dunkelheit inkubiert und anschließend 10 Tage bei 28 °C beleuchtet. Die an den Deckeln der Petrischalen haftenden Ascosporen wurden mit 0,5 ml sterilem Wasser abgewaschen und durch Ausstreichen auf Sorboseplatten vereinzelt. Durch eine Inkubation von 2 h bei 60 °C wurden die Ascosporen aktiviert und fremde Mikroorganismen abgetötet. Nach Inkubation für 2 Tage bei 28 °C konnten von den Kulturen Proben auf Schrägagarröhrchen mit Selektionsmarker überführt werden. Nach 2 Tagen bei 28 °C bildeten sich Makrokonidien.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa*

Der Membranarm von Komplex I wurde aus den Mitochondrien von *N. crassa* wie folgt isoliert (Schulte *et al.*, 1998): In einer French Press wurden die Mitochondrien aufgeschlossen und durch Ultrazentrifugation in Membranen und Matrix getrennt.

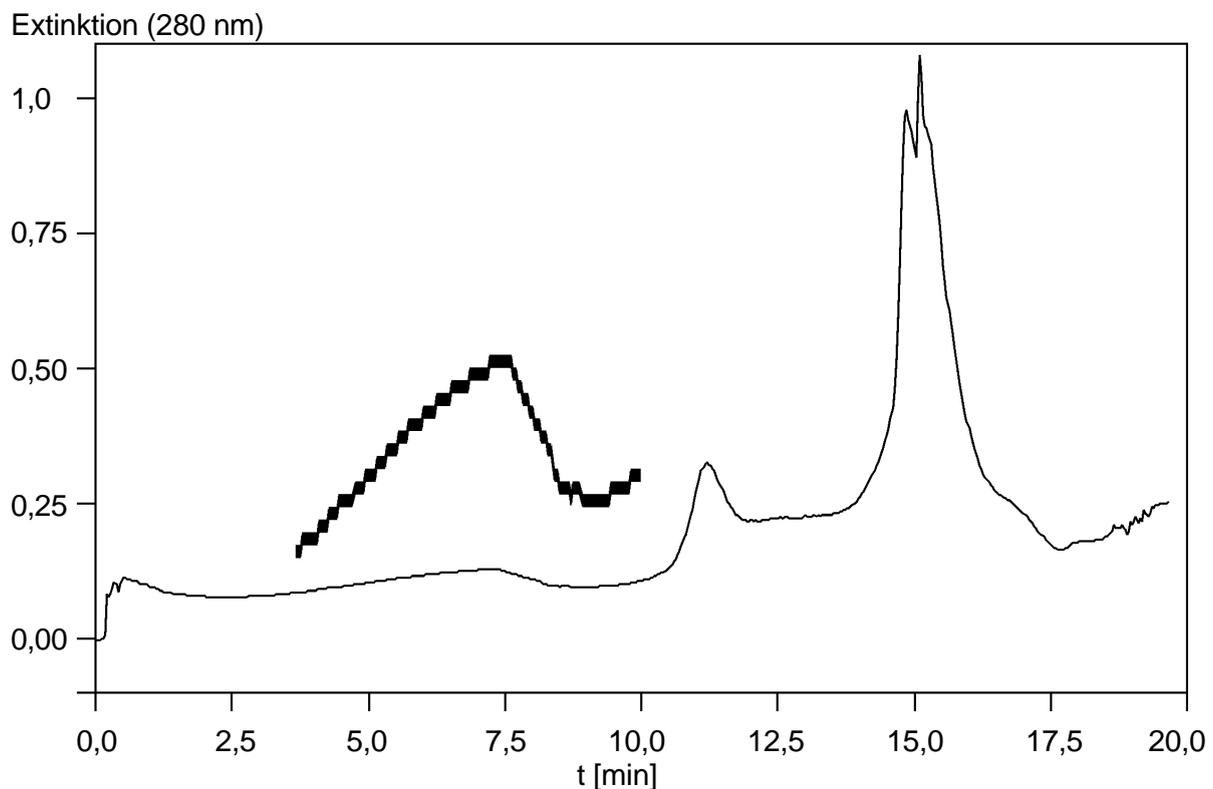


Abb. 5: Sedimentationsprofil der Zuckergradientenzentrifugation von Komplex I. Die Extinktion bei 280 nm im Sedimentationsbereich von Komplex I wurde vergrößert dargestellt. In der Auftragung stellt $t=0$ min das untere Ende und $t=20$ min das obere Ende des Gradienten dar. Komplex I sedimentierte unter den gegebenen Bedingungen in das untere Drittel des Gradienten. Die Extinktion bei 280 nm wurde in einer Durchflußküvette mit der Schichtdicke 0,05 cm bestimmt.

Die mitochondrialen Membranproteine wurden durch einen großen Überschuss des Detergens Octylglukosid solubilisiert. Durch eine erste Größenausschlusschromatographie wurden das überschüssige Detergens und kleinere Proteine abgetrennt. Die vereinigten Gipffractionen von Komplex I, die mit Hilfe der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt wurden, wurden durch Ultrafiltration konzentriert und durch Zuckergradientenzentrifugation weiter gereinigt. Abbildung 5 zeigt das Sedimentationsprofil des Zuckergradienten.

Nach erneutem Einengen und Auswaschen eines großen Teils des Zuckers durch Ultrafiltration wurde zu der Präparation des Komplex I Kaliumrhodanid gegeben. Der damit freigesetzte Membranarm wurde durch eine folgende Zuckergradientenzentrifugation in Rhodanid-haltigem Puffer weiter gereinigt (Abb. 6).

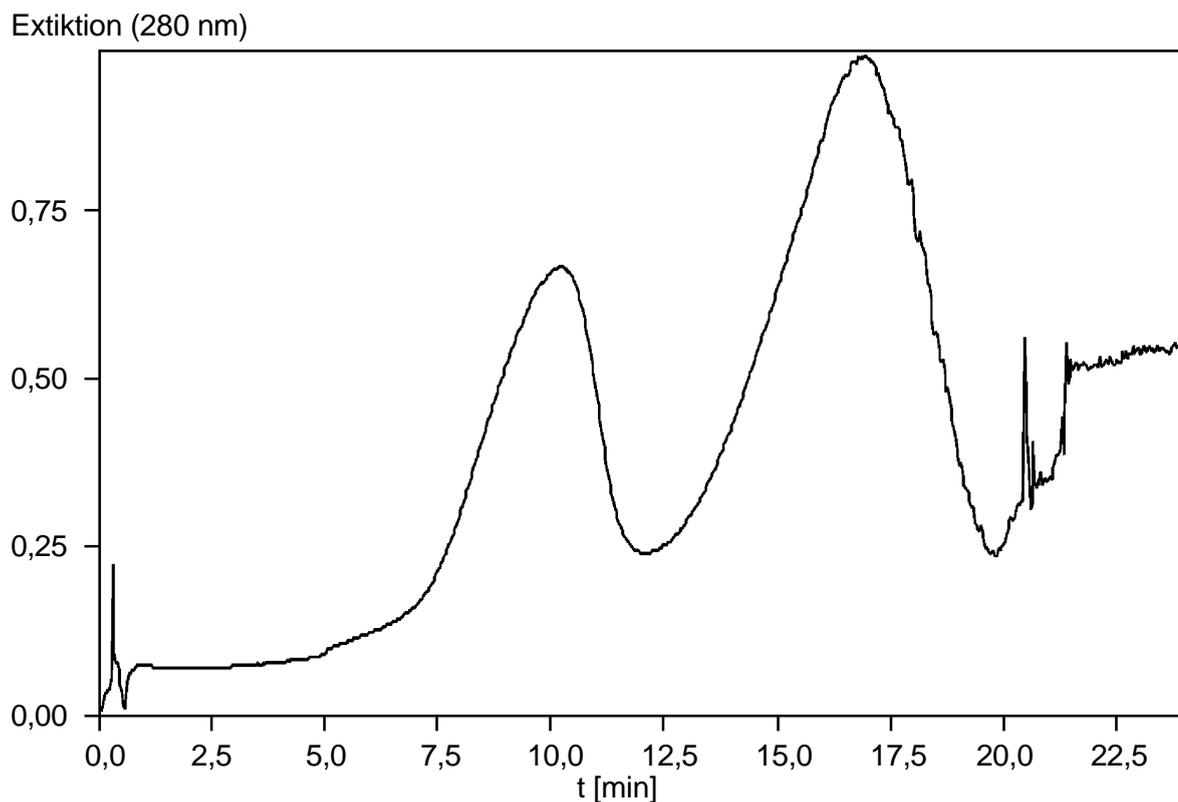


Abb. 6: Sedimentationsprofil der Zuckergradientenzentrifugation des Membranarms in Rhodanid-haltigen Lösung. Die Auftragung entspricht der von Abbildung 5. Der Membranarm sedimentierte unter den gegebenen Bedingungen bis zur Hälfte des Gradienten (etwa 10 min). Die Extinktion bei 280 nm wurde bei einer Schichtdicke von 0,05 cm bestimmt.

Nach anschließender Größenausschlußchromatographie in NaCl-haltigem Puffer (Abb.7) lag der Membranarm des Komplex I in etwa 95 % Reinheit vor. Die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

Extinktion (280 nm)

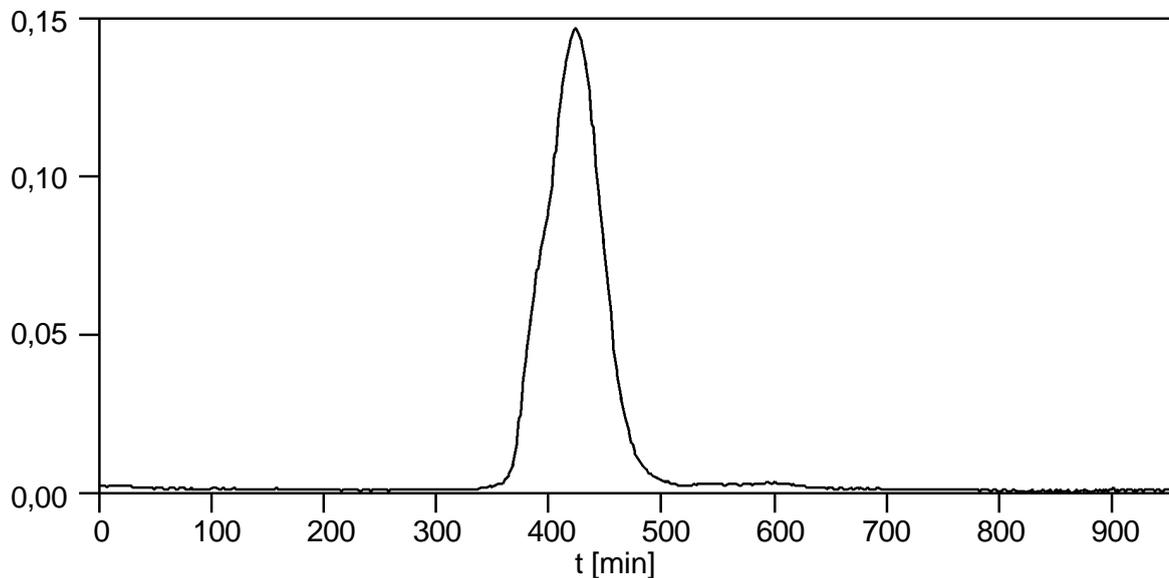


Abb. 7: Elutionsprofil des Membranarms nach Größenausschlußchromatographie im NaCl-haltigem Puffer. Die Extinktion bei 280 nm wurde bei einer Schichtdicke von 0,05 cm bestimmt.

Tab. 2: Reinigung des Membranarms von Komplex I aus *N. crassa* aus 1,6 kg Hyphen (Feuchtmasse).

Präparations- schritt	Volumen [ml]	Protein- menge [mg]	NADH/Ferricyanid Reduktaseaktivität	
			gesamt [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	Ausbeute [%]
Membranextrakt	100		20400	100
Größenausschluß- chromatographie	150		14400	71
Zuckergradienten- zentrifugation	48		7488	31
Spaltungsgradienten- zentrifugation	30	18		
Größenausschluß- chromatographie	6	12,6		

Der gereinigte Membranarm wurde durch SDS-Page charakterisiert. Ein typisches Proteinmuster und eine Gegenüberstellung mit dem des Komplex I zeigt Abbildung 8.

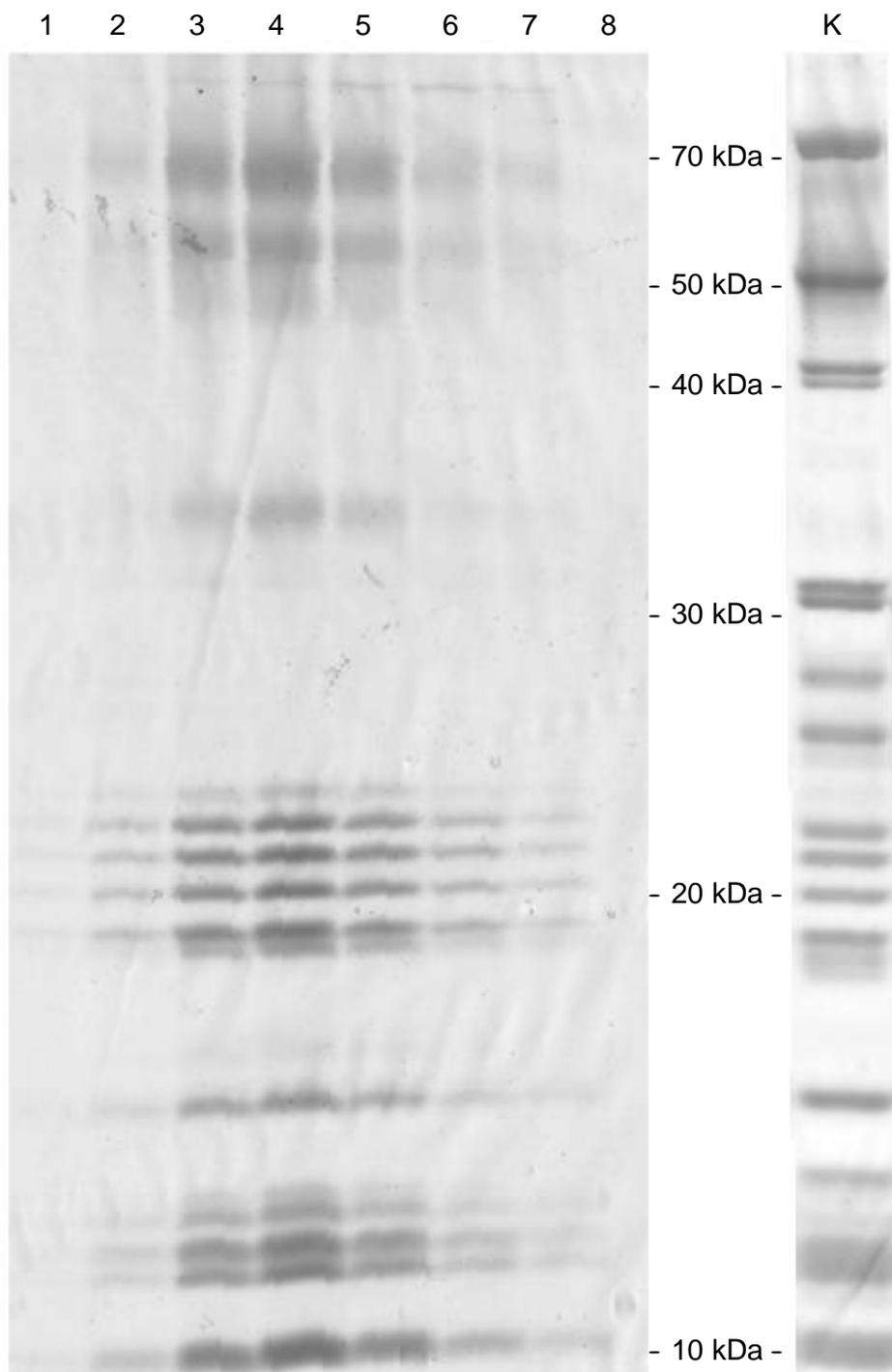


Abb. 8: SDS-Page von Membranarm und Komplex I. In den Spuren 1 – 8 sind die Gipfelfraktionen der Größenausschlußchromatographie (Abb. 7) aufgetragen, Spur K zeigt Komplex I. Bei den stark diffusen, nur schwach anfärbbaren Banden handelt es sich um die hydrophoben, mitochondrial kodierten Untereinheiten.

4.2 Kristalle des Membranarms von Komplex I

In einer Proteinlösung mit einer Konzentration von 16 mg/ml die durch dreifache Vorfällung mit einer PEG 4000 Endkonzentration von 2,6 % erhalten wurde, bildeten sich nach 10 Tagen bei 12 °C stäbchenförmige Kristalle (Abb.9). Als Präzipitantenlösung diente der Puffer der Größenausschlußchromatographie mit 10 % PEG 4000. Die Kristallisation erwies sich als schlecht reproduzierbar und das Kristallwachstum lies sich nicht über eine Größe von 20 µm x 2 µm hinaus anregen. Eine Röntgenstrukturanalyse war damit nicht möglich.

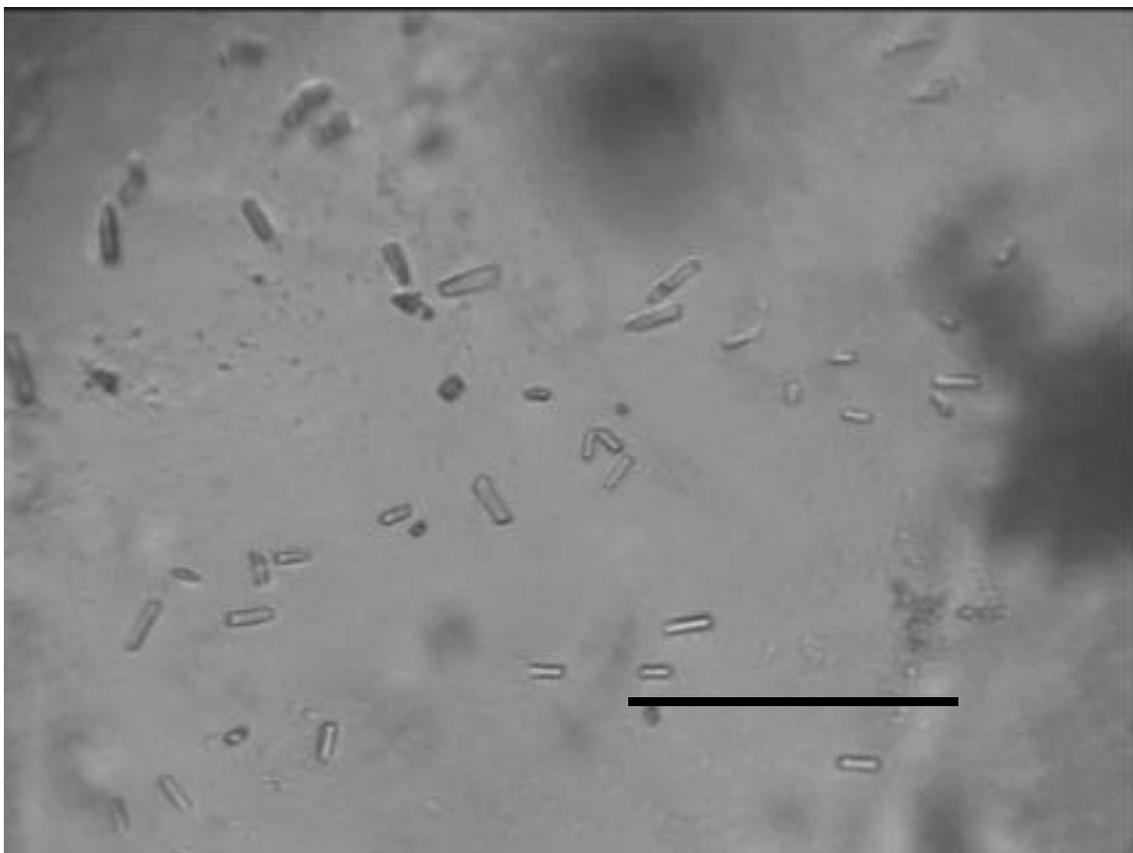


Abb.9: Stäbchenförmige Kristalle des Membranarms von Komplex I in einem Gasphasendiffusionsansatz mit einer Proteinkonzentration von 16 mg/ml. Der Balken entspricht 0,1 mm.

Nachdem mit dem oben beschriebenen Vorgehen der Proteinreinigung und Kristallisation keine Fortschritte erzielt werden konnten, wurde eine schonendere Proteinisolierung durch Affinitätschromatographie versucht.

4.3 Strategie zur Einführung von Affinitäts-Tags in Untereinheiten des Membranarms vom Komplex I

Zur Einführung von Affinitäts-Tags an Untereinheiten des Membranarms mit dem Ziel der Reinigung durch Affinitätschromatographie wurde folgende Strategien gewählt.

Ausgegangen wurde von den in unserem Institut vorhandenen Mutanten (siehe Tab. 1, Seite 9) *nuo20,9* (Küffner *et al.*, 1998), *nuo21,3* (Nehls *et al.*, 1992.), *nuo78* (Wobschall, Dissertation 1997) und *nuo20,9/78* (Heimlich, Diplomarbeit 1999), in denen die Gene der genannten Untereinheiten zerstört worden waren. Genkonstrukte aus Promotor, kodierender Sequenz der jeweiligen Untereinheit und der His- oder Strep-II Tag-Sequenz wurden *in vitro* hergestellt.

Durch heterologe Integration sollten die Konstrukte in das Genom der Doppelmutanten, denen neben der Untereinheit des Membranarms auch noch eine Untereinheit des peripheren Arms fehlt, eingebracht werden. Die Integration des modifizierten Gens sollte zur Ausbildung eines mit Tag versehenen Membranarms führen. Da eine der Doppelmutante noch nicht vorlag, sollte sie durch Kreuzung der Mutanten *nuo21,3* und *nuo78* erzeugt werden. Die 20,9 kDa und die 23,1 kDa Untereinheit liegen im Membranarm und die 78 kDa Untereinheit liegt im peripheren Arm.

Um die Genkonstrukte zu erstellen, mußten Vektoren mit einem Promotor, dem kodierenden Bereich der Untereinheiten, der jeweiligen Tag-Sequenz und einem Selektionsmarker hergestellt werden. In unserem Institut lag als Vektor das Plasmid pNGAN-2 (Abb. 11, Krüll, 1995) vor, das die Gene für die BASTA-Resistenz und das mitochondriale Acylcarrierprotein (mtACP) aus *Aspergillus niger* enthielt. Dieses Plasmid hat eine Länge von 7,2 kBp. Zur Einführung einer geeigneten Schnittstelle mußte das Plasmid über PCR amplifiziert werden. Um hierbei Fehler zu vermeiden, erschien es sinnvoll mit kurzen Sequenzen zu arbeiten. Zudem erschwerte die große Zahl der vorhandenen Restriktionsschnittstellen das Klonieren. Es wurde daher mit dem Erstellen des 3,6 kBp Plasmids p19EBF aus dem Plasmid pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) begonnen, das ein 1,2 kBp EcoRI-BamHI-Fragment aus pNGAN-2 enthielt. Dieses Fragment umfaßt das Ende des Promotors sowie die gesamte

kodierenden Sequenz für das mtACP. Durch eine Mutagenese sollte es möglich sein, zwischen dem Ende des Promotors und dem einleitenden ATG des mtACP eine neue NotI-Schnittstelle einzufügen, die zum Klonieren der cDNA der Untereinheiten an Stelle der kodierenden Sequenz des mtACP genutzt werden könnte, während der Promotor erhalten bliebe.

Da die Aminosäuresequenzen der 20,9 kDa und 21,3 kDa Untereinheiten und die DNA-Sequenzen ihrer Gene bekannt waren, sollte der kodierende Bereich der jeweiligen cDNA aus der cDNA Genbank λ AD5 durch PCR amplifiziert werden können. Die Primer sollten so gewählt werden, daß durch ihre Überhänge eine NotI-Schnittstelle vor dem ATG, die Tag-Sequenz vor dem Stopkodon und eine EcoRI-Erkennungssequenz hinter dem Stopkodon in einem Schritt eingefügt werden können. Die PCR-Produkte mit diesen Schnittstellen sollten direkt durch Austausch gegen die Sequenz des mtACP in p19EBF kloniert werden können. Durch anschließendes Rückklonieren der modifizierten EcoRI-BamHI-Fragmente in pNGAN-2 sollten die Expressionsvektoren pN209H, pN209S, pN213H und pN213S entstehen, die zur Transformation in die jeweiligen Mutanten eingesetzt werden sollten.

4.4 Erzeugung der Doppelmutante *nuo21,3/78*

Die Mutanten *nuo21,3* (Nehls, 1992) und *nuo78* (Wobschall, 1997) lagen im Paarungstyp A vor, so das ihre direkte Kreuzung nicht möglich war. Daher wurde zunächst die Mutante *nuo21,3* mit dem Paarungstyp a des Wildtyps gekreuzt. Durch Ausplattieren auf Hygromycin-haltigen Sorboseplatten wurde auf den Erhalt der Gendeletion selektioniert. 6 Kolonien wurden ausgewählt und ohne vorherige Bestimmung des Paarungstyps mit der Mutante *nuo78* gekreuzt. Auf 2 der 6 Kreuzungsplatten wurden Perithezien und Ascosporen gebildet. Da die Anzucht von Kolonien aus den Ascosporen auf Hygromycin-haltigen Sorboseplatten nicht gelang, wurden die Ascosporen auf Sorboseplatten ohne Hygromycin ausplattierten. In Abwesenheit von Hygromycin wuchsen sie nach Hitzeaktivierung schnell an. Nach 3 Tagen wurden Kolonien zur weiteren Vermehrung in 50 ml Vogelsmedium mit Hygromycin und zur Aufbewahrung auf Schrägagarrörchen mit Hygromycin

überführt. Alle Klone erwiesen sich als hygromycinresistent. Zur weiteren Untersuchung wurden 7 Kolonien unterschiedlicher Wachstumsgeschwindigkeit ausgewählt.

4.5 Analyse der Doppelmutanten

Zur Bestimmung des Genotyps der 7 durch Kreuzung von *nuo78* A mit *nuo21,3* a erhaltenen Kolonien wurde die genomische DNA isoliert, mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten und durch Elektrophorese auf einem Agarosegel getrennt. Die DNA wurde auf eine geladene Nylonmembran übertragen und mit einer aus dem 2,4 kBp Sall Fragment des Plasmids pCSN43 (Staben *et al.*, 1989) erstellten, radioaktiven Sonde hybridisiert. Die Sonde markierte auf Southern-Blots die Fragmente des Hygromycinresistenzgens, das in den Ausgangsmutanten in unterschiedlicher Umgebung vorliegt. Die Identifizierung der Doppelmutante erfolgte durch Vergleich mit EcoRI geschnittener DNA der beiden Einfachmutanten. Die Ausgangsmutante *nuo21,3* zeigte zwei Banden von 2,6 und 1,4 kBp Größe, bei *nuo78* zeigten sich zwei Banden bei 3,5 und 2,6 kBp. Bei der Doppelmutante mußten somit 3 Banden mit 3,5, 2,6 und 1,4 kBp markiert werden (Abb.10). Als Größenstandard diente mit EcoRI und HindIII geschnittene λ -DNA (Marker 3, MBI Fermentas). Unter den 7 untersuchten Kolonien wurden 2 als die gesuchte Doppeldeletionsmutante identifiziert.

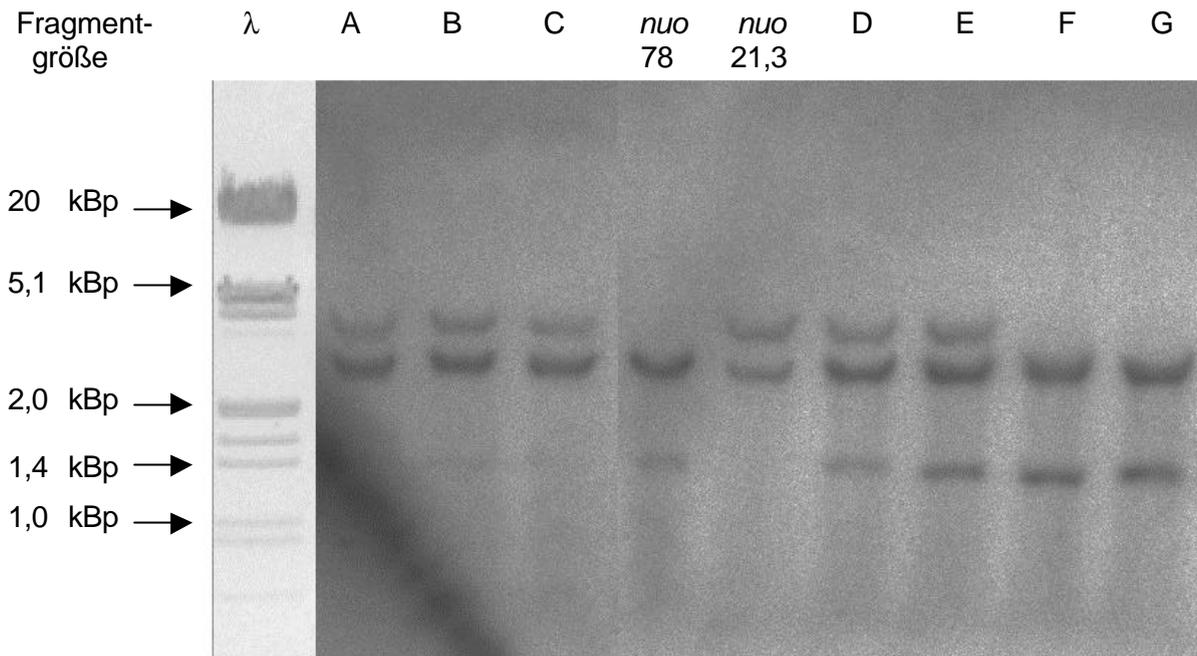


Abb. 10: Southern-Blot-Analyse des Genoms der Doppelmutanten *nuo21,3/78* und der Ausgangsmutanten *nuo21,3* und *nuo78* nach Restriktion mit EcoRI. λ zeigt den Marker 3 (MBI Fermentas) der nach Markierung mit Ethidiumbromid unter UV Licht aufgenommen und in der passenden Größe in das Bild eingefügt wurde. Die Spuren D und E zeigen die gesuchte Doppelmutante *nuo21,3/78* (siehe Text). In den Spuren A, B, C, F und G erkennt man die Ausgangsmutanten.

4.6 Erzeugung des Plasmids p19EBF

Zur besseren Handhabung wurde aus dem 7,2 kBp Plasmid pNGAN-2 (Krüll, 1995) ein 1,2 kBp EcoRI/BamHI Fragment in den puc19 Vektor überführt, und das Plasmid p19EBF erzeugt (Abb. 11). Durch PCR mit den Primern EBFNot1 und EBFNot2 wurde der Vektor p19EBF amplifiziert. Nach einem Restriktionsschnitt mit NotI und einer Abtrennung der gesuchten DNA von den kleinen Restriktionsfragmenten durch Ethanolfällung wurde der modifizierte Vektor durch Ligation mit T4 DNA-Ligase geschlossen. Der so modifizierte p19EBF besaß zwischen dem Ende des Promotors und dem Beginn der kodierenden Sequenz des mtACP-Gens aus *A. niger* eine neue und in dem Plasmid nur einmal vorhandene NotI-Schnittstelle.

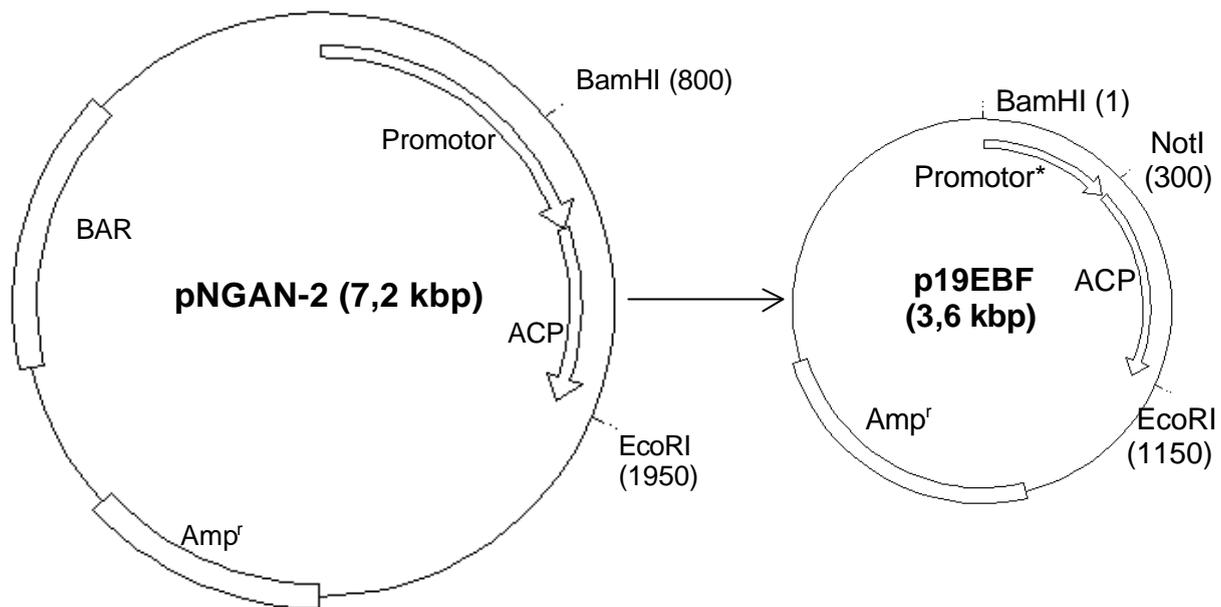


Abb. 11: Erstellung des Plasmids p19EBF aus pNGAN-2. Eine Schnittstelle für NotI wurde zwischen dem Ende des Promotors und dem Beginn der kodierenden Sequenz des mtACP-Gens aus *A. niger* eingeführt.

4.7 Amplifikation und Mutation der cDNA der 20,9 und 21,3 kDa Untereinheiten

Mit Hilfe der cDNA Genbank λ AD5 von *N. crassa* (Brunelli *et al.*, 1993) wurde DNA Template für die PCR gewonnen. Die Primer 20,9-H-Tag bzw. 20,9-S-Tag auf der einen und Not-c20,9-A auf der anderen Seite ermöglichten die Amplifikation der cDNA der 20,9 kDa Untereinheit mit einer NotI Schnittstelle vor dem einleitenden ATG, der kodierenden Sequenz, einer His- bzw. Strep-II Tag-Sequenz vor und einer EcoRI-Schnittstelle hinter ihrem Stopkodon in jeweils einem Schritt. Das Gleiche gelang mit den Primern 21,3-H-Tag, 21,3-S-Tag und Not-c21,3-A für die cDNA der 21,3 kDa Untereinheit (Abb. 12).

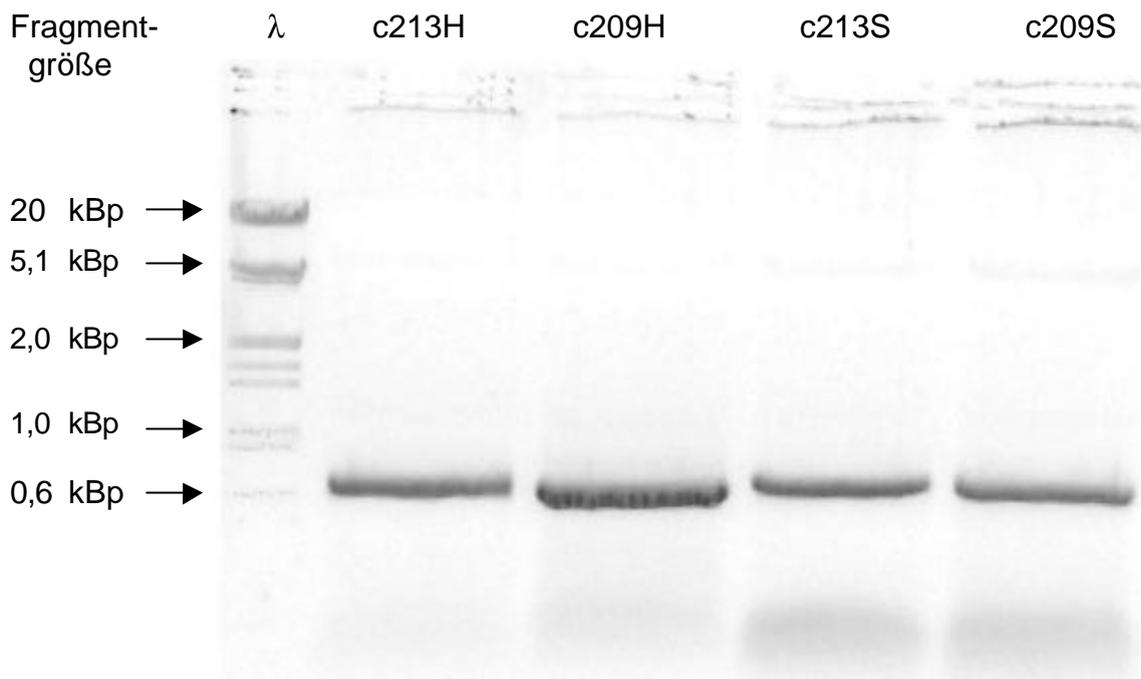


Abb. 12: Restriktion der PCR-Produkte nach der Amplifikation aus der cDNA-Genbank. Der Restriktionsschnitt mit EcoRI und NotI zeigt die mit Tag-Sequenz amplifizierte cDNA der Untereinheiten mit der Sequenz des entsprechenden Tags. Die Spuren zeigen: λ , Marker 3 (MBI Fermentas); c213H und c209H kodierende DNA der Untereinheiten mit His-Tag-Sequenz; c213S und c209S kodierende DNA der Untereinheiten mit Strep-II Tag-Sequenz

Die cDNA der 21,3 kDa Untereinheit enthielt kurz vor ihrem Ende eine Erkennungssequenz für BamHI. Diese hätte das Umklonieren in den Expressionsvektor pNGAN-2 unmöglich gemacht. Die Wahl der Primer 21,3-H-Tag und 21,3-S-Tag ermöglichte es diese Schnittstelle durch eine Punktmutation zu entfernen. Nach einem Restriktionsschnitt mit den Endonucleasen EcoRI und NotI und Abtrennung der kleinen Restriktionsfragmente wurden die erhaltenen PCR-Produkte in das Plasmid p19EBF eingesetzt, wodurch die Vektoren p209Htag, p209Stag, p213Htag und p213Stag entstanden (Abb. 13). Die Sequenzen der Tags wurden so gewählt, daß neue Restriktionsschnittstellen zur Erkennung der gelungenen Mutationen in die Vektoren eingeführt wurden. Bei der Einführung der His-Tags wurde eine Peptidsequenz aus einem Alanin und 6 Histidinen gewählt, deren Nucleotidsequenz eine Erkennungssequenz für NsiI enthielt. Die Sequenz des Strep-II Tags wurde so gewählt, daß sie eine SfuI Schnittstelle beinhaltet.

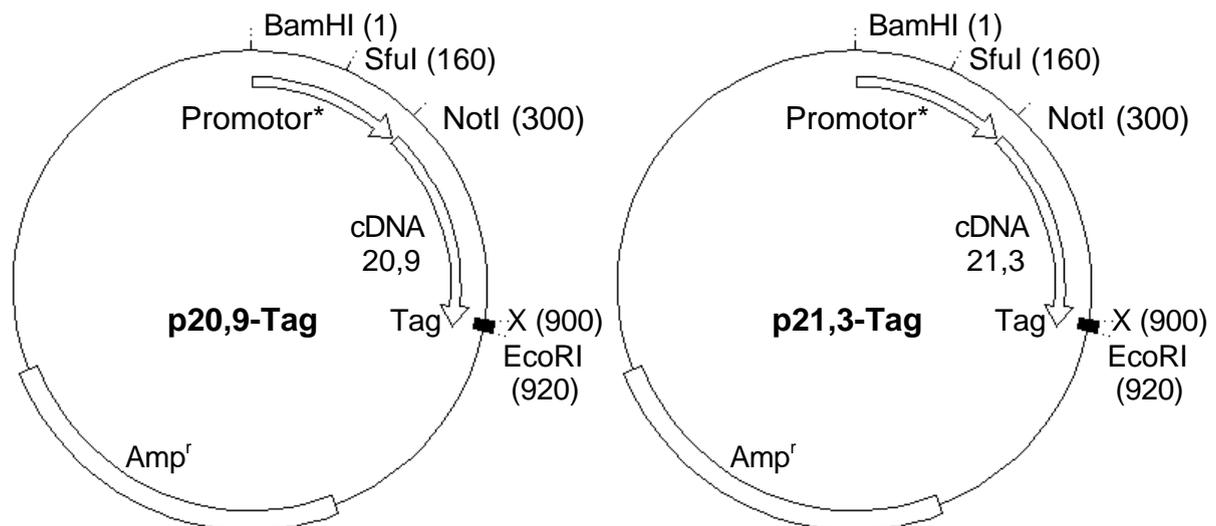


Abb. 13: Die Vektoren p20,9-Tag und p21,3-Tag. Sie enthielten die cDNA der jeweiligen Untereinheit und die His- bzw. die Strep-II Tag-Sequenz. Mit dem His-Tag wurde eine NsiI- und mit dem Strep-II Tag eine SfuI-Schnittstelle (X) eingeführt.

Die bei den Mutationen neu eingefügten Schnittstellen ermöglichte die Identifikation der transformierten PCR-Produkte (Abb. 14) durch Restriktionsanalyse mit NotI und NsiI bzw. durch NotI und SfuI. Nach Restriktion und Gelextraktion wurde das EcoRI-BamHI-Fragment für die Klonierung in pNGAN-2 erhalten.

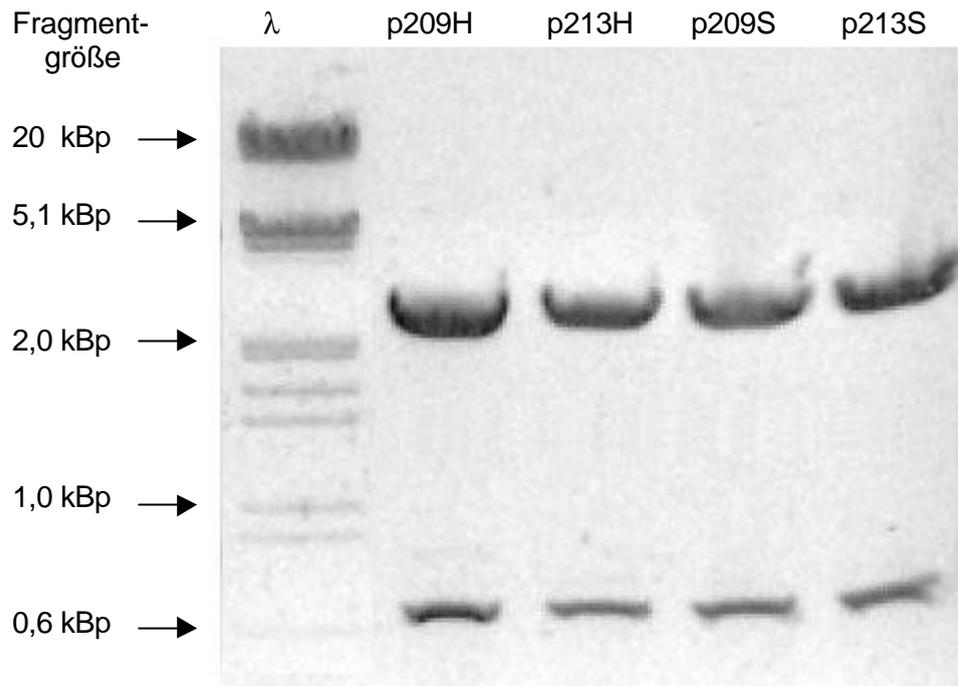


Abb. 14: Identifizierung der gewünschten Plasmide. Durch Restriktionsschnitt mit NotI und NsiI beim His- bzw. NotI und SfiI beim Strep-II Tag wurden die Plasmide identifiziert, die die etwa 600 Bp lange Sequenz der cDNA der Untereinheit und die Sequenz des Affinitäts-Tags enthielten. Die Spuren zeigen: λ , Marker 3 (MBI Fermentas); p209H und p213H, Plasmide mit der cDNA der Untereinheiten 20,9 und 21,3 und der His-Tag-Sequenz; p209S und 213S, Plasmide mit der cDNA der Untereinheiten 20,9 und 21,3 und der Strep-II Tag-Sequenz.

4.8 Erstellen der Expressionsvektoren

Aus den Plasmiden p209Htag, p209Stag, p213Htag und p213Stag wurde das EcoRI-BamHI-Fragment ausgeschnitten und in den Vektor pNGAN-2 überführt. Es entstanden Plasmide mit der vollständigen Promtorsequenz, der cDNA der jeweiligen Untereinheit und der Tag-Sequenz. Die Plasmide wurden als pN209H, pN209S, pN213H und pN213S bezeichnet (Abb. 15). Sie wurden durch eine Restriktion mit EcoRI und NotI auf die Integration des richtigen Fragmentes überprüft (Abb. 16).

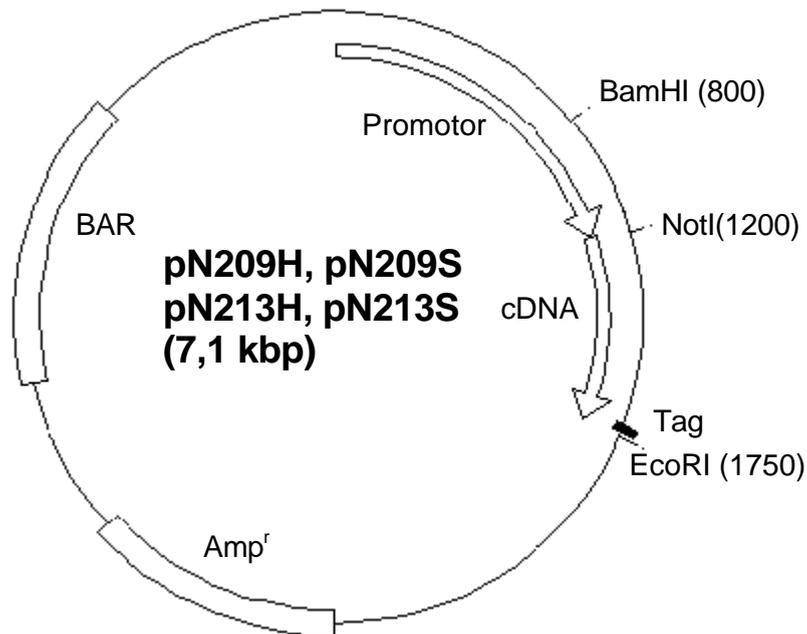


Abb. 15: Expressionsvektoren pN209H, pN209S, pN213H, pN213S. Die Vektoren unterschieden sich in der für die jeweilige Untereinheit kodierenden cDNA- und der Tag-Sequenz.

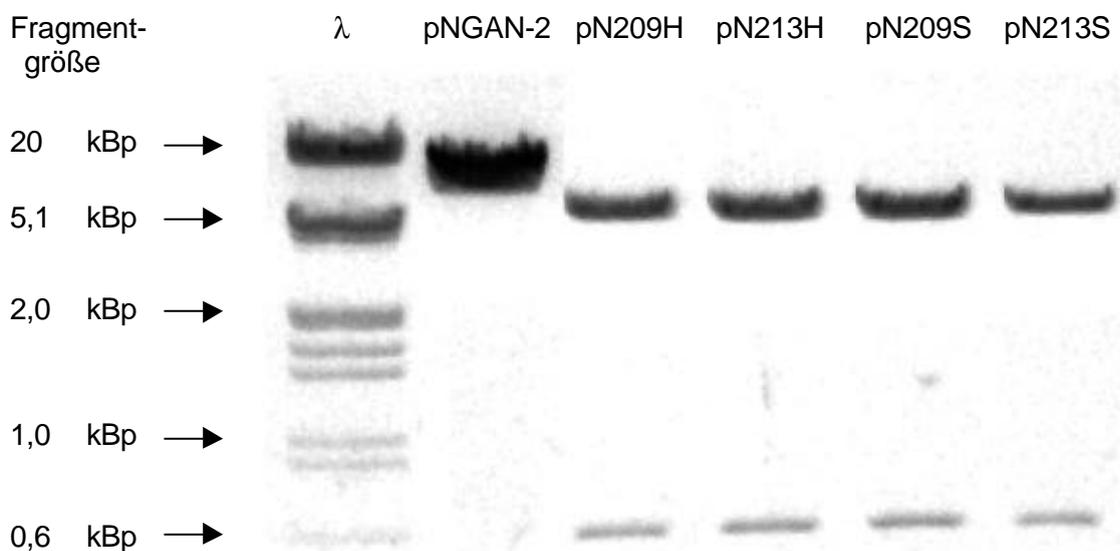


Abb. 16: Restriktionsanalyse der Expressionsvektoren. Restriktion mit EcoRI und NotI bestätigte die Integration der 600 Bp langen Sequenzen. Die Spuren zeigen: λ , Marker 3 (MBI Fermentas); pNGAN-2, Expressionsvektor ohne cDNA-Tag-Sequenz-Konstrukt; pN209H, pN213H, pN209S und pN213S, Transformationsvektor mit cDNA-Tag-Sequenz-Konstrukt.

4.9 Transformation von *N. crassa* und Analyse der Transformanten

Die gewonnenen Expressionsvektoren wurden zur Transformation von *N. crassa* eingesetzt. Es wurden parallel die Einfachmutanten *nuo20,9* und *nuo21,3* und die Doppelmutanten *nuo20,9/78* und *nuo21,3/78* transformiert. Es wurden Transformationsraten von 2 bis 20 pro μg Vektor-DNA erreicht. Die Kolonien wurden nach 3 Tagen bei 28°C von den Platten gepickt und auf BASTA-haltige Schrägagarröhrchen überführt. Die Analyse der Transformanten erfolgte nach Anzucht in 100 ml BASTA-haltigem Vogelsmedium durch Western-Blot und Bestimmung des Sedimentationsverhaltens der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität nach Zuckergradientenzentrifugationen von Triton X-100 solubilisierten Mitochondrien.

Die Western-Blot-Analyse von Mutanten nach Transformationen der Einfachmutante *nuo20,9* mit pN209H und pN209S zeigte zwei unterschiedliche Ergebnisse. Bei Typ I (Abb.17, B) war die 20,9 kDa Untereinheit weder im Cytosol noch in den Mitochondrien nachweisbar. Sowohl bei der Transformation der Doppelmutante *nuo20,9/78* mit pN209H als auch bei der Transformation der beiden Mutanten mit dem Vektor pN209S wurden in den 8 untersuchten Kolonien nur Transformanten vom Typ I gefunden.

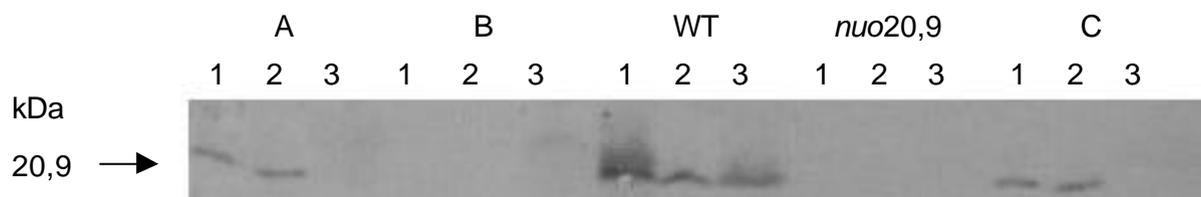


Abb. 17: Western-Blot-Untersuchung transformierter Mutanten *nuo20,9*. Die Spuren zeigen Auftragungen von Proteinen aus: A und C, Transformanten von Typ II; B, Transformante von Typ I; WT, *N. crassa* Wildtyp; *nuo20,9*, nicht transformierte Mutante *nuo20,9*. Die Indices der Spuren stehen für Fraktionen der Mitochondrienisolation: 1, Sediment nach Zellaufschluß; 2, Überstand nach Abzentrifugation der Mitochondrien; 3, Mitochondrien. (Weitere Erläuterungen im Text.)

Transformanten vom Typ II (Abb.17 A und C) exprimierten die Untereinheit *nuo20,9*, importierten diese aber nicht in die Mitochondrien. Die Untereinheit war nur im Cytosol und in den leicht abzentrifugierbaren, schweren Zellfragmenten nachweisbar. Um die Assemblierung von Komplex I in den Transformanten zu untersuchen wurden die Proteine der Mitochondrien der Transformanten vom Typ II mit Triton-X 100 solubilisiert und durch Zuckergradientenzentrifugation nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt. Die Lage von Komplex I bzw. des peripheren Arms von Komplex I im Gradienten wurde durch Messung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt. Der Vergleich der Aktivitätsverteilung vom Wildtyp, in dem der ca. 1 MDa Komplex I gebildet wird, mit der Mutante *nuo20,9*, in der nur der peripherer Arm gebildet wird, und der transformierten Mutante *nuo20,9* läßt erkennen, daß in der Transformante weiterhin nur der periphere Arm vorliegt, der Komplex I also nicht reassembliert wurde (Abb. 18).

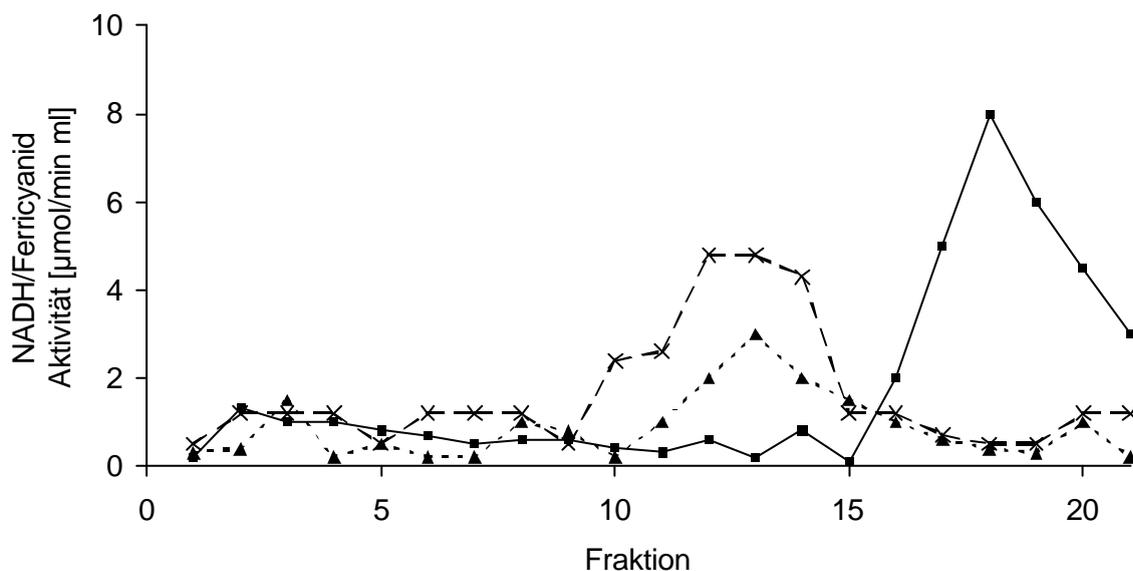


Abb. 18: Verteilung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität nach Zuckergradientenzentrifugation Triton X-100 solubilisierter Mitochondrienproteine. Wildtyp (■—■), Mutante *nuo20,9* (▲—▲), transformierte Mutante *nuo20,9* (x—x)

Die Western-Blot-Analyse der transformierten Mutanten *nuo21,3* und *nuo21,3/78* zeigte, daß die Untereinheit *nuo21,3* exprimiert und in die Mitochondrien importiert wird (Abb. 19).



Abb. 19: Western-Blot-Analyse der Transformanten mit pN213H und pN213S. Die Spuren zeigen Proteine aus: *nuo21,3/78S* und *nuo21,3S*, Zellen die mit pN213S transformiert wurden; WT, *N. crassa* Wildtyp; *nuo20,9*, nicht transformierte Mutante *nuo20,9*; *nuo21,3/78H* und *nuo21,3H*, Zellen die mit pN213H transformiert wurden. Die Indices der Spuren stehen für: 1, Sediment nach dem Zellaufschluß; 2, Mitochondrien.

Nachdem die 21,3 kDa Untereinheit in den Mitochondrien der Mutanten nachgewiesen wurde, wurden die in Triton-X 100 solubilisierten Mitochondrienproteine durch Zuckergradientenzentrifugation aufgetrennt und die Verteilung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität über den Gradienten bestimmt (Abb. 20). Die Aktivitätsverteilung der transformierten Mutanten *nuo21,3* zeigt den peripheren Arm. Die anschließende Analyse der Verteilung der Untereinheiten im Zuckergradienten durch Western-Blot-Analyse zeigt, daß die Maxima der 10,4 kDa Untereinheit der großen Vorstufe und der komplementierten 21,3 kDa Untereinheit der kleinen Vorstufe von einander abweichen. Dies zeigt sich sowohl bei den Transformanten mit Strep-II Tag (Abb. 21) als auch bei denen mit Histidin Tag (Abb. 22).

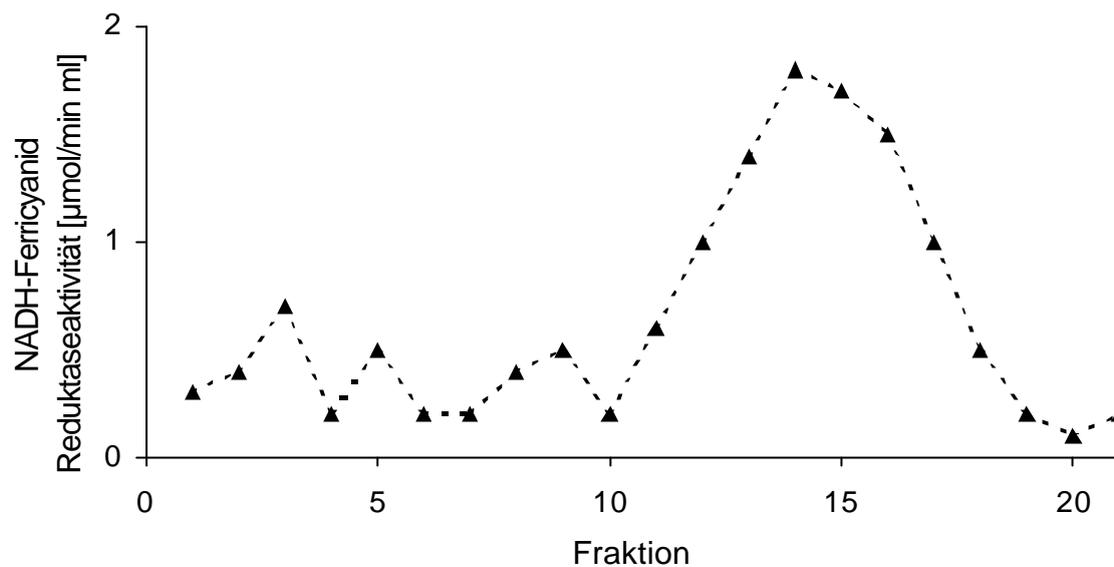


Abb. 20: NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivitätsprofil nach Zuckergradientenzentrifugation der solubilisierten Mitochondrienproteine der transformierten Mutante *nuo21,3* (▲---▲). Das Profil ähnelt dem der Ausgangsmutante (Abb. 18).

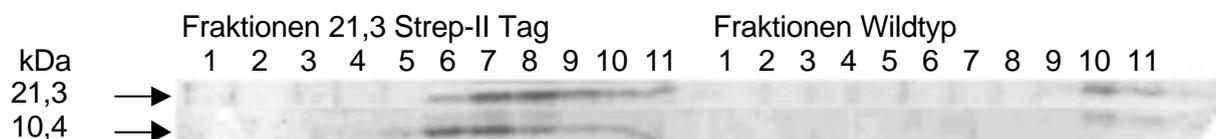


Abb. 21: Western-Blot-Analyse der Zuckergradienten der mit Strep-II Tag transformierten Mutante *nuo21,3* und des Wildtyps. Die Konzentrationsmaxima der 21,3 kDa und 10,4 kDa Untereinheiten der transformierten Mutante liegen eine Fraktion auseinander. Im Wildtyp mit vollständig assemblierten Komplex I befinden sie sich in den gleichen Fraktionen. Für die Western-Blot-Analysen wurden immer zwei Fraktionen der Zuckergradienten vereinigt.

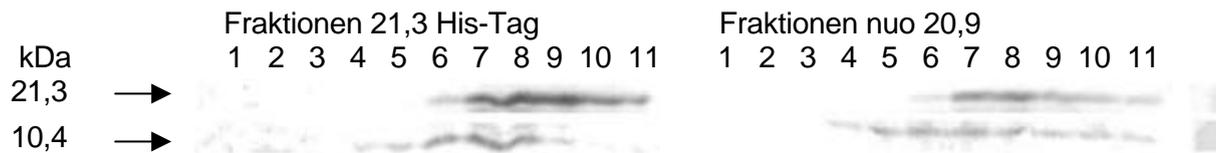


Abb. 22: Western-Blot der Zuckergradienten der mit His-Tag transformierten Mutanten *nuo21,3* und *nuo20,9*. Bei der mit His-Tag transformierten Mutante liegen die Konzentrationsmaxima der 21,3 kDa und 10,4 kDa Untereinheiten versetzt vor. In der Mutante *nuo20,9*, die keine kleine Membranarmvorstufe bildet verteilt sich die 10,4 kDa Untereinheit durch Aggregation auf die zwei unteren Drittel des Gradienten. Für die Western-Blot-Analysen wurden immer zwei Fraktionen der Zuckergradienten vereinigt.

Die Western-Blot-Untersuchungen der Zuckergradienten und der Affinitätschromatographie zeigen, daß Komplex I trotz des erfolgreichen Importes der um den Tag verlängerten 21,3 kDa Untereinheit in die Mitochondrien nicht assembliert wurde.

4.10 Affinitätschromatographie der Transformanten von *nuo21,3*

Durch Untersuchung des Elutionsverhaltens der um den Strep-II Tag verlängerten Untereinheit *nuo21,3* wurde überprüft, ob der eingeführte Affinitäts-Tag am Strep-Taktin Säulenmaterial (IBA) bindet. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die große Vorstufe des Membranarms mit der 10,4 kDa Untereinheit und die kleine Vorstufe des Membranarms mit der 21,3 kDa Untereinheit untereinander assoziiert sind.

Auf eine Säule mit 1 ml Gelbett wurden je 300 µl der Fraktionen 6 bis 11 des Zuckergradienten der mit Strep-II Tag transformierten Mutante *nuo21,3* aufgetragen. Nach Spülen mit 6 ml Desthiobiotin-freiem Puffer wurden die gebundenen Proteine mit 2 ml Desthiobiotin-haltigem Puffer eluiert (Abb. 23).

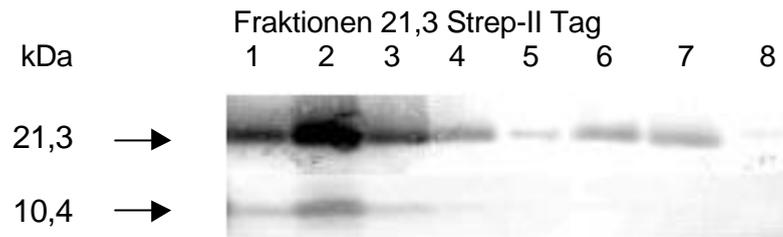


Abb. 23: Affinitätschromatographie der durch Zuckergradientenzentrifugation aufgetrennten Mitochondrienproteine der transformierten Mutante *nuo21,3*. Die Spuren zeigen folgende Schritte: 1, Auftrag der Probe; 2 bis 4, Spülen; 5, Auftrag des Elutionspuffers; 6 bis 8, Spülen. Die 21,3 kDa Untereinheit wurde zu einem Teil vom Säulenmaterial gebunden, während die 10,4 kDa Untereinheit nicht zurückgehalten wurde.

Die unabhängige Elution der vom Säulenmaterial gebundenen 21,3 kDa Untereinheit von der 10,4 kDa Untereinheit zeigt, daß der Membranarm nicht vollständig assembliert wurde. Statt dessen wurden sowohl die kleine Vorstufe des Membranarms mit der modifizierten 21,3 kDa Untereinheit, als auch die große Vorstufe mit der 10,4 kDa Untereinheit gebildet. Diese liegen in den Mitochondrien unabhängig von einander vor. Dies zeigen auch die unterschiedlichen Sedimentationsprofile der 10,4 kDa und der 21,3 kDa Untereinheit. Auf eine Affinitätschromatographie der mit dem His-Tag komplementierten Mutanten wurde aufgrund dieser Daten verzichtet.

5. Diskussion

5.1 Kristallisation des Membranarms von Komplex I

Die Aufklärung der Mechanismen des Elektronen- und Protonentransports durch Komplex I wird letztlich nur auf der Grundlage der atomar aufgelösten Struktur möglich sein. Dies konnte in den letzten Jahren beispielhaft an anderen Komplexen der Atmungskette gezeigt werden. Die Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III), die Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) und der periphere F₁-Teil der ATPase (Komplex V) aus verschiedenen Organismen wurden kristallisiert und ihre Strukturen mit atomarer Auflösung bestimmt. Die dadurch bekannt gewordene Anordnung der Redoxgruppen und der ihnen benachbarten Aminosäureseitenketten waren die Grundlagen für experimentell überprüfbare Modelle der einzelnen Reaktionsschritte (Abrahams *et al.*, 1994; Michel, 1998; Mills, 1998; Pomès *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1999; Lange und Hunte, 2002). Die Aufklärung der atomaren Struktur von Komplex I scheiterte dagegen an der Schwierigkeit, geeignete Kristalle für die Röntgendiffraktion zu züchten.

Die ohnehin komplizierte Kristallisation von Membranproteinen wird bei Komplex I durch die ungewöhnliche L-förmige Anordnung von peripheren und membranständigen Untereinheiten erschwert. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß der Komplex I keine starre Struktur hat und der Winkel zwischen peripherem und Membranarm variiert. Während bei früheren Einzelpartikel aufnehmen des Komplex I aus *N. crassa* (Hofhaus *et al.*, 1991) Proteine mit einem von 90 ° abweichendem Winkel für Artefakte gehalten wurden beweisen die Aufnahmen des Komplex I aus *E. coli*, daß die Beweglichkeit eine intrinsische Eigenschaft des Proteinkomplexes ist (Böttcher *et al.*, 2002).

Ein alternativer Weg zur Kristallisation des offensichtlich beweglichen Komplex I ist die getrennte Kristallisation seines peripheren Arms und Membranarms. Ein entsprechender Ansatz wurde bereits erfolgreich bei dem ATPase-Komplex angewandt (Abrahams *et al.*, 1994).

Der Membranarm wurde zunächst durch Spaltung von Komplex I mit Kaliumrhodanid und anschließender Zuckergradientenzentrifugation und Größenausschlußchromatographie isoliert. Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, konnten von dem so isolierten Membranarm unter Zusatz von PEG 4000 als Präzipitant Kristalle erhalten werden, die allerdings für eine Röntgenstrukturanalyse zu klein waren.

Nachdem bei der Kristallisation des durch Kaliumrhodanid-Spaltung von Komplex I erhaltenen Membranarms keine ausreichenden Fortschritte erzielt wurden, sollten als Grundlage für eine schonendere Präparation durch Affinitätschromatographie Affinitäts-Tags an Untereinheiten des Membranarms durch DNA-rekombinante Methoden angebracht werden. Durch Affinitätschromatographie sollte der Membranarm schneller, in größerer Menge und schonender isoliert werden können. Dies sollte die Homogenität der Probe steigern und eine größere Anzahl von Kristallisationsansätzen mit einer höheren Varianz der Kristallisationsbedingungen ermöglichen.

N. crassa eignet sich aufgrund seiner alternativen, nicht protonenpumpenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase gut als Ausgangsorganismus für solche Untersuchungen. Bei ausreichender Zuckerversorgung kann der Pilz ohne einen funktionstüchtigen Komplex I angezogen werden. Dies ermöglicht es, die Assemblierung des Gesamtkomplexes durch die Deletion von Untereinheiten zu verhindern und die einzelnen Komplex I-Arme aus den entsprechenden Mutanten zu isolieren.

5.2 Affinitäts-Tags für Untereinheiten des Membranarms

Aufgrund der in unserem Institut schon vorhandenen einfachen Deletionsmutanten *nuo20,9*, *nuo21,3* und der Doppelmутanten *nuo20,9/78* wurden die 20,9 und 21,3 kDa Untereinheiten für das Anbringen von His- oder Strep-II Tags ausgewählt. Durch Erzeugung der zusätzlichen Doppelmutante *nuo21,3/78* bestand die Möglichkeit durch heterologe Integration von entsprechend ausgestatteter cDNA die 20,9 und 21,3 kDa Untereinheiten jeweils mit Tags zu versehen und damit den Membranarm durch Affinitätschromatographie zu isolieren.

Die benötigten Vektoren erforderten Selektionsmarker, einen Promotor und die jeweilige, um die Tag-Sequenz erweiterte kodierende Sequenz der Untereinheit. Als Selektionsmarker wurde das Resistenzgen gegen Ampicilin für eine Selektion in *E. coli* und gegen BASTA für eine Selektion in *N. crassa* eingesetzt. Als eukaryotischer Promotor diente der Promoter des mitochondrialen Acylcarrierproteins aus *A. niger*. Die benötigten kodierenden DNA-Sequenzen der beide Untereinheiten wurden durch PCR aus einer cDNA Genbank erhalten. Durch die Wahl der Primer wurden alle nötigen Mutationen durchgeführt. Die notwendigen Mutationen umfaßten das Erweitern um die Tag-Sequenz, das Einführen der benötigten Restriktionsschnittstellen und die Beseitigung einer störenden Schnittstelle in der cDNA der 21,3 kDa Untereinheit.

Keine der so erzeugten Mutanten führte zur Assemblierung des mit Affinitäts-Tag versehenen Membranarms. Die Mutanten konnten in drei Typen eingeteilt werden. In Typ I wurde keine nachweisbare Menge der veränderten Untereinheit gebildet, in Typ II wurde die mit Tag versehene Untereinheit synthetisiert, aber nicht in die Mitochondrien transportiert und in Typ III wurde die Untereinheit mit Tag synthetisiert und von den Mitochondrien importiert, der Membranarm wurde aber nicht assembliert.

Mutanten der Typen I und II (Abb. 17) wurden nur bei Transformanten mit der modifizierten cDNA der 20,9 kDa Untereinheit erhalten. Sowohl die transformierten Einfachmutanten vom Typ I als auch die vom Typ II bildeten nur den peripheren Arm (Abb. 18). Beim Typ I war die 20,9 kDa Untereinheit weder im Cytosol noch in den Mitochondrien nachweisbar. Dieses negative Ergebnis kann auf eine Integration des Vektors in einen für die RNA-Polymerase schwer zugänglichen Teil des Genoms oder auf einen teilweisen Abbau des Vektors zurückgeführt werden. Bei bisherigen Komplementationen von *N. crassa* durch Ersatz eines defekten Gens durch eine ektopisch integrierte cDNA wurde dieser Fall nicht beobachtet. Diese Versuche beschränkten sich jedoch auf Untereinheiten des peripheren Arms. Womöglich spielt bei der Komplementation die Hydrophobizität der Untereinheit, oder die Tatsache, daß es sich beim Ziel der Untereinheit um die innere Mitochondrienmembran handelt, eine erschwerende Rolle.

Wie die am carboxyterminalen Ende angebrachte Tag-Sequenz bei den Mutanten von Typ II mit den Importmechanismen der Mitochondrien in Wechselwirkung tritt und den Import verhindert, wurde im Zuge dieser Arbeit nicht untersucht. Der mitochondriale Import von Proteinen wird in der Regel von aminoterminalen Importsequenzen dirigiert. Diese zeichnen sich durch eine Häufung positiv geladener Aminosäureseitenketten am Aminoterminal in Verbindung mit Serin- und Threoninresten aus. Zusammen mit den für solche Sequenzen typischen hydrophoben Resten bilden sie eine amphipathische α -Helix- oder β -Faltblattstruktur, welche den Import initiiert (Heijne, 1986). Es wurde auch ein mitochondrialer Import über eine carboxyterminale Sequenz gleicher Eigenschaften beschrieben (Lee *et al.*, 1999). Die Sequenz der 20,9 kDa Untereinheit weist an ihrem Aminoterminal zahlreiche Serin- und Threoninreste auf, zusammen mit unpolaren und positiv geladenen Resten ergibt sich das typische Bild einer mitochondrialen Importsequenz. Der Carboxyterminus weist mehr negativ geladene Aminosäureseitenketten auf als positiv und Serin wie auch Threonin kommen nur selten in den terminalen 35 Aminosäuren vor. Es war daher anzunehmen, daß die 20,9 kDa Untereinheit regulär über ihren Aminoterminal dirigiert wird. Eine Beeinträchtigung des Imports durch eine Erweiterung des Carboxyterminus um 6 bzw. 8 Aminosäuren war nicht zu erwarten. Da Proteine nur dann in die Mitochondrien gelangen, wenn sie nicht in einer stabilen Konformation gefaltet sind, könnte es sein, daß die Aminosäurereste des His-Tags in Verbindung mit der Sequenz der 20,9 kDa Untereinheit zur spontanen Ausbildung einer stabilen Sekundärstruktur führen, durch die der Import verhindert wird.

Mutanten des Typ III (Abb. 19) wurde bei Transformationen mit der veränderten cDNA der 21,3 kDa Untereinheit beobachtet. Die um die Tag-Sequenz verlängerte Untereinheit wurde in die Mitochondrien importiert, der Membranarm wurde aber nicht über seine zwei Vorstufen hinaus assembliert und konnte damit auch nicht mit dem peripheren Arm zum Komplex I vereinigt werden. Die 21,3 kDa Untereinheit der kleinen und die 10,4 kDa Untereinheit der großen Vorstufe lassen sich durch Affinitätschromatographie von einander trennen. Dabei wird am Säulenmaterial nur ein geringer Teil der über den Western-Blot nachweisbaren 21,3 kDa Untereinheit gebunden. Ob dies an einer verborgenen Lage der Tag-Sequenz im Protein oder an einer geringen Affinität mit ungünstiger Gleichgewichtslage liegt, wurde nicht

untersucht. Offenbar befindet sich das carboxyterminale Ende der 21,3 kDa Untereinheit an einer für die Assemblierung kritischen Stelle, so daß schon eine kleine Veränderung um 6 bzw. 8 Aminosäuren den ordnungsgemäßen Einbau verhindert.

Das Anbringen sowohl von Strep-II Tags als auch von His-Tags an unterschiedliche Untereinheiten des peripheren Arms von Komplex I aus *N. crassa* führte zur Assemblierung der mit Tag versehen Proteinkomplexe. Diese wurden aber mit nur sehr geringer Ausbeute von dem Säulenmaterial gebunden, so daß sich eine Reinigung auf diesem Weg als wenig vorteilhaft erwies (Heimlich, 1999; Ailyati, 2001). Erfolgreicher waren die Versuche mit anderen Organismen, sie führten zu einem Komplex I bzw. zu einem Subkomplex der durch Affinitätschromatographie gut zu reinigen war. Der mit einem His-Tag versehene Komplex I aus *Yarrowia lipolytica* lies sich durch Affinitätschromatographie rein gewinnen (Kashani-Poor *et al.*, 2001). Ebenso ist es gelungen das NADH-Dehydrogenasefragment des Komplex I aus *E. coli* nach Einführung eines Strep-II Tags durch Affinitätschromatographie zu isolieren (Bungert, 1999). In Beiden Fällen wurde mit Untereinheiten gearbeitet, die denen des peripheren Arms in *N. crassa* entsprechen. Ob der Membranarm besonders empfindlich auf Veränderungen seiner Untereinheiten reagiert, bleibt nach der Untersuchung von nur zwei Untereinheiten unbeantwortet. Um dies zu untermauern oder zu widerlegen könnte ein Tag an die 10,4 kDa Untereinheit des Membranarms angebracht werden, da auch zu dieser Untereinheit in unserem Institut eine Deletionsmutante vorliegt.

6. Literatur

- Abelmann, A. (2000) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation, HHU Düsseldorf
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., Walker, J. E., (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- Ailyati, A. (2001) Einführung einer Affinitätsmarkierung in den Komplex I aus *Neurospora crassa*. Diplomarbeit HHU Düsseldorf
- Amling, N. (1996) UV/VIS-spektroskopischer Nachweis einer unbekanntenen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I. Dissertation HHU Düsseldorf
- Arganoza, M. T., Min, J., Hu, Z., Akins, R. A., (1994) Distribution of seven homology groups of mitochondrial plasmids in *Neurospora*: evidence for widespread mobility between species in nature. *Curr. Genet.* **26**, 62-73
- Attardi, G., Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria, *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333
- Azevedo, J. E., Duarte, M., Belo, J. A., Werner, S., Videira, A., (1994) Complementary DNA sequences of 24 kDa and 21 kDa subunits of complex I from *Neurospora*. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 159-161
- Bayer, E., Gugel, K. H., Hägele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., König, W. A., Zähler, H. (1972) Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen: Phosphinothricin und Phosphinotricyl-Alanyl-Alanin. *Helv. Chim. Acta* **55**, 225-239

-
- Beisenherz, G., Boltze, H. J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K. H., Meyer-Arendt, E., Pfeleiderer, G. (1953) Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyrovat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. Z. Naturforsch. **8b**, 555-557
- Böttcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L., Friedrich, T. (2002) A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). J. Biol. Chem., im Druck
- Braun, M., Bungert, S., Friedrich, T., (1998) Characterization of the overproduced NADH Dehydrogenase Fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. Biochemistry **37**, 1861-1867
- Brunelli J. P., Pal M. L. (1993) A series of Yeast / *Escherichia coli* λ expressionvectors designed for directional cloning of cDNA and *cre* / *lox*-mediated plasmid excision. Yeast **9**, 1309-1318.
- Bungert, S., (1999) Isolierung und Kristallisation des NADH-Dehydrogenase Fragmentes der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und des Ferritins aus *Escherichia coli*. Dissertation
- Case, M. E., Schweizer, M., Kushner, S. R., Giles, N. H. (1979) Efficient transformation of *Neurospora crassa* by utilizing hybrid plasmid DNA. Pro. Natl. Acad. Sci. USA **76**, 5295-5263
- Chen, S., Guillory, R. J. (1981) Studies on on the interaction of arylazido- β -alanyl NAD⁺ with the mitochondrial NADH dehydrogenase. J. Biol. Chem. **256**, 8318-8332
- Church G. M., Gilbert W. C. (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1991-1995

-
- D'Aquila, R. T., Bechtel, L. J., Videler, J. A., Eron, J. J., Gorczyca, P., Kaplan, J. C. (1991) Maximising sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. *Nucl. acids Res.* **19**, 3749
- Davis, R., de Serres, F., (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **17a**, 79-143
- De Blas, A. L. und Cherwinski, H. M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **133**, 214-219
- Deng, P. S., Hatefi, Y., Chen, S. (1990) N-arylazido- β -alanyl-NAD⁺, a new NAD⁺photoaffinity analogue. Synthesis and labeling of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochemistry* **29**, 1094-1098
- Douce, R., Neuburger, M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371-414
- Duarte, R., Videira, A. (1995) Inactivation of genes encoding subunits of the peripheral and membran arms of *Neurospora crassa* mitochondrial complex I and effects on enzyme assembly. *Genetics* **139**, 1211-1221
- Duarte, M., Schulte, U., Videira, A. (1997) Identification of the TYKY homologous subunit of complex I from *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **1322**, 237-241
- Ducruix, A., Giege, R. (1992) Crystallization of nucleic acids and proteins, A practical Approach. Oxford University Press
- Dunbar, B. S. (1987) Two dimensional gel electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press, New York
- Earley, F. G. P., Patel, S. D., Ragan, C. I., Attardi, G. (1987) Photolabeling of a mitochondrially encoded subunit NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. *FEBS Lett.* **229**, 108-113

-
- Fecke, W., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H. (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 sulfur cluster N3. Eur. J. Biochem. **220**, 551-558
- Fecke, W. (1994) Inaktivierung von Genen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*: Isolierung und Charakterisierung des teilassemblierten Enzymkomplexes. Dissertation HHU-Düsseldorf
- Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**, 6-13 sowie die Ergänzung: 1984; gleicher Titel; Anal. Biochem. **137**, 266.
- Fincham, J. R. S. (1989) Transformation in Fungi. Microbiol. Rev. **53**, 148-170
- Finel, M., Skehel, S. P., Albracht, S. P. J., Fearnley, I. M., Walker, J. E. (1992) Resolution of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from bovine heart mitochondria in 2 subcomplexes, one which contains the redox centers of the enzyme. Biochemistry **31**, 11425-11434
- Finel, M., Majander, A. S., Tyynelä, J., De Jong, A. M. P., Albracht, S. P. J., Wikström, M. (1994) Isolation and characterisation of subcomplexes of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). Eur. J. Biochem. **226**, 237-242
- Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B., Weiss, H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem. **180**, 173-180
- Friedrich, T., Weidner, U., Nehls, U., Fecke, W., Schneider, R., Weiss, H. (1993) Attempts to define distinct parts of NADH:ubiquinon oxidoreductase (complex I). J. Bioenerg. Biomembr. **25**, 331-337
-

-
- Friedrich, T., Weiss, H. (1997) Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone Oxidoreductase and origin of its Modules. *J. theor. Biol.* **187**, 529-540
- Friedrich, T., Brors, B., Hellwig, P., Kintscher, L., Rasmussen, T., Scheide, D., Schulte, U., Mäntele, W., Weiss, H. (2000) Characterization of two novel redoxgroups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductasi (complex I) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309.
- Gonzales, A., Jimenez A., Vazquez, D., Davies, J., Schindler, D. (1978) Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim. Biophys. Acta* **521**, 459-469
- Griffiths, A. J. F., Collins, R. A., Nargang, F. E. (1995) Mitochondrial Genetics of *Neurospora*. In U. Kück (ed), „The Mycota II: Genetics and Biotechnology“, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 7, 93-105
- Guénebaut, V., Vincentelli, R., Milles, D., Weiss, H., Leonard, K. (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J. Mol. Biol* **265**, 409-418
- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., Friedrich, T. (1998) Consistent Structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone Oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.* **276**, 105-112
- Gutman, M., Singer, T. P., Beinert, H. (1972) Relation of the respiratory chain-linked reduced nicotinamide-adenine dinucleotide dehydrogenase to energy-coupling site 1. *Biochemistry* **11**, 556-562
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-565

-
- Harkness, T. A. A., Rothery, R. A., Weiner, J. H., Azevedo, J. E., Videira, A., Nargang, F. E. (1995) Disruption of the Gen encoding the 78-kDa subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation (RIP). *Curr. Genet.* **27**, 339-350
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann Rev. Biochem.* **54**, 1025-1069
- Heijne, G. von (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.*, **5**, 1335-1342
- Heimlich, G. (1999) Einsatz der Strep-Tag/Strep Tactin Affinitätschromatographie zur Isolierung des Komplex I aus *Neurospora crassa*. Diplomarbeit HHU Düsseldorf
- Hesterberg, M., (2002) Charakterisierung einer unbekanntenen Redoxgruppe sowie der Konformation der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Escherichia coli*. Dissertation
- Hinnen, A., Hicks, J. B., Fink, G. R. (1978) Transformation of yeast chimeric Col E1 plasmid carrying LEU2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933
- Holmes, D.S., Quigley M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197
- Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J. Mol. Biol.* **221**, 1027-1043
- Huebschmann, C., (1952) A method of varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. *Mycologia* **44**, 599-604
- Ingladew; J. W., Onishi, T. (1980) An analysis of some Thermodynamic properties of Iron-Sulfur centres in site I of mitochondria. *Biochem. J.* **186**, 111-117

-
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswaamy, S., Jap, B. K. (1995) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* **281**, 64-71
- Kinsey, J. A., Rambosek, J. (1984) Transformation of *Neurospora crassa* with the cloned am (glutamate dehydrogenase) gene. *Mol. Cell Biol.* **4**, 117-122
- Krüll, C. (1995) Spezifische Mutagenese der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*. Dissertation HHU-Düsseldorf
- Kueffner R., Rohr A., Schmiede A., Krüll C., Schulte U. (1998) Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.* **283**, 409-17
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; **227**, 680-5.
- Lange, C., Hunte, C. (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome bc₁ complex with its bound substrate cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (5) 2800-2805
- Lee C. M., Sedman J., Neupert W., Stuart R. A. (1999) The DNA helicase, Hmi1p, is transported into mitochondria by a C-terminal cleavable targeting signal. *J Biol Chem* **274** 20937-42
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., Friedrich, T. (1995) Isolation and characterisation of the poron-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 538-548
- Lemke, P. A., Peng, M., (1995) Genetic Manipulation of fungi by DNA-mediated transformation. In U. Kück (Ed), „The Mycota II: Genetics and Biotechnology“, Springer Verlag Berlin Heidelberg, Chapter 8, 109-139

-
- Li, Q., Ritzel, R. G., McLean, L. L., McIntosh, L., Ko, T., Bertrand, H., Nargang, F. E. (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*. *Genetics* **142**, 129-140
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Luttik, M. A., Overkamp, K. M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J. P. Pronk, J. T. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* **273**, 24529-24534
- Marres, C. A., de Vries, S., Grivell, L. A. (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenon-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **195**, 857-862
- Mathews, R., Charlton, S., Sands, R. H., Palmer, G. (1974) On the nature of the spin coupling between the iron-sulfur clusters in eight-iron ferredoxins. *J. Biol. Chem.* **249**, 4326-4328
- Mathews, F. S. (1991) New flavoproteins. *Curr. Opin. in Struct. Biol.* **1**, 954-967
- Mc Pherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* **182**, 1-23
- Michel, H. (1998) The mechanism of proton pumping bei cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 12819-12824
- Mills, D. A., Ferguson-Miller, S. (1998) Proton uptake and release in cytochrome c oxidase: separate pathways in time and space? *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 46-52

- Mitchel, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type mechanism. *Nature* **191**, 144-148
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350
- Nehls, U., Friedrich, T., Schmiede, A., Ohnishi, T., Weiss, H., (1992) Characterization of assembly intermediates of NADH:ubichinon oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption. *J. Mol. Biol.* **227**, 1032-1042
- Nicholls, D. G., Ferguson, S. J. (1992) *Bioenergetics 2*. Academic Press, London
- Orbach, M. J., Vollrath, D., Davis, R. W., Yanofski, C., (1988) An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. *Mol. Cell Biol.* **8**, 1469-1473
- Perkins, D. D., Radford, A., Newmeyer, D., Björkman, M., (1982) Chromosomal loki of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev* **46**, 426-570
- Pilkington, S. J., Arizmendi, J. M., Fearnley, I. M., Runswick, M. J., Skehel, J. M., Walker, J. E. (1993) Structural organisation of complex I from bovine mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 26-31
- Pomès, R., Hummer, G., Wikström, M. (1998) Structure and dynamics of a proton shuttle in cytochrom c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 255-260
- Potter, H. (1988) *Electroporation in biology: methods, application, instrumentation.* *Anal. Biochem.* **174**, 361-373

Preis, D., Weidner, U., Conzen, C., Azevedo, J., Nehls, U., Röhlen, D., Van der Pas, J., Sackmann, U., Schneider, R., Werner, S., Weiss, H. (1991) Primary structures of two subunits of NADH:ubiquinone reductase from *Neurospora crassa* concerned with NADH-oxidation. Relationship to a soluble NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1090**, 133-138

Ragan, C. I., Galante, Y. M., Hatefi, Y., Ohnishi, T. (1982) Resolution of mitochondrial NADH dehydrogenase and isolation of two iron-sulfur proteins. *Biochemistry* **21**, 590-594

Ragan, C. I., Hatefi, Y. (1987) Isolation of the iron-sulfur-containing polypeptides of NADH:ubiquinone oxidoreductase. *Meth Enzymol.* **126**, 360-369

Rasmussen T, Scheide D, Brors B, Kintscher L, Weiss, H, Friedrich T. (2000) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **40**, 6124-6131

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. **2. Aufl.** Cold Spring Harbour, New York Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Schmidt, T. G. M., Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996) Molekular interactions between the Strep-tag affinity peptide and ist cognate target streptavivin. *J. Mol. Biol.* **255**, 753-766

Schneider, R. (1994) Die Bedeutung des mitochondrialen Acyl Carrier Proteins für die oxidative Phosphorylierung in *Neurospora crassa* und *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation

-
- Schneider, R., Massow, M., Lisowsky, T., Weiss, H. (1995) Different respiratory defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein. *Curr. Genet.* **29**, 10-17
- Schulte, U., Fecke, W., Krüll, C., Nehls, U., Schmiede, R., Onishi, T., Weiss, H. (1994) in vivo dissection of the mitochondrial respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 121-124
- Schulte, U., Weiss, H. (1995) Generation and characterization of NADH:ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **260**, 3-14
- Schulte, U., Weiss, H. (1997) Structure, function and biogenesis of respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). In „Frontiers of cellular bioenergetics. Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology“ (Papa, S., Guerrieri, F., Tager, J. M., Eds.) Plenum Press, London
- Schulte, U., Abelmann, A., Amling, N., Brors, B., Friedrich, T., Kintscher, L., Rasmussen, T., Weiss, H. (1998) Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy. *BioFactors* **8**, 177-186
- Schulte, U., Becker, I., Mewes, H. W., Mannhaupt, G. (2002) Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. *J. Biotech.* **94**, 3-13
- Schwitzguébel, J. P., Palmer, J. M. (1982) Properties of mitochondria as a function of the growthstage of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol* **149**, 612-619
- Siedow, J. N. (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. In Zeltich, I. (Ed.) *Plant biology* 10, Wiley-Liss, New York.
- Singh, A., Ursic, D., Davies, J. (1979) Phenotypic suppression and misreading in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **277**, 146-148

-
- Small, W. C., McAllister-Henn, L. (1998) Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. **180**, 4051-4055
- Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J., Selker, E. (1989) Use of a bacterial hygromycin resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. Fung. Genet. Newsl. **36**, 79-81
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel Electrophoresis. J. Mol. Biol.; **98**, 503-17 .
- Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl. Acad. Sci. **76**, 4350-4353
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. Science **269**, 1069-1074
- Tuschen, G., Sackmann, U., Nehls, U., Haiker, H., Buse, G., Weiss, H. (1990) Assembly of NADH:ubichinon reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. J. Mol. Biol. **213**, 845-857
- Vogel, H. J. (1956) A convenient growth media of *Neurospora crassa*. Microbiol. Genet. Bull. **13**, 42-47
- Voss, S., Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improves performance in recombinant protein purification. Protein Eng. **10**, 975-982.
- de Vries, S. Grivell, L. A. (1988) Purification and characterisation of a rotenone-insensitiv NADH-Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. **40**, 377-384

-
- Walker, J. E. (1992) The NADH:ubiquinon oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. Quarterly reviews of Biophysics **25**, 253-324
- Wang, D. C., Meinhardt, S. W., Sackmann, U., Weiss, H., Ohnishi, T, (1991) The iron-sulfur clusters in the two related forms of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*. Eur. J. Biochem. **197**, 257-264
- Weiss, H., Friedrich, T. (1991) Redox-Linked proton translocation by NADH-ubiquinone Reductase (complex I). J. Bioenerg. Biomembr. **23**, 743-754
- Weiss, H., Jagow, G., Klingenberg, M., Büchner, T. (1970) Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria: preparation with a grind-mill. Eur. J. Biochem. **14**, 75-82
- Wobschall, U., (1997) Gezielte mutagenese von Eisen-Schwefel-Zentren in der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Neurospora crassa*. Dissertation HHU-Düsseldorf
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, M. W. (1989) Quantitativ evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. Nucl. Acids Res. **17**, 3469-3478
- Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrom bc₁ complex from bovine heart mitochondria. Science **277**, 60-66
- Yagi, T. (1993) The bacterial energy-transducing NADH:quinone oxidoreductase. Biochim, Biophys. Acta **1141**, 1-17
- Yang, X., Griffiths, A. J. F. (1993) Plasmid diversity in senescent and nonsenescent strains of *Neurospora*. Mol. Gen. Genet. **237**, 177-186

Yanisch-Perron, C., Videira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-119.

Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J. (1996) Crystallisation and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrom bc₁ complex. *Biochim Biophys. Acta* **1275**, 47-53

Yu, C. A., Zhang, L., Deng, K. A., Tian, H., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J., Yu, L. (1999) Structure and reaction mechanisms of multifunctional cytochrom bc₁ complex. *Biofactors* **9**, 103-109

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A., Kim, S.H. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature* (1998) **392**, 677- 684