

**Verfahren zur Isolierung ungezielt erzeugter  
NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Mutanten  
von *Neurospora crassa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von  
**Wasiliki Tsalastra**  
aus Hannover

Düsseldorf 2004

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

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiss

2. Referent: Prof. Dr. Michael Bott

Tag der Prüfung: 29. Januar 2004

Viel denken, nicht viel Wissen soll man pflegen.

Demokrit, griech. Naturphilosoph, 460-370 v. Chr.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	3
2.1 Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung.....	3
2.1.1 NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I).....	4
2.1.2 Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III).....	7
2.1.3 Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) .....	10
2.2 Verzweigte mitochondriale Atmungskette .....	13
2.3 Biosynthese der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe .....	16
2.4 Der Pilz <i>N. crassa</i> als Modellorganismus .....	18
2.5 Komplex I-Mutanten von <i>N. crassa</i> .....	22
2.6 Ungezielte Mutagenese von <i>N. crassa</i> .....	26
2.6.1 Ausprägung der Phänotypen .....	28
2.7 Filtrations-Anreicherungsverfahren .....	29
2.8 Induzierbarer qa Promoter .....	31
2.9 Ziel und Strategie der Arbeit.....	33
<b>3. Material und Methoden</b> .....	34
3.1 Medien und Lösungen.....	34
3.2 Mikroorganismen, Vektoren und Oligonukleotide .....	36
3.3 Anzucht der Mikroorganismen.....	37
3.3.1 Kultivierung von <i>N. crassa</i> unter Kupfer-limitierten Bedingungen ....	38
3.3.2 Zuckerbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie.....	39
3.4 Präparation und Auftrennung von Mitochondrienproteinen aus <i>N. crassa</i> .	39
3.5 Verschiedene proteinchemische und analytische Methoden.....	40
3.6 Transformation von Mikroorganismen .....	41
3.7 DNA Isolierung .....	42
3.8 Molekularbiologische Methoden .....	43
3.9 Mutagenese von <i>N. crassa</i> mit ultravioletter Strahlung und Filtrations- Anreicherung .....	45

<b>4. Ergebnisse</b> .....	46
4.1 Auswirkungen defekter Atmungskettenkomplexe auf das Wachstum von <i>N. crassa</i> .....	46
4.1.1 Genausstattung, Wachstum und Atmungsaktivität einer Komplex III-Mutante von <i>N. crassa</i> .....	46
4.1.2 Letalität von Komplex I-/Komplex III-Doppelmutanten .....	48
4.2 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten in Kupfer-mangel Medium.....	48
4.3 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten in Antimycin-haltigem Medium .....	52
4.4 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten durch transkriptionale Regulation von Komplex III.....	55
4.4.1 Konstruktion des pMUCO5c .....	55
4.4.2 Transformation der <i>uco5</i> -Mutante mit pMUCO5c .....	57
4.4.3 Eigenschaften der Transformanden.....	60
4.4.4 Kreuzung der regulierbaren Komplex III-Mutante <i>cuco5</i> mit der Komplex I-Mutante <i>nuo20.9</i> .....	61
4.4.5 Einfluss des Komplex I-Defektes auf das Wachstum der <i>cuco5</i> -Mutante .....	64
4.4.6 Anwendung der Filtrations-Anreicherung zur Selektion von Komplex I-Mutanten.....	69
4.4.7 Mutagenisierung der <i>cuco5</i> -Mutante durch UV-Behandlung .....	72
<b>5. Diskussion</b> .....	76
5.1 Randbedingungen zur Identifizierung ungezielt erzeugter Komplex I-Mutanten .....	76
5.2 Die Auswirkung von defekten Atmungskettenkomplexen in <i>N. crassa</i> .....	77
5.3 Kupfer-limitiertes Medium zur Selektion von Komplex I-Mutanten .....	79
5.4 Selektion von Komplex I-Mutanten durch Hemmung von Atmungskettenenzymen .....	80
5.5 Transkriptionale Regulation der Komplex III-Aktivität.....	82
5.5.1 <i>cuco5</i> -Mutante .....	83
5.5.2 Einfluss eines Komplex I-Defektes in <i>cuco5</i> -Mutanten .....	84

5.5.3 Anwendung der <i>cuco5</i> -Mutante zur Selektion von Komplex I-Mutanten.....	85
5.6 Ausblick.....	86
<b>6. Literatur .....</b>	<b>89</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Biogenese von Enzymkomplexen der mitochondrialen Atmungskette benötigt eine Vielzahl von Hilfsproteinen. Große Fortschritte in der Aufklärung der Biogenese von Komplex III und IV konnten durch unspezifisch erzeugte Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae*, die einen Defekt in den Enzymen aufwiesen, erzielt werden. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt jedoch keinen Komplex I. Zur Untersuchung von Komplex I eignet sich als eukaryotischer Modellorganismus der Hyphenpilz *Neurospora crassa*, dessen Komplex I starke Ähnlichkeit zu Säugerenzymen zeigt. Eine genetische Manipulation von Atmungskettenenzymen ist möglich, weil zusätzlich zur Enzymausstattung von Säuger-Atmungsketten alternative nicht-protonenpumpende Enzyme vorhanden sind. Bis jetzt wurden Komplex I-Mutanten von *N. crassa* durch gezielte Inaktivierung von nukleären Genen, die für eine Untereinheit kodieren, gebildet. Die gezielte Mutagenese ist jedoch beschränkt auf bekannte Gene. Einen Zugang zu bisher nicht identifizierten Proteinen, die beispielsweise an der Biosynthese beteiligt sind, eröffnet nur eine ungezielte Mutagenese. Da Komplex I-Mutanten keinen auffälligen Phänotyp haben, ist eine effektive Selektion entsprechender Mutanten aus der Vielzahl von Klonen nach einer mutagenen Behandlung, Voraussetzung für die Isolierung der Mutanten.

In dieser Arbeit wurden Bedingungen gesucht, die zu einer Blockierung des Elektronenweges von Ubichinol auf Sauerstoff über die protonenpumpenden Enzymkomplexe III und IV führen und daher zur Selektion von Komplex I-Mutanten, basierend auf einer spezifischen Verzögerung des Wachstums, geeignet sind. Zu einer Blockierung des Elektronenweges führen die Kultivierung in Abwesenheit eines essentiellen Faktors zur Bildung der Komplexe, wie zum Beispiel Kupfer für Komplex IV, Hemmstoffe der Enzyme (Antimycin) oder inaktivierte Gene, die in einem Enzymdefekt resultieren (Komplex III- bzw. IV-Mutanten). Diese drei Störungen wurden überprüft und verglichen.

Als erfolgreich erwies sich eine regulierbare, genetische Inaktivierung von Komplex III. Dafür wurde der Promotor des *uco5*-Gens, das für die FeS-Untereinheit von Komplex III kodiert, durch den Chinasaure-induzierbaren *qa2*-Promotor ersetzt. Diese *cuco5*-Mutante zeigt bei Anwesenheit von Chinasaure im Medium eine hohe

Komplex III-Aktivität, während die Abwesenheit des Induktors eine Beeinträchtigung hervorruft. Durch Kreuzung mit der Komplex I-Mutante *nuo20.9* wurde eine Doppelmutante isoliert, die als Referenz fungierte. Es wurden Bedingungen ausgearbeitet, die eine eindeutige Differenzierung im Wachstum zwischen Stämmen mit und ohne Komplex I-Defekt gewährleisten. Demnach ist eine Selektion von Komplex I-Mutanten bei Verwendung der *cuco5*-Mutante, basierend auf das Wachstum möglich.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung

Heterotrophe eukaryotische Organismen schöpfen einen Großteil ihrer Energie aus dem in der inneren Mitochondrienmembran gelegenen System der oxidativen Phosphorylierung (Abb. 1). Es besteht im wesentlichen aus den drei Atmungskettenkomplexen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Ubichinol: Cytochrom *c* Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV), die den exergonen Elektronentransport von NADH auf molekularen Sauerstoff mit einer endergonen Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran koppeln (Hatefi, 1985), und dem ATPase-Komplex, der das elektrochemische Potential des erzeugten Protonengradienten zur Synthese von ATP aus ADP und Phosphat nutzt (Mitchell, 1961; Abrahams et al., 1994).

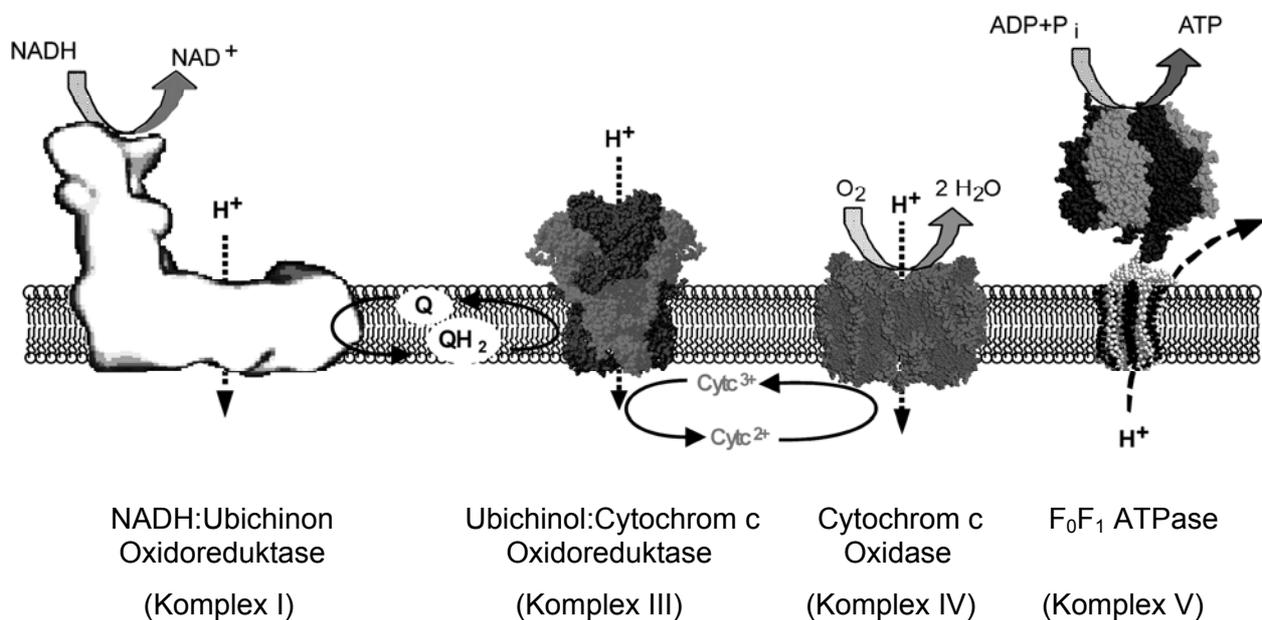


Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Die Struktur von Komplex I basiert auf einer Rekonstruktion aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen. Die Kugelmodelle entsprechen der Kristallstrukturen der Komplexe III, IV und V. Die Position der Membran ist durch ein graues Band angedeutet. Q steht für Ubichinon, QH<sub>2</sub> für Ubichinol und Cyt *c* für Cytochrom *c*.

Die Strukturen der Komplexe III und IV und der ATPase sind atomar durch Kristallstrukturanalyse aufgelöst (Yu *et al.*, 1996; Tsukihara *et al.*, 1996; Abrahams *et al.*, 1994) und ermöglichen eine detaillierte Beschreibung von Elektronentransfer und Protonentransport. Dagegen ist es noch nicht gelungen Komplex I zu kristallisieren. Die niedrig aufgelöste Struktur basiert auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Komplex I Einzelpartikel (Guénebaut *et al.*, 1998).

### 2.1.1 NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I)

Die Rotenon-sensitive NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, der sog. Atmungskettenkomplex I, katalysiert die erste Reaktion in vielen bakteriellen und in der mitochondrialen Atmungskette, die Dehydrierung von NADH und den Transfer von zwei Elektronen zu Ubichinon. Damit verbunden ist eine Translokation von vier Protonen über die bakterielle Cytoplasmamembran bzw. die innere Mitochondrienmembran nach folgender Gleichung:



In der Gleichung stehen die Indizes I für die negativ geladene Innenseite der Membran und A für die positiv geladene Außenseite der Membran. Q<sub>10</sub> steht für Ubichinon-10 und Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub> für Ubichinol-10.

Prokaryotische und eukaryotische Komplexe unterscheiden sich in ihrer Proteinausstattung, enthalten jedoch im wesentlichen die gleichen prosthetischen Gruppen (Guénebaut *et al.*, 1998). Durch Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Komplex I Präparationen aus *N. crassa* und *E. coli* wurde die dreidimensionale Struktur ermittelt (Abb. 2; Guénebaut *et al.*, 1997). Die in Abbildung 2 dargestellte Überlagerung der Modelle zeigt in beiden Fällen eine L-förmige Struktur (Hofhaus *et al.*, 1991), dessen beide Arme etwa gleich lang sind und ungefähr senkrecht zueinander stehen. Ein Arm ist in die Membran eingebettet, der andere, periphere Arm ragt in die mitochondriale Matrix bzw. in das Cytoplasma. Neuere elektronenmikroskopische Untersuchungen von *E. coli* Komplex I zeigen bei niedrigen Salzkonzentrationen eine hufeisenförmig gefaltete Struktur (Böttcher *et al.* 2002).

Der bakterielle Komplex I stellt eine Minimalform aus 14 Untereinheiten dar (Weidner *et al.*, 1993; Leif *et al.*, 1993). Sieben Untereinheiten bilden den peripheren Arm und sieben den Membranarm. Zusätzlich zu den Homologen dieser 14 Untereinheiten sind im eukaryotischen Komplex I (Schulte und Weiss, 1995; Buchanan und Walker, 1996) bis zu 30 weitere Untereinheiten, auch bezeichnet als „akzessorische“ Untereinheiten (Weiss *et al.*, 1991; Walker, 1992; Videira und Duarte, 2001), enthalten. Daraus ergibt sich eine molekulare Masse von etwa 1 MDa gegenüber etwa 500 kDa des prokaryotischen Komplex I.

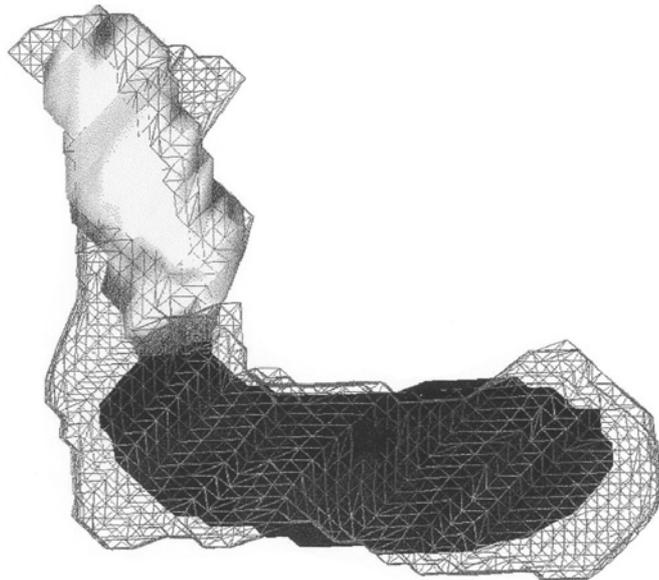


Abb. 2: Überlagerung der dreidimensionalen Bilder von Komplex I aus *E. coli* (ausgefüllt) und *N. crassa* (Gittermodell) errechnet durch Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen (Guénebaut *et al.*, 1998). Der Membranarm ist dunkel, der periphere Arm hell dargestellt.

Die Untereinheiten des Membranarms sind dualgenetischen Ursprungs. Die sieben Homologen zu den bakteriellen Komplex I-Untereinheiten werden von den sog. ND-Genen auf der mitochondrialen DNA kodiert und in den Mitochondrien synthetisiert. Die übrigen Untereinheiten des Membranarms sind wie alle Untereinheiten des peripheren Arms kernkodiert und werden aus dem Cytoplasma posttranslational importiert.

Die NADH Bindestelle und alle bekannten Redoxgruppen sind auf peripheren Untereinheiten lokalisiert. Es handelt sich dabei um ein Flavinmononukleotid (FMN) und bis zu acht Eisen-Schwefel Cluster. In *N. crassa* wurden vier FeS-Cluster ESR-

spektroskopisch nachgewiesen, das binukleäre Cluster N-1 und die tetranukleären Cluster N-2, N-3 und N-4 (Wang *et al.*, 1991). Zwei zusätzliche tetranukleäre FeS-Cluster, N-6a und N-6b, wurden durch UV/VIS-Spektroskopie charakterisiert. Sie werden von einer Untereinheit mit einem hochkonservierten Sequenzbindemotiv eines 8 Fe-Ferredoxin gebunden (Rasmussen *et al.*, 2001). Ein weiteres binukleäres FeS-Zentrum N-1a, wurde in *B. taurus* und ein weiteres tetranukleäres Zentrum, N-5, in *B. taurus* und *Yarrowia lipolytica* ESR-spektroskopisch nachgewiesen (Djafarzadeh *et al.*, 2000). Die konservierten Bindemotive wurden durch Sequenzvergleich in Komplex I-Untereinheiten von *N. crassa* gefunden. Durch spektroskopische Analysen eines, durch gezielte Mutagenese von zwei konservierten Cysteinen, veränderten Komplex I, wurde jüngst das N-2 Cluster der 19.3-kDa Untereinheit von *N. crassa* zugeordnet, was lange als unklar galt (Duarte *et al.*, 2002).

Der Membranarm bildet den Ubichinonreduktionsteil (Friedrich *et al.*, 1990). Zwei Ubichinon-Bindestellen werden diskutiert, da zwei Klassen von Hemmstoffen der Ubichinonreduktion gefunden wurden (Friedrich *et al.*, 1994). Weitere Funktionen konnte den Untereinheiten des Membranarms bisher nicht eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund der großen Potentialspanne zwischen dem FeS-Zentrum N-2 mit dem höchsten Mittenredoxpotential ( $E_{m,7} = -160$  mV) und Ubichinon ( $E_{m,7} = +60$  mV) ist eine zusätzliche Redoxgruppe erforderlich, um eine Umkehr des Elektronenweges zu ermöglichen (Gutman *et al.*, 1972). UV/VIS und FT-IR spektroskopische Untersuchungen von Komplex I aus *N. crassa* und *E. coli* weisen auf das Vorhandensein einer chinoiden Redoxgruppe mit einem Redoxpotential von -80 mV (Schulte *et al.*, 1998; Abelmann 2000; Friedrich *et al.*, 2000).

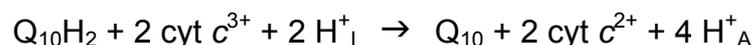
Die akzessorischen Untereinheiten des mitochondrialen Komplex I sind nicht unmittelbar am Elektronen- und Protonentransfer beteiligt. Sie sind um das Grundgerüst aus den zum bakteriellen Komplex I homologen Untereinheiten angeordnet (Walker, 1992; Abb. 2). Den meisten von ihnen konnte noch keine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Möglicherweise schirmen manche Untereinheiten Komplex I vor einem Elektronenverlust ab und verhindern so die Erzeugung von Sauerstoffradikalen (Robinson, 1998). Andere könnten in NADH-

Kanalreaktionen (Fearnley und Warker, 1992) oder in der Bindung von anderen Atmungskomplexen und Proteinen (Budde et al., 2000) involviert sein.

Bei zwei akzessorischen Untereinheiten wird vermutet, dass sie in Biosynthesewegen mitwirken. Ein Acyl Carrier Protein (Schneider et al., 1995) besitzt eine acylierte Phosphopantetheingruppe. Eine ca. 40-kDa Untereinheit ist homolog zu mehreren Reduktasen/Isomerasen auf (Fearnley und Walker, 1992) und besitzt ein fest gebundenes NADPH Molekül (Schulte et al., 1999). Andere Untereinheiten scheinen die Komplex I-Aktivität zu regulieren. Die Phosphorylierung der sog. AQDQ-Untereinheit des *B. taurus*-Komplex I steigert die Enzymaktivität (Scacco et al., 2000). Eine äquivalente Untereinheit wurde in *N. crassa* als 21 kDa-Untereinheit identifiziert (Ferrerinha et al., 1999). Außerdem wurde kürzlich die Ähnlichkeit zwischen der 9.8 kDa-Untereinheit von *N. crassa* bzw. der MWFE Untereinheit in *B. taurus* (Au et al., 1999) mit dem C-terminalen Teil einer Untereinheit der bakteriellen Na<sup>+</sup>-transportierenden NADH:Ubichinon Oxidoreduktase festgestellt (Marques et al., 2003).

### 2.1.2 Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III)

Der Komplex III, nach den enthaltenen Cytochromen auch *bc*<sub>1</sub> Komplex genannt, koppelt die Elektronenübertragung von Ubichinol zu Cytochrom c mit Translokation von zwei Protonen über die innere Mitochondrienmembran (Gennis et al., 1993; Brandt and Trumpower, 1994; Brandt, 1997; Crofts and Berry, 1998) nach folgender Gleichung:



In der Gleichung stehen die Indizes I für die negativ geladene Innenseite der Membran und A für die positiv geladene Außenseite der Membran. Q<sub>10</sub> steht für Ubichinon-10, Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub> für Ubichinol-10 und cyt c für Cytochrom c.

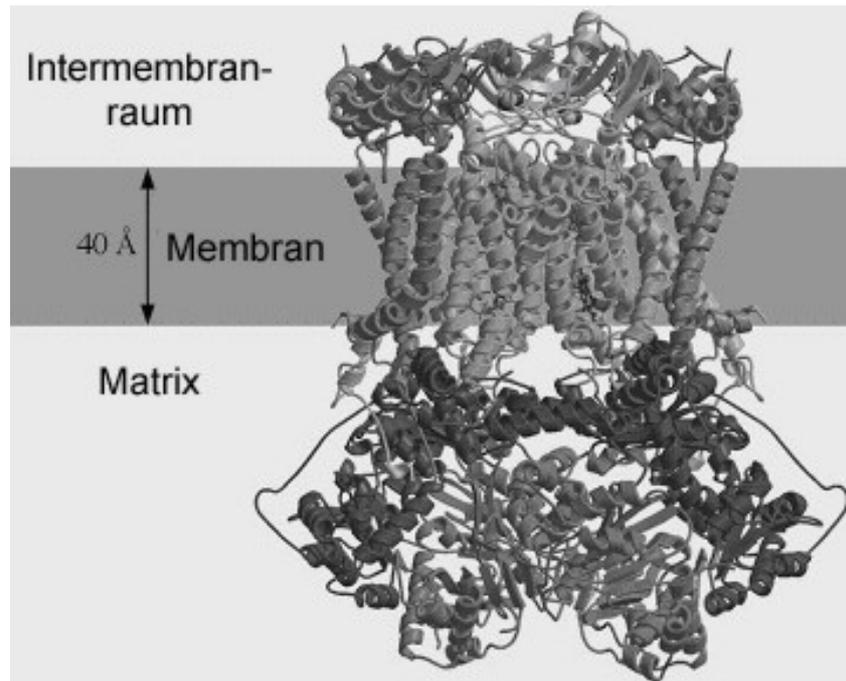


Abb. 3: Kristallstruktur des Komplex III Dimers aus Hühnerherz (Zhang *et al.*, 1998). Die Position der Membran ist durch ein graues Band angedeutet.

Die Kristallstruktur des mitochondrialen Komplex III mehrerer Organismen, Rind (Xia *et al.*, 1997; Iwata *et al.*, 1998), Huhn (Zhang *et al.*, 1998; Abb. 3) und Hefe (Hunte *et al.*, 2000), wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Komplex III ist ein Dimer dessen Monomere aus je 10 oder 11 verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt sind.

Allen  $bc_1$  Komplexen gemeinsam sind drei Untereinheiten mit prosthetischen Gruppen. Eine Cytochrom  $b$ -Untereinheit enthält zwei nicht kovalent gebundene Hämgruppen,  $b_H$  und  $b_L$  (*High-* und *Low-potential* Häm Typ  $b$ ). Sie ist in mehreren membranspannende Helizes gefaltet und wird als einzige Untereinheit mitochondrial kodiert. Cytochrom  $c_1$  enthält eine kovalent gebundene Häm  $c$ -Gruppe und besteht aus einer peripher gelegenen Domäne und einer C-terminalen transmembranen  $\alpha$ -Helix. Die Eisen-Schwefel (FeS)-Untereinheit besteht aus einer N-terminal verankerten transmembranen  $\alpha$ -Helix und einem peripheren Kopf, der ein  $Fe_2S_2$ -Cluster enthält (Brandt und Trumpower, 1994). Der Proteinteil an der Matrixseite des mitochondrialen Komplexes III, der etwa die Hälfte der Masse des Komplexes ausmacht, ist zusammengesetzt aus mehreren Untereinheiten ohne prosthetische Gruppen (Schägger *et al.*, 1995; Cramer *et al.*, 1994; Colson 1993; Trumpower, 1990). Diese überzähligen Untereinheiten sind katalytisch nicht essentiell, da sie im

bakteriellen Enzymkomplex, in dem nur die drei „Redoxproteine“ präsent sind, fehlen (Trumpower, 1991). Die meisten dieser Untereinheiten sind kleine Proteine und ummanteln die katalytischen Untereinheiten. Zwei Untereinheiten (I und II) sind an der Prozessierung importierter Proteine beteiligt (Schulte *et al.*, 1989).

Der Reaktionsverlauf im Komplex III wird durch das Q-Zyklusmodell beschrieben (Abb. 4, Michell, 1976; Crofts, 1985). Zwei separate Ubichinon-Reaktionszentren befinden sich auf der Cytochrom *b*-Untereinheit, das Ubichinol-Oxidationszentrum  $Q_o$  an der positiven Intermembranseite und das Ubichinon-Reduktionszentrum  $Q_i$  an der negativen Matrixseite. Ubichinol bindet an die  $Q_o$  Stelle des Komplexes, wird oxidiert und gibt zwei Protonen in den Intermembranraum ab. Dabei findet eine Gabelung des Elektronenweges statt. Das erste Elektron wird auf das  $Fe_2S_2$ -Cluster ( $E_{m7} = +290$  mV) überführt. Dabei bewegt sich der hydrophile Kopf der FeS-Untereinheit zwischen einer Position nahe zum Häm  $b_L$ , wo es mit Ubichinol interagiert, und einer Position nahe am Häm  $c_1$ , auf das es das Elektron überträgt (Izrailev *et al.*, 1999). Von da aus erreicht das Elektron anschließend das Cytochrom *c*, das als Elektronen-Shuttle wechselweise an Komplex III und Komplex IV bindet (Skulachev, 1998).

Das zweite Elektron wird über die Häme  $b_L$  und  $b_H$  zu einem Ubichinon bzw. Ubisemichinonanion an der  $Q_i$  Stelle übertragen. Zur Bildung des Ubichinol werden dabei zwei Protonen vom Matrixraum aufgenommen. Als Überallesreaktion werden zwei  $QH_2$  Moleküle an der  $Q_o$  Stelle oxidiert, vier Protonen in den Intermembranraum freigegeben, ein Ubichinon an der  $Q_i$  Stelle zu Ubichinol reduziert und dazu zwei Protonen von der Matrix Seite der Membran aufgenommen. Die Kopplung von Oxidations- und Reduktionsreaktionen mit der Abgabe bzw. Aufnahme von Protonen, erlaubt dem Komplex Protonen über die Membran zu transportieren.

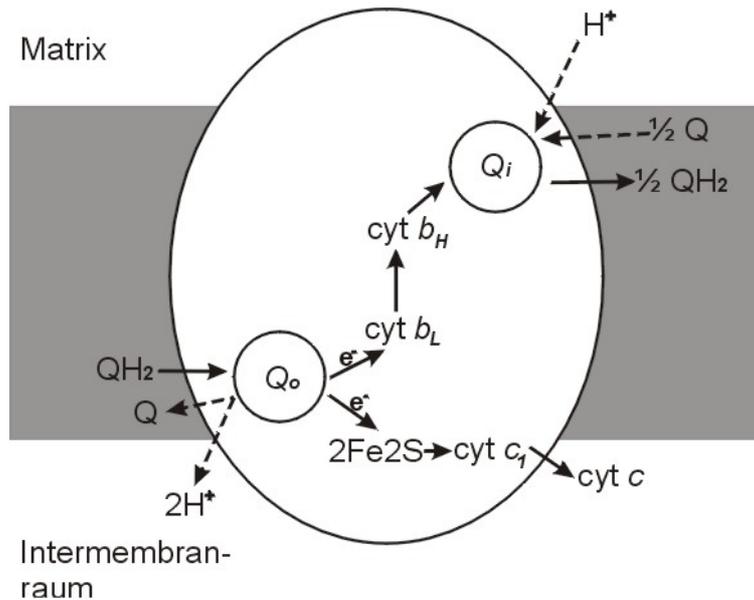
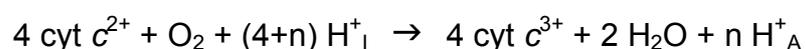


Abb. 4: Katalytischer Mechanismus von Komplex III. Die Oxidation von zwei QH<sub>2</sub> an der Q<sub>o</sub> Stelle sind erforderlich, um die Reduktion eines Q zu QH<sub>2</sub> an der Q<sub>i</sub> Stelle zu ermöglichen. Der schattierte Bereich stellt die Membran dar.

Die Entdeckung zwei verschiedener Inhibitor-Typen war ausschlaggebend für die Entwicklung dieser Q-Zyklus-Hypothese (von Jagow und Link, 1986; Link *et al.*, 1993). Q<sub>i</sub> Inhibitoren, z.B. Antimycin A, hemmen spezifisch den Elektronentransferweg von Häm b<sub>L</sub> zu Ubichinon bzw. Ubisemichinon in der Q<sub>i</sub> Stelle. Q<sub>o</sub> Inhibitoren, z.B. Stigmatellin, blockieren die Bindung von Ubichinol an der Q<sub>o</sub> Stelle.

### 2.1.3 Cytochrom c Oxidase (Komplex IV)

Komplex IV überträgt als terminales Enzym der Atmungskette Elektronen von Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff verbunden mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten (Wikström, 1981). Der gesamte Prozess ist durch die folgende Gleichung beschrieben:



In der Gleichung stehen die Indizes I für die negativ geladene Innenseite der Membran, A für die positiv geladene Außenseite und cyt c für Cytochrom c. Der

reduzierte Sauerstoff bildet mit vier vektoriellen Protonen von der Matrixseite Wasser. Die Anzahl der von Cytochrom c Oxidase transportierten Protonen pro umgesetztes Elektron ist bei Prokaryoten konstant  $1 \text{ H}^+ / \text{e}^-$  (Solioz et al., 1982), während das Verhältnis bei Säugetieren variabel ist (Papa et al., 1991; Capitanio et al., 1991; Frank und Kadenbach, 1996; Michel, 1999).

Komplex III ist ein Mitglied der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidasen (Saraste, 1990). Die Kristallstrukturen der Cytochrom c Oxidase aus *Thermus thermophilus* (Soulimane et al., 2000), *Paracoccus denitrificans* (Iwata et al., 1995; Ostermeier et al., 1997) und *B. taurus* (Tsukihara, 1996; Yoshikawa et al., 1998; Abb. 5) sind aufgeklärt. In Eukaryoten setzt sich Komplex IV aus sieben (*Dictyostelium discoideum*) bis dreizehn Untereinheiten (Säuger) zusammen (Bisson und Schiavo, 1986; Kadenbach et al., 1983).

Zwei Untereinheiten (I und II) enthalten die Cytochrom c Bindestelle und alle katalytisch aktive Zentren und Redoxgruppen (Capaldi, 1990). In Eukaryoten sind die drei größten Untereinheiten I, II und III homolog zu den drei Untereinheiten in Prokaryoten und werden vom mitochondrialen Genom kodiert (Anderson, 1981). Die restlichen zehn kleineren, hauptsächlich regulatorischen Untereinheiten (Trueblood and Poyton, 1987; Schiavo and Bisson, 1989) sind kernkodiert und kommen bei höheren Eukaryoten zum Teil in gewebespezifischen Isoformen vor (Kadenbach et al., 1986, Ewart et al., 1991).

Die Untereinheit I besteht aus 12 transmembranen Helices und enthält die katalytischen Zentren Häm  $a$ , Häm  $a_3$  und  $\text{Cu}_B$ . Zwei Protonenkanäle, bei dem der erste für die Wasserbildung und der zweite für die Pumpaktivität zuständig ist, wurden in ihr lokalisiert. Das Häm  $a_3$  bildet mit  $\text{Cu}_B$  in enger Nachbarschaft ein „binukleäres Reaktionszentrum“, das an der Reduktion von molekularem Sauerstoff beteiligt ist. Diese Stelle ist auch empfänglich für Cyanidanionen oder Kohlenmonoxid als Liganden, die die Aktivität des Komplexes hemmen (Jensen et al., 1984).

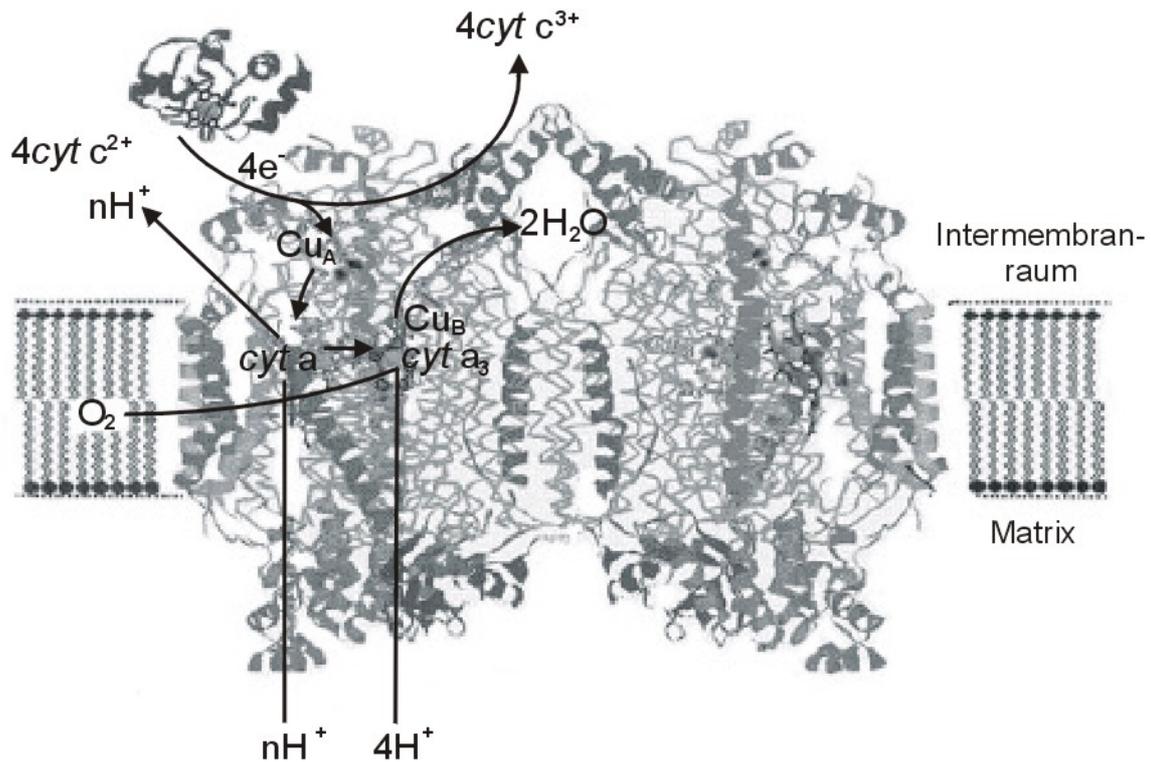


Abb. 5: Kristallstruktur der dimeren Cytochrom c Oxidase aus Rinderherz. An der Intermembranseite ist auch die Kristallstruktur von Cytochrom c dargestellt. Im linken Monomer sind die angenommenen Elektronen- und Protonenwege dargestellt (Blenkinsop *et al.*, 1996).

Die große extramembrane Domäne der Untereinheit II liegt über dem Intermembranraum-Teil der Untereinheit I und besitzt eine  $\beta$ -Faltblatt Struktur, die das  $\text{Cu}_A$ -Zentrum mit zwei Kupferatomen enthält (Tsukihara *et al.*, 1995). Zusätzlich enthält diese Domäne der Untereinheit II einige konservierte saure Aminosäuren, die an der Bindung des basischen Cytochrom c beteiligt sind (Ferguson-Miller *et al.*, 1978; Rieder and Bosshard, 1980; Witt *et al.*, 1998). Zwischen den Untereinheiten I und II befindet sich ein Kanal, durch den das am Häm  $a_3$ -Zentrum gebildete Wasser aus dem Enzym gelangen kann (Tsukihara *et al.*, 1996).

Die Funktion der Untereinheit III ist unklar (Solioz *et al.*, 1982; Haltia *et al.*, 1991). Im Säugetierenzym stabilisiert sie möglicherweise das Enzymdimer (Hakvoort *et al.*, 1987). Das Fehlen der Untereinheit III führt zum Zerfall des Dimers in die Monomeren (Pentilla, 1983).

## 2.2 Verzweigte mitochondriale Atmungskette

In Mitochondrien von Säugern verläuft der Elektronenfluss von NADH auf Sauerstoff ausschließlich durch die drei protonenpumpenden Komplexe I, III und IV. In Mitochondrien von Pilzen und Pflanzen hingegen ist der Elektronenweg verzweigt. Neben den energiekonservierenden Atmungskettenkomplexen sind noch alternative, nicht protonenpumpende Enzyme vorhanden (Douce *et al.*, 1989; Abb. 6). Es handelt sich dabei um drei NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen (NADH Dehydrogenasen), die exogenes bzw. endogenes NAD(P)H oxidieren und eine Ubichinol Oxidase, die Ubichinol durch Sauerstoff oxidiert (Schwitzguébel *et al.*, 1982; Moller, 2001). Die Affinitäten der alternativen Enzyme zu NADH, NADPH bzw. Ubichinol ist etwa 10-fach geringer als die der protonenpumpenden Atmungskettenkomplexe. Sie werden deshalb als Überlaufventile für überschüssige Reduktionsäquivalente angesehen (Siedow, 1990).

Defekte in entweder dem Komplex I oder den Komplexen III und IV sind in diesen Organismen nicht letal (Nehls *et al.*, 1992). Komplex I-Defekte in Menschen hingegen sind häufig Ursache von mitochondrialen Erkrankungen. Durch Einsatz von heterologen, alternativen NADH Dehydrogenasen in Säugerzellen konnten Komplex I-Defekte komplementiert werden (Yagi *et al.*, 2001).

Die alternativen NADH Dehydrogenasen sind kernkodiert und bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette, mit einer molaren Masse von 50 - 60 kDa. In der inneren Mitochondrienmembran von *Neurospora crassa* sind sowohl externe als auch eine interne NADH Dehydrogenasen vorhanden. Im Genom von *N. crassa*, wurden drei NADH Dehydrogenase Gene identifiziert; eines für eine interne, alternative NADH Dehydrogenase, die NADH aus der mitochondrialen Matrix oxidiert, und zwei für externe, die NADH aus dem Cytosol nutzen können (Melo *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2003). Eine der externen NAD(P)H Dehydrogenasen wurde näher charakterisiert und ergab, dass außer den erwarteten NADPH und FAD Bindemotiven auch eine  $\text{Ca}^{2+}$  Bindedomäne vorhanden ist. Ihr wird eine regulatorische Rolle zugeschrieben (Moller und Rasmusson, 1998; Melo *et al.*, 2001).

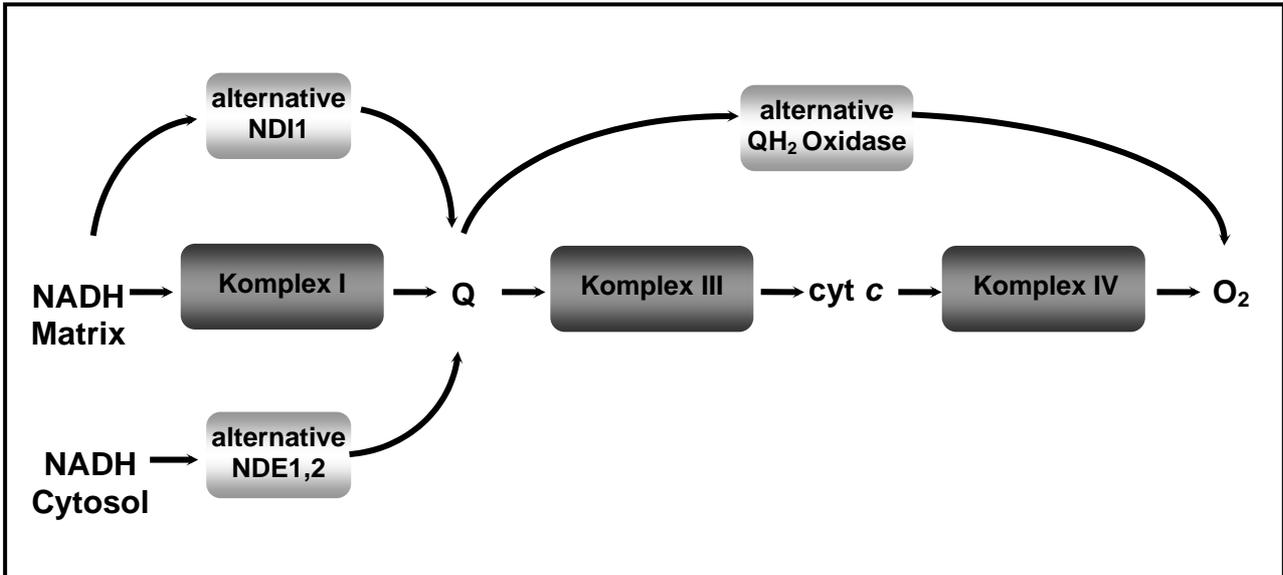


Abb. 6: Schematische Darstellung der Atmungskette mit verzweigtem Elektronenfluss. Pfeile zeigen mögliche Elektronenwege. Protonenpumpende Enzyme sind dunkel dargestellt und alternative nicht-energiekonservierende Enzyme hell. NDI1 steht für interne NADH Dehydrogenase, NDE für externe NADH Dehydrogenase, cyt *c* für Cytochrom *c*, Q für Ubichinon und QH<sub>2</sub> für Ubichinol.

Die interne alternative NADH Dehydrogenase von *N. crassa* trägt als prosthetische Gruppe ein FAD. Das Vorläuferpolypeptid enthält eine Mitochondrien-Importsequenz von 31 Aminosäuren. Durch gezielte Disruption des *ndi1*-Gens in *N. crassa* wurde eine Mutante dargestellt, in der die Atmungsaktivität isolierter Mitochondrien mit Glutamat/Malat als Substrat durch Rotenon gehemmt wurde. Da Kreuzungsversuche mit Komplex I-Mutanten erfolglos blieben wird angenommen, dass die interne, alternative NADH Dehydrogenase und der Komplex I funktionell komplementär zueinander sind und dass die externen NADH Dehydrogenasen einen Komplex I-Defekt nicht kompensieren. Die Mechanismen zum Austausch von NADH aus dem Cytosol und der Matrix sind entweder nicht präsent oder nicht effizient in *N. crassa* (Duarte *et al.*, 2003). Das Überleben von Komplex I-defizienten Mutanten lässt sich demnach nur durch eine intakte interne, alternative NADH Dehydrogenase garantieren.

Die alternative Ubichinol Oxidase überbrückt die Komplexe III und IV, indem sie Elektronen von Ubichinol direkt auf molekularen Sauerstoff überträgt (Moore und Siedow, 1991). Das Enzym ist kernkodiert und wurde in den Mitochondrien der

meisten Pilze nachgewiesen (Albury *et al.*, 1996). In *N. crassa* wurde das Gen kloniert und analysiert (Li *et al.*, 1996). Das Enzym enthält als prosthetische Gruppe ein durch Histidin- und Carboxylatreste koordiniertes binukleäres Eisenzentrum (Abb. 7). Es ist gegenüber den Inhibitoren von Komplex III und IV, Antimycin A und Cyanid, resistent, zeigt jedoch eine Sensitivität gegenüber Hydroxamsäuren (Salicylhydroxamsäure, SHAM) und Alkylgallaten (n-Propylgallat) (Siedow und Umbach, 1995).

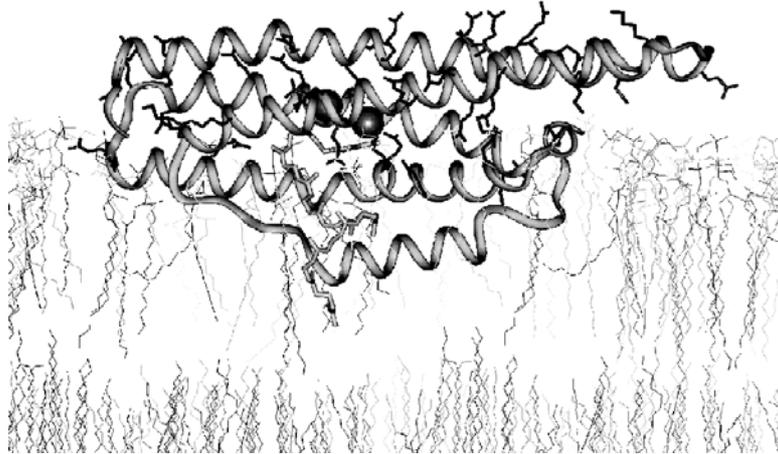


Abb. 7: Kristallstruktur der alternativen Ubichinol Oxidase aus *M. grisea* (Horne *et al.*, 2001) integral in die Membran eingebettet.

Unter normalen Wachstumsbedingungen ist in *N. crassa* nur eine geringe oder gar keine alternative Ubichinol Oxidaseaktivität zu beobachten. Bei Blockierung des Elektronenwegs über die Komplexe III und IV wird die Expression induziert (Sakajo *et al.*, 1993; Mizutani *et al.*, 1995). Die Regulation der Induktion ist nicht vollständig aufgeklärt. Sie zeigt eine große Komplexität mit sowohl transkriptionale als auch posttranskriptionale Mechanismen (Millar *et al.*, 1993; McIntosh, 1994; Umbach *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Tanton *et al.*, 2003).

Abweichungen von der Enzymausstattung der Atmungskette weisen die fermentativen Hefen, wie *S. cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* auf (de Vries und Grivell, 1988). Ihnen fehlt Komplex I und sie besitzen stattdessen nur nicht-protonenpumpende alternative NADH Dehydrogenasen. Bemerkenswert ist, dass sie auch keine alternative Ubichinol Oxidase enthalten (Horne *et al.*, 2001).

### 2.3 Biosynthese der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe

Die fakultativ anaerobe Hefe *S. cerevisiae* wird als Modellorganismus zur Aufklärung der Mitochondrienbiogenese eingesetzt (Graham *et al.* 1993). Da diese Hefe bei Anwesenheit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen nicht auf eine intakte Atmungskette angewiesen ist, wurden ungezielt erzeugte Mutanten, die in der Synthese oder Funktion der Atmungskettenkomponenten beeinträchtigt sind, erzeugt und mit ihnen große Fortschritte im Verständnis der Biogenese und Assemblierung der Atmungskettenkomplexe III und IV und des ATPase-Komplexes erzielt.

Der Prozess ist komplex und benötigt eine große Anzahl an Hilfsproteinen, die in drei Aufgabenbereiche unterteilt werden können, den Transport der kernkodierten Proteine zum richtigen Wirkungsort, die Transkription und Translation der mitochondrialen Gene und die Assemblierung der Komplexe mit den Cofaktoren zum funktionalen Enzym.

Die kernkodierten Proteine werden posttranslational in die Mitochondrien importiert. Anhand einer mitochondrialen Importsequenz werden sie von Rezeptoren an der Außenseite der mitochondrialen Außenmembran erkannt und gebunden. Der Transport über die Membran erfolgt durch ein aus mehreren Proteinkomponenten aufgebauter Komplex, der die Insertion von Vorstufenproteinen in die Außenmembran und die Translokation von Vorstufenproteinen vermittelt (Kiebler *et al.*, 1990). Er wird TOM-Komplex genannt (Translocase of the Outer Membrane). In der Innenmembran sitzen zwei aus mehreren Proteinkomponenten aufgebaute Komplexe, von denen der sog. TIM23-Komplex (Translocase of the Innner Membrane), Vorstufenproteine durch die Membran in die Matrix transloziert, während der sog. TIM22- Komplex die Insertion einer Klasse von Membranproteinen in die Innenmembran vermittelt (Bauer *et al.*, 2000).

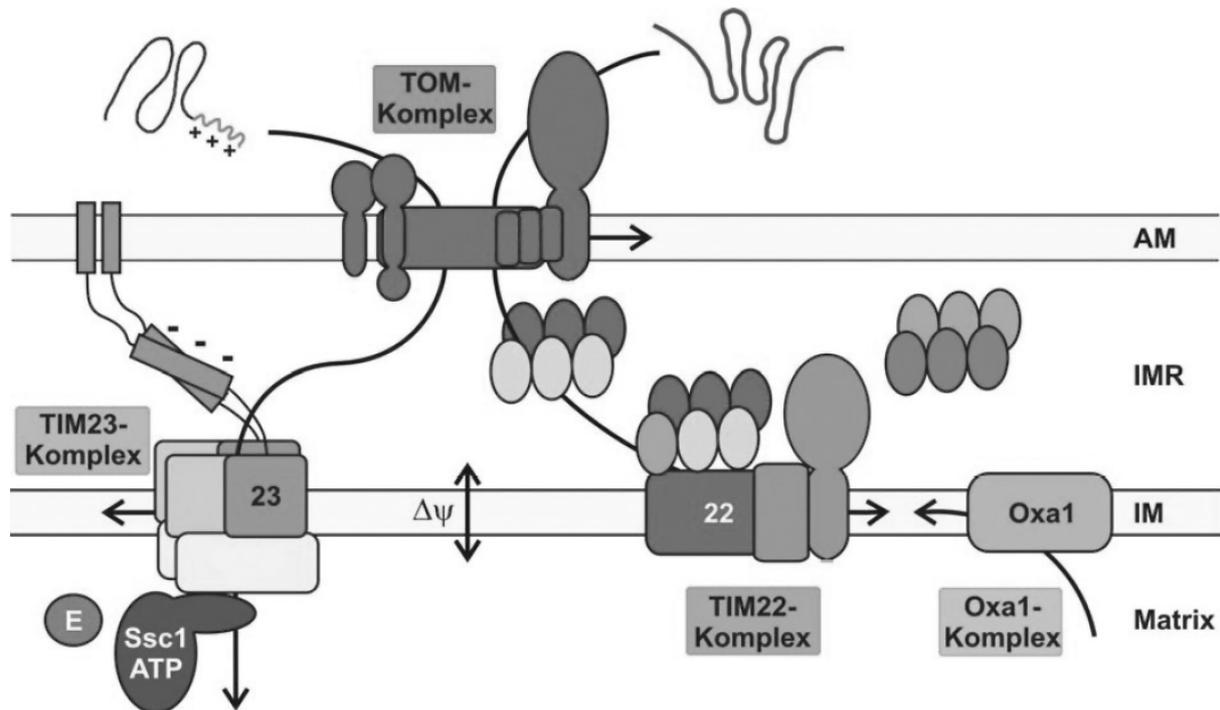


Abb. 8: Schematische Darstellung der mitochondrialen Translokasen. TOM (Translocase of the Outer Membrane) und Tim (Translocase of the Inner Membrane) importieren kernkodierte Proteine aus dem Cytosol. Oxa1 vermittelt die Insertion von Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran. Ssc1 ist ein Mitglied der Hsp70-Familie. IM steht für Innenmembran, IMR für Intermembranraum, AM für Außenmembran und  $\Delta\psi$  für Membranpotential

Ein weiterer Proteinkomplex in der mitochondrialen Innenmembran, der Oxa1-Komplex, vermittelt die Insertion von Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran (Abb. 8; Hell *et al.*, 1998; Saint-Georges *et al.*, 2001). Die Importsequenzen werden in der mitochondrialen Matrix von spezifischen Proteasen, sog. Matrix Prozessierungspeptidasen (MPP) abgespalten, woraufhin sich das Protein zumeist mit Hilfe der mitochondrialen Hsp60/Hsp10-Chaperon-Maschinerie in die endgültige Struktur faltet (Hawlitsek *et al.*, 1988). Es gibt auch Vorstufenproteine mit zwei aufeinanderfolgenden Präsequenzen. Während die Eine Vorstufenproteine zunächst in die Matrix dirigiert, ist die Zweite für die nachfolgende Sortierung aus der Matrix in den Intermembranraum verantwortlich. Die erste Präsequenz wird in der Matrix, die zweite im Intermembranraum abgespalten. Ein Beispiel für ein solches Vorstufenprotein ist Cytochrom  $b_2$  aus Hefe (Klaus *et al.*, 1996).

In *S. cerevisiae* sind insgesamt 340 mitochondriale Proteine bekannt. Neben den Proteinen der Atmungskette sind davon etwa hundert in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Die größte funktionale Klasse nehmen die 63 ribosomalen

Proteine ein, aber auch die 35 Transporter der mitochondrialen Carrier-Familie, 11 Proteine der translationalen Aktivierung und die 26 Proteine, die bei der Assemblierung der Atmungsenzyme involviert sind (Grivell *et al.*, 1999).

Etwa 130 Proteine von den insgesamt 340 sind verantwortlich für die Synthese, Erhaltung und Transkription der mitochondrialen DNA (Grivell *et al.*, 1999). Viele dieser Proteine sind nicht spezifisch für die Biogenese eines Atmungskettenkomplexes, sondern führen bei einem Defekt zu einem pleiotropen Phänotyp. Hilfsproteine, die an einer späten Phase der Atmungsketten-Biosynthese wirken, sind dagegen meist für einen Enzymkomplex spezifisch. Zum Beispiel sind die Proteine Cox10 und Cox11 in der Biosynthese der Häme Typ-a involviert. Ihre Inaktivierung führt zu einem Komplex IV-Mutanten Phänotyp (Tzagoloff *et al.*, 1993). Cox17 und Sco1 fungieren als Carrierproteine und liefern Kupfer aus dem Cytosol zu den mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase-Untereinheiten I und II (Beers *et al.*, 1997). Das *ABC1* Genprodukt ist für die korrekte Faltung und Assemblierung von Cytochrom *b* verantwortlich (Brasseur *et al.*, 1997). Die Liste der bekannten spezifisch wirkenden Hilfsproteine wächst stetig weiter (<http://www.genedb.org/genedb/index.jsp>). Sie ist jedoch auf die Hilfsproteine der Atmungskomplexe III und IV beschränkt, da *S. cerevisiae* keinen Komplex I besitzt.

## 2.4 Der Pilz *N. crassa* als Modellorganismus

*N. crassa* enthält den Komplex I und wird deswegen in unserem Institut zu dessen Untersuchung verwendet. Der Pilz gehört zur Klasse der Ascomyceten, deren Hauptmerkmal der Ascus, eine spezielle Art von Sporangium ist. Er schließt die durch die Meiosen und die nachfolgende Mitose entstehenden acht Ascosporen ein. Der Vegetationskörper besteht aus verzweigten schlauchartigen Zellen, den Hyphen, die mehrere haploide Kerne enthalten und von einer festen äußeren Zellwand umhüllt sind. Die Gesamtheit der Hyphen wird als Myzel bezeichnet. Man unterscheidet zwischen Substrathyphen, die zur Stoffaufnahme in das Substrat (organische Substanzen) eindringen, und Lufthyphen, die sich in den Luftraum erheben.

Ascomyceten zählen zu den höheren Pilzen (Eumyceten), da sie senkrecht zur Hyphenachse Septen bilden, welche eine zellartige Unterteilung des Thallus vornehmen. Diese Septen besitzen einen Zentralporus mit 0,5 - 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser, der dem Cytoplasma und den Organellen erlaubt, entlang der Hyphen zu fließen. Ältere Myzelteile haben meist außer der Weiterleitung des Cytoplasmastromes vom Nährmedium zur Hyphenspitze keine vitale Funktion und vakuolisieren stark. Das Wachstum an der Hyphenspitze ist konstant, so dass ein verstärktes Wachstum nur über Verzweigungen erfolgen kann, die etwa 120  $\mu\text{m}$  hinter der Hyphenspitze beginnen. Das exponentielle Wachstum ist also eine Folge der exponentiell zunehmenden Anzahl der Verzweigungen. Durch Querwände werden Sporangien abgetrennt, deren Inhalt zum Zweck der Vermehrung, Überdauerung oder Fortpflanzung in die Umgebung abgegeben wird. *N. crassa* bildet drei Sporenarten, die Makro- und Mikrokonidien, die der vegetativen Vermehrung dienen, und die Ascosporen als generative Sporen.

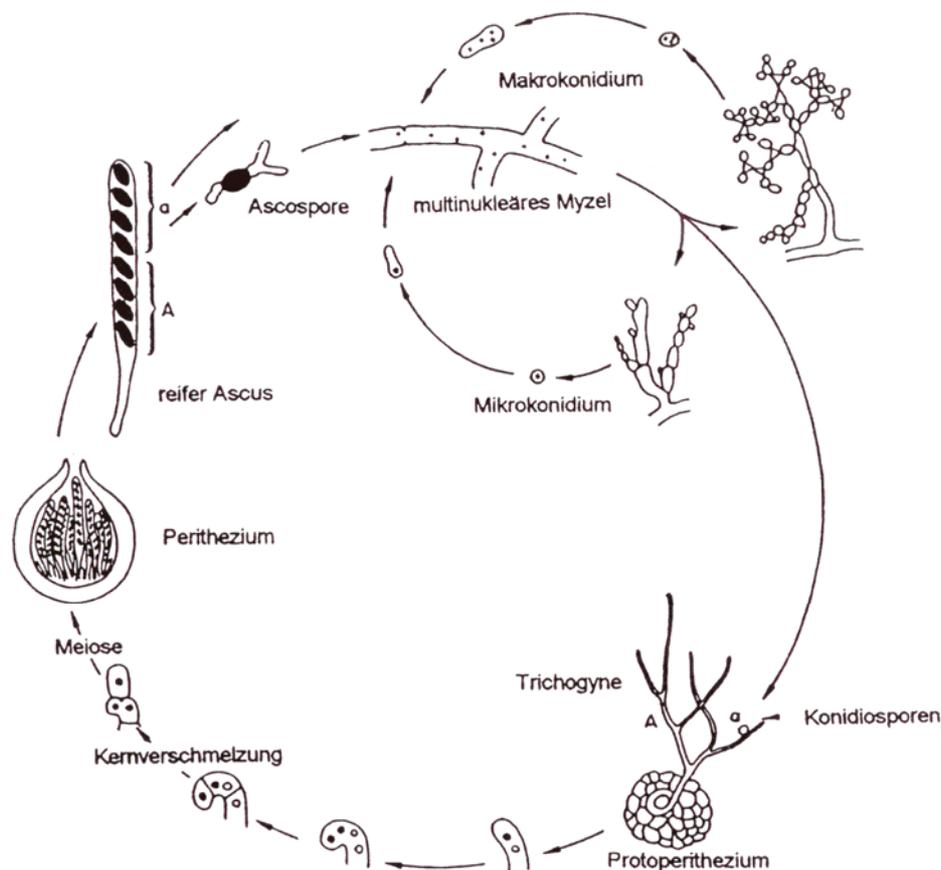


Abb. 9: Lebenszyklus von *N. crassa* (Fincham et al., 1979). Es ist sowohl der vegetative Vermehrungszyklus (kleiner Kreis), als auch der generative Zyklus (großer Kreis) dargestellt.

Die vegetative Vermehrung durch Konidiosporen ist nicht mit einem Kernphasenwechsel verbunden, sondern dient nur der Verbreitung. An den Spitzen der Lufthyphen entstehen kettenförmig in großer Zahl ca. 15 µm große Sporen, die Makrokonidien. Sie sind multinukleär, enthalten im Durchschnitt 2,5 Kerne pro Zelle (Huebschman, 1952) und sind orange gefärbt. Während der Reifung bilden sich dicke Wände zwischen den Makrokonidien, und durch Luftbewegungen werden sie leicht getrennt. Die Makrokonidien sind durch den anemochoren (griechisch: Wind-Raum; Luftweg) Transport die Hauptverbreitungsform des Myzels. Neben den exogen gebildeten Konidien entstehen endogen in gedrungenen Zellen einkernige Mikrokonidien (Lowry et al., 1967). Sie bleiben nach Verlassen der Mutterzelle als traubige Anhäufungen an dieser haften. Mikrokonidien sind kleiner (2 µm), werden später gebildet und haben eine geringere Lebensfähigkeit. Beide Konidienarten können ohne Ruhephase zu neuen Myzelien auskeimen. Eine vegetative Vermehrung kann auch durch Hyphen oder Myzelfragmente erfolgen.

Die langlebigen Ascosporen werden am Ende des sexuellen Prozesses gebildet, der bei Nährstoffmangel eintritt. *Neurospora*-Stämme sind selbstinkompatibel. Es gibt zwei Kreuzungstypen, A und a, die jeweils sowohl männliche als auch weibliche Keimzellen ausbilden. Der Lebenszyklus von *N. crassa* ist in Abbildung 9 dargestellt. Ein wichtiges Merkmal der generativen Entwicklung ist, dass die Ascosporen zur Reifung bei 60 °C aktiviert werden müssen. Bei dieser Behandlung werden gleichzeitig Elternzellen und andere Kontaminanten abgetötet. Wegen der unterschiedlichen Ausgangsbedingungen der generativen und vegetativen Entwicklungszyklen lassen sie sich getrennt auslösen und anwenden.

Die natürlichen Habitate von *N. crassa* sind tropische und subtropische Regionen. Zuerst dokumentiert wurde der Pilz Mitte des 19. Jahrhunderts (Payen, 1843) in Mitteleuropa als roter Brotschimmel in Bäckereien. *N. crassa* wurde erstmals um 1920 als experimenteller Organismus eingesetzt (Shear und Dodge, 1927). Spätere Arbeiten durch Beadle und Tatum (1941) etablierten die Beziehung zwischen Genen und Proteinen, zusammengefasst in der „ein-Gen-ein-Enzym“ Hypothese. Inzwischen ist ein großer Teil der Biologie von *N. crassa* verstanden. Der Pilz benötigt zum Wachstum außer einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle nur einige einfache Salze, Spurenelemente und als Vitamin Biotin (Davis et al., 1970).

Wegen der einfachen Handhabung und der leichten Kultivierung im Labor hat *N. crassa* im Laufe der Jahre eine große Bedeutung als eukaryotischer Modellorganismus erlangt.

Das Erbe von über 70 Jahren Forschung beinhaltet eine große Anzahl von ausgearbeiteten Methoden zur biochemischen Analyse und genetischen Manipulation (Davis und Perkins, 2002; Perkins, 2000). Das gut organisierte *Fungal Genetics Stock Center* stellte eine große Sammlung von Wildtyp- und Mutantenstämmen (FGSC 2002) und eine Vielzahl der Methoden zusammen. Außerdem haben Wissenschaftler in internationaler Zusammenarbeit das Erbgut von *N. crassa* jüngst entschlüsselt. Der Organismus hat ein Genom von etwa 40 MBp in sieben Chromosomen, das ungefähr 10 000 proteinkodierende Gene beinhaltet. Es wurde eine öffentliche Datenbank der Genomsequenz von *Neurospora crassa* angelegt, die MNCDB (MIPS Neurospora crassa database; Mewes *et al.*, 2002; Schulte *et al.*, 2002) und Analysen der Sequenz durchgeführt (Mannhaupt *et al.*, 2003; Galagan *et al.*, 2003).

*N. crassa* findet breite Anwendung als Modellorganismus in verschiedenen aktuellen Themengebieten, z.B. zur Aufklärung der mitochondrialen Biogenese (Mohr *et al.*, 2002), des RIP-Effekts (*Repeat Induced Point Mutation*; Singer und Selker, 1995) und des Gen-Silencing (Cogoni, 2001). Auch für die Erforschung des Atmungskettenkomplex I fiel die Wahl auf *N. crassa*. 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). Wie oben erwähnt, ist der Elektronenweg der Atmungskette verzweigt, was *N. crassa* ermöglicht auch ohne intakten Komplex I zu überleben. Die Erzeugung von Mutanten, durch genetische Manipulation von Untereinheiten des Komplex I, führten schon zu Erkenntnissen über den modularen Aufbau des Komplexes und die Bedeutung einzelner Untereinheiten für seine Assemblierung (Schulte und Weiss, 1995).

## 2.5 Komplex I-Mutanten von *N. crassa*

Komplex I-Mutanten von *N. crassa* wurden bisher durch gezielte Inaktivierung von nukleären Genen von bekannten Untereinheiten erzeugt. Die Geninaktivierung ist sowohl durch homologe Rekombination als auch durch den sog. RIP-Effekt (*Repeat Induced Point Mutation*; Selker, 1990) möglich. Durch homologe Rekombination wird das Originalgen gegen eine *in vitro* inaktivierte Genkopie ausgetauscht, in der der kodierende Bereich durch einen Transformationsmarker ersetzt ist (Nehls *et al.*, 1992; Fecke *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1995). Da homologe Rekombination in *N. crassa* nur 5 - 10 % der Integrationsergebnisse (Fincham, 1989) ausmacht, bietet sich als Alternative die Geninaktivierung mit Hilfe des RIP-Effekts an, welcher nur eine ektopische Integration an beliebiger Stelle voraussetzt. Der RIP-Effekt äußert sich in einer Inaktivierung duplizierter Sequenzen durch Methylierung und Punktmutationen in den haploiden Zellkernen von befruchteten, prämeiotischen Zellen. Nach Integration einer Kopie des Zielgens im Genom werden die homologen Genabschnitte noch vor der Karyogamie inaktiviert (Alves und Videira, 1994; Harkness *et al.*, 1995).

Als heterologer, dominanter Transformationsmarker wird häufig das bakterielle Gen für die Hygromycin B Phosphotransferase (*hph*) verwendet (Staben *et al.*, 1989). Das Aminoglycosid-Antibiotikum Hygromycin B hemmt die Proteinsynthese pro- und eukaryotischer Zellen (González *et al.*, 1978; Singh *et al.*, 1979). Daneben wird auch das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* eingesetzt, das eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin (Ignit, Basta, Glufosinat-Ammonium) vermittelt (Avalos *et al.*, 1989; Pall *et al.*, 1993). Phosphinothricin hemmt die Glutamin-Synthase, die Glutamat mit Ammonium zu Glutamin umsetzt. Dies führt zu einem letalen Anstieg der internen Ammonium-Konzentration. Durch das Genprodukt des *bar*-Gens, eine Phosphinothricin-Acetyltransferase, wird Phosphinothricin acetyliert und damit inaktiviert. Das homologe, mutierte  $\beta$ -Tubulingen (*ben<sup>r</sup>*) wird als dominanter Selektionsmarker gegen Benomyl eingesetzt. Benomyl, ein Carbaminsäurederivat, bindet an  $\beta$ -Tubulin und hemmt dadurch den Aufbau von Mikrotubuli, die essentiell für die Kernteilung sind. Das *ben<sup>r</sup>*-Gen unterscheidet sich vom Wildtyp- $\beta$ -Tubulingen nur in einer Base, die einen Phenylalanin-zu-Tyrosin Austausch verursacht (Orbach *et al.*, 1986; Yu und Margolin, 1998). Vermutet wird eine Strukturveränderung des  $\beta$ -

Tubulin, die die depolymerisierende Wirkung von Benomyl verhindert (Niini und Raudaskoski, 1993).

Komplex I-Mutanten erhalten ihre Bezeichnung *nuoX* aus dem Enzymnamen (NADH:Ubichinon Oxidoreduktase) und der molekularen Masse *X* in kDa der durch Gendisruption fehlenden Untereinheit. Ein Überblick der bekannten durch Gendisruption erzeugten Komplex I-Mutanten und die Assemblierung von Subkomplexen des Komplex I zeigt Tabelle 2 (Videira und Duarte, 2001). Die Mutanten zeigen keinen auffälligen Phänotyp, lediglich ein verlangsamtes Wachstum und eine schwächere Bildung von Konidien. Die Komplexe III und IV der Atmungskette sind in den Komplex I-Mutanten unverändert. In allen Mutanten, ausgenommen in *nuo21*, führte der Verlust einer Untereinheit des Enzyms auch zum Verlust der enzymatischen Aktivität des Komplex I. Isolierte Mitochondrien aus *nuo21* zeigen eine zum Wildtyp erniedrigte Rotenon-sensitive Atmung.

Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten zeigen sich im Grad der Assemblierung des Komplex I (Tab. 2). Der periphere Arm und der Membranarm werden unabhängig voneinander assembliert und dann zum vollständigen Komplex I zusammengesetzt (Tuschen *et al.*, 1990). Mutanten, denen eine Untereinheit des Membranarms fehlt, können diesen nicht mehr herstellen und häufen Assemblierungsintermediate an (Abb. 10). Der Membranarm seinerseits wird auch aus zwei Vorstufen zusammengesetzt, die als große bzw. kleine Membranarmvorstufe bezeichnet werden (Nehls *et al.*, 1992; Schulte *et al.*, 1994). In diesen Mutanten ist der periphere Arm vollständig assembliert und besitzt mit künstlichen Elektronenakzeptoren wie Kaliumhexacyanoferrat NADH-Dehydrogenaseaktivität.

In Mutanten, denen Untereinheiten des peripheren Arms fehlen, ist häufig keine NADH-Dehydrogenaseaktivität mehr nachweisbar. Dagegen ist die Assemblierung des Membranarms nicht beeinträchtigt. Ausnahmen bilden die Mutanten *nuo9.6* und *nuo9.8*. Der Mutante *nuo9.6* fehlt eine zu Acyl-Carrier-Proteinen homologe Untereinheit des peripheren Arms. In dieser Mutante werden nur sehr geringe Mengen des Membranarms gebildet. Der periphere Arm fehlt (Schneider *et al.*, 1995). In der Mutante *nuo9.8* waren keine Intermediate nachweisbar (Marques *et al.*, 2003).

Tab. 1: Assemblierung von Subkomplexen des Komplex I nach Deletion von Untereinheiten. *nuo* steht für NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und die Zahl für die Molmasse der Untereinheit (modifiziert nach Videira und Duarte, 2001).

<i>N. crassa</i> Mutante	Lage der Untereinheit	Nachweisbare Supkomplexe	Literatur
<i>nuo78</i>	peripherer Arm	Membranarm, kleine Teile des peripheren Arms	Harkness <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo51</i>	peripherer Arm	unvollständiger Komplex I ohne 51 kDa Untereinheit	Fecke <i>et al.</i> , 1994
<i>nuo49</i>	peripherer Arm	Membranarm	Sarker, 1997
<i>nuo40</i>	peripherer Arm	unvollständiger Komplex I ohne 40 kDa Untereinheit	Schulte <i>et al.</i> , 1999
<i>nuo30.4</i>	peripherer Arm	Membranarm	Duarte <i>et al.</i> , 1998
<i>nuo29.9</i>	peripherer Arm	Membranarm	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo24</i>	peripherer Arm	unvollständiger Komplex I ohne 24 kDa Untereinheit	Almeida <i>et al.</i> , 1999
<i>nuo21.3a</i>	Membranarm	peripherer Arm, große Membranarmvorstufe	Nehls <i>et al.</i> , 1992
<i>nuo21.3b</i>	peripherer Arm	unvollständiger Komplex I ohne 21,3 kDa Untereinheit	Alves, Videira, 1994
<i>nuo21.3c</i>	peripherer Arm	Membranarm	Duarte, Videira, 2000
<i>nuo21</i>	peripherer Arm	unvollständiger Komplex I ohne 21 kDa Untereinheit	Ferreirinha <i>et al.</i> , 1999
<i>nuo20.9</i>	Membranarm	peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Knüffner <i>et al.</i> , 1998
<i>nuo20.8</i>	Membranarm	peripherer Arm; Membranarmvorstufen	da Silva <i>et al.</i> , 1996
<i>nuo19.3</i>	peripherer Arm	Membranarm	Duarte <i>et al.</i> , 2002
<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, Diss., 1995
<i>nuo9.8</i>	nicht bekannt	Keine nachweisbaren	Marques <i>et al.</i> , 2003
<i>nuo9.6</i>	peripherer Arm	Unvollständiger Membranarm	Schneider <i>et al.</i> , 1995

Durch Inaktivierung kernkodierter Untereinheiten des Membranarms wurden bisher fünf Mutanten mit einer gestörten Assemblierung des Membranarms hergestellt (Tab. 2). Der periphere Arm wird noch vollständig gebildet. Untersuchung dieser Mutanten zeigte, dass der Membranarm seinerseits aus zwei zueinander komplementären Subkomplexen, der großen und der kleinen Vorstufe, gebildet wird. Die große Membranarmvorstufe umfasst fünf mitochondrial kodierte und sechs kernkodierte Untereinheiten. Zusätzlich ist dieses Assemblierungsintermediat des Membranarms mit zwei Proteinen assoziiert, die im vollständigen Komplex I nicht gefunden wurden. Sie wurden CIA84 und CIA30 (complex I intermediate associated protein) genannt, gemäß des Wirkungsorts und der molekularen Masse (Abb. 10). Durch Austausch von jeweils einem *cia*-Gen mit einer defekten Kopie, wurden Mutanten hergestellt, die eine Anhäufung des peripheren Arms und nur der kleinen Membranarmvorstufe zeigen (Küffner *et al.*, 1998).

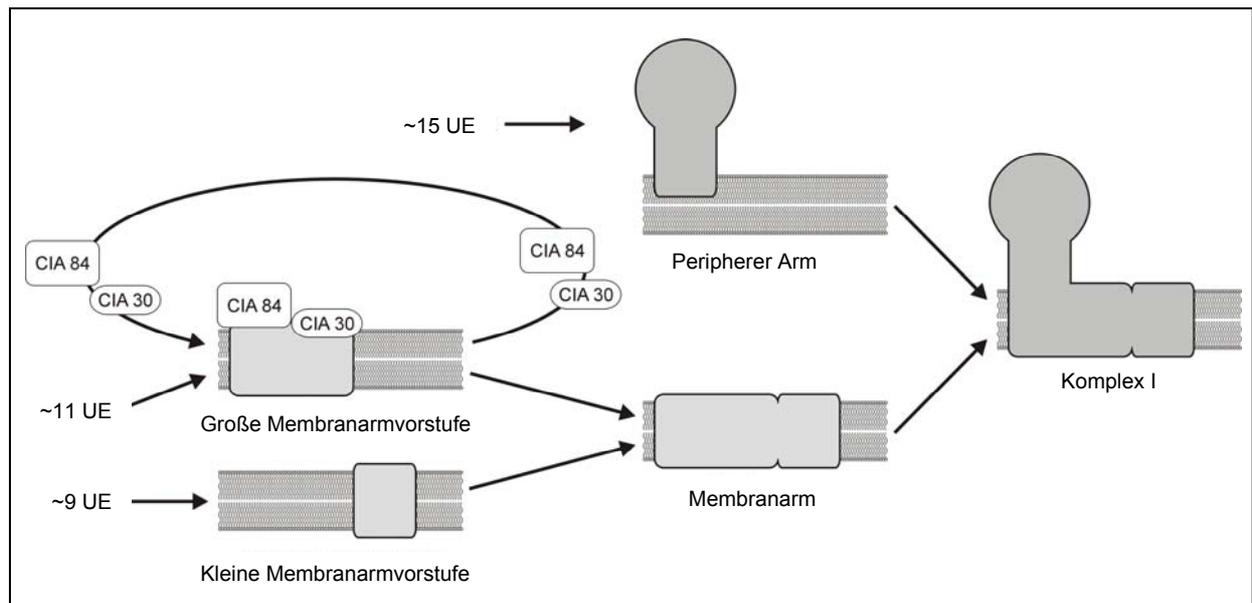


Abb. 10: Assemblierungsschema von Komplex I in *N. crassa* (Schulte, 2001; Erläuterungen siehe Text).

Die gezielte Manipulation des mitochondrialen Genoms ist in *N. crassa* bisher noch nicht gelungen. Mutanten, denen einzelne mitochondrial kodierte Untereinheiten von Komplex I fehlen, liegen nicht vor. Es wurde jedoch eine mitochondriale E35 „stopper“ Mutante entdeckt, die zwei mitochondriale Gene (ND2 und ND3) von Komplex I fehlen (de Vries *et al.*, 1986). Der Mangel an diesen Untereinheiten

verhindert die Assemblierung des Membranarms, hat jedoch keine Auswirkungen auf die Bildung des peripheren Arms (Alves und Videira, 1998).

## 2.6 Ungezielte Mutagenese von *Neurospora crassa*

Im Gegensatz zur gezielten Mutagenese, die auf eine Geninaktivierung von bekannten Komplex I-Untereinheiten beschränkt ist, kann die unspezifische Mutagenese den Zugang zu weiteren Komplex I-Mutanten ermöglichen, die in Genen betroffen sind, deren Produkte z.B. eine Rolle bei der Assemblierung und Biosynthese spielen.

Mutationen treten sowohl spontan als auch unter Einfluss mutationsauslösender Agenzien, sogenannter Mutagene, auf. Diese können entweder energiereiche Strahlung oder mutagene Chemikalien sein. Bei Pilzen sind vor allem Röntgen- und UV-Strahlen zur Mutationsauslösung genutzt worden, da sie leichter zu handhaben und besser zu dosieren sind (Lindegren, 1941). Der Angriff der mutagenen Agenzien ist nicht auf die Kern-DNA beschränkt. Atmungsketten-Defekte durch Mutationen in der mitochondrialen DNA wurden bei *Neurospora* (Malling, 1965), *Schizosaccharomyces pombe* (Raut, 1954) und *Aspergillus nidulans* (Arst *et al.*, 1973) erzeugt. Als Mutagene wurden u.a. Salpetrige Säure und N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) eingesetzt. Auch Nitrit bewirkt Mutationen auf der mitochondrialen DNA (Sherman, 1964).

Als besonders mutagene energiereiche Strahlen haben sich UV-Licht von 280-200 nm, Röntgen- und  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Strahlen erwiesen. Außer Punktmutationen werden dabei auch Chromosomen-Umordnungen ausgelöst (Lindegren, 1941).

Ultraviolette Strahlung ist ein starkes Mutagen, weil sie von den DNA-Basen direkt absorbiert wird. Hauptsächlich werden kovalente Bindungen zwischen benachbarten Pyrimidinresten eines Strangs gebildet, wobei Thymin-Dimere oder [6-4] Photoprodukte (Abb. 11; LeClerc *et al.*, 1991; Sinha und Hader, 2002) gebildet werden. Thymin-Thymin, Thymin-Cytosin und Cytosin-Cytosin Dimere werden mit einer relativen Häufigkeit von 1,0 : 0,7 : 0,2 gebildet (Grossman *et al.*, 1969). Ein anderes Strahlungsprodukt, die Cytosinhydrate, tautomerisieren häufig zu einer

Form, die sich mit Adenin paaren kann, wodurch es zu CG→TA-Transitionen kommt. Sowohl die dimerisierten Cytosine als auch die Cytosinhydrate neigen durch Desaminierung zur Uracil-Bildung. Bei direkt folgender Replikation führt dies auch zu einer GC → AT-Transition.

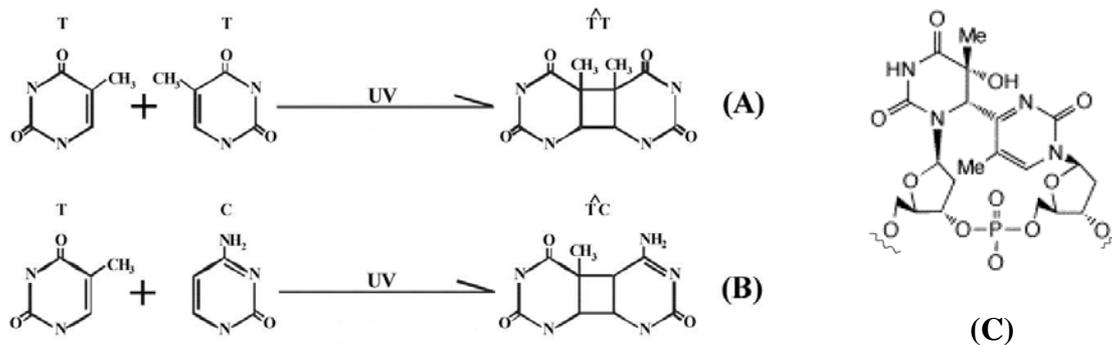


Abb. 11: Bildung von Photoprodukten benachbarter Pyrimidinbasen durch UV-Strahlen. Dargestellt ist (A) Thymin-Thymin Zyclobutan-Pyrimidin Dimer, (B) Thymin-Cytosin Dimer und (C) [6-4] Photoprodukt zweier Thymine.

Auf der Grundlage von Rückmutations-Analysen einer Gruppe UV-induzierter auxotropher Mutanten in *N. crassa* ergaben sich folgende Verhältnisse der verschiedenen Mutationsarten: 28 % A-T → G-C Transitionen, 8 % G-C → A-T Transitionen, 7 % Transversionen, 27 % zurückfallende Insertionen und Deletionen (kleine Fragmentverschiebungen), 9 % Deletionen. Auch Segmentmutanten wurden nach UV-Behandlung nachgewiesen. Bei 50 % Überlebensrate wiesen ungefähr 10 % der Konidien chromosomale Abweichungen auf (Kilbey *et al.*, 1971).

Einige Mutationen können in Organismen erkannt und durch Reparatursysteme wieder rückgängig gemacht werden. Nach Davis und de Serres (1970) ist in *N. crassa* die Wahrscheinlichkeit, dass Mutationen repariert werden, sehr gering. Neuere Studien bestätigten, dass im Vergleich zu Enzymen von anderen Organismen, die Photolyaseaktivität eingeschränkt ist (Shimura *et al.*, 1999). Außerdem fehlt *N. crassa* das Nucleotide Excision Repair-System (NER), ein Enzymkomplex aus mehr als zehn Proteinen, das beschädigte DNA-Stellen erkennt und herausschneidet (Aboussekhra *et al.*, 1995; Takao *et al.*, 1996). Stattdessen wurde eine ATP-abhängige 5'-Endonuklease als alternativer Reparaturweg postuliert (UVDE; UV damage endonuclease), der in *Schizosaccharomyces pombe* zusätzlich

zum NER-System vorliegt (Takao *et al.*, 1996; Yasuí und McCready, 1998; Kanno *et al.*, 1999).

Die Beziehung zwischen Mutanten-Ausbeute und Strahlen-Dosis ist bei UV-Strahlen komplexer als bei Röntgenstrahlen. Im niedrigen Dosis-Bereich wird eine nahezu lineare Zunahme der Mutationshäufigkeit gefunden. Bei hohen Dosen tritt ein Rückgang der Mutantenausbeute ein. Das wird mit der Treffertheorie erklärt. Demnach haben UV-Quanten eine zu niedrige Energie, um mit nur einem „Treffer“ eine letale Mutation zu induzieren. Daher werden letale Mutationen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit in bereits geschädigten Zellen, als in intakten induziert. Das bedeutet, dass ab einer bestimmten Strahlen-Dosis mehr Zellen getötet als neue Mutanten gebildet werden und damit der Anteil an Mutanten unter den überlebenden Zellen abnimmt (Kaplan, 1957). Für die Festsetzung der Strahlendosis für eine ungezielte Mutagenese von *N. crassa* Makrokonidien muss jedoch auch die Ausprägung der Mutantenphänotypen in Heterokaryoten berücksichtigt werden.

### **2.6.1 Ausprägung der Phänotypen**

Theoretisch sind alle erblichen Merkmale eines Organismus mutierbar. Soweit induzierte Mutationen zu einer phänotypischen Ausprägung führen, betreffen sie in der Regel Schädigungen eines Genproduktes und sind daher rezessiv. *N. crassa* ist haploid, deshalb werden rezessive Mutationen nicht durch dominante Allele des selben Kerns maskiert und der Phänotyp der Mutation wird in einkernigen Zellen sichtbar.

Die Entdeckung von Mutanten wird allerdings durch Dominanzwirkungen in Heterokaryoten erschwert. Dieser Fall tritt ein, wenn man multinukleäre Makrokonidien von *N. crassa* zur Erzeugung von Mutanten verwendet. Falls nur ein Kern der Zelle mutiert ist, kann dessen Phänotyp infolge von Rezessivität unentdeckt bleiben. Komplementationen treten auch auf, wenn zwei Kerne, die sich in einer Zelle befinden, an verschiedenen Stellen des genetischen Materials mutiert sind. Der durch die Mutation bedingte Funktionsverlust des einen Genoms wird durch die entsprechende nicht mutierte Stelle des Partner-Genoms ausgeglichen. Das

heterokaryotische Mycel zeigt dann den Phänotyp der Wildform. Zum ersten Mal wurde dieses Phänomen bei Mangelmutanten (auxotrophe Mutanten) von *N. crassa* beobachtet (Beadle and Coonradt, 1944). Sogar homoallele Mutanten können sich in bestimmten Kombinationen komplementieren (Fincham und Pateman, 1957; Suyama *et al.*, 1959). Als Resultat einer solchen wechselseitigen Ergänzung des genetischen Materials von Defektmutanten entstehen Wildtyp-phänotypische Stämme, und die Zahl der direkt nachweisbaren Mutationen ist verringert.

Bei *N. crassa* ist es möglich, Dominanzeffekte in Heterokaryoten zu vermeiden, indem man Mutantenstämme verwendet, die nur die einkernigen Mikrokonidien bilden. Die Mikrokonidien haben jedoch längere Wachstumszeiten und ihre Handhabung ist durch die dünnere Zellwand und das Aneinanderkleben erschwert (Fincham *et al.*, 1979; Ebbole und Sachs, 1990).

In früheren Arbeiten von Beadle und Tatum (1945) wurden *Neurospora*-Konidien mit UV-Licht bestrahlt und die Klone, welche sich aus überlebenden Konidien entwickelten, mit dem Wildstamm gekreuzt. Die homokaryoten, haploiden Sporen eines Ascus wurden durch entsprechende Testverfahren geprüft. Eine wesentliche Arbeitserleichterung bedeutet der Verzicht auf die Kreuzung vor dem Test. Dabei werden nur solche Myzelien mit dem Wildstamm gekreuzt, für die auf Grund von Wachstumtests bereits ein Defekt nachgewiesen ist. Die Anzahl der zu untersuchenden Klone wird dadurch zwar um ein mehrfaches vergrößert, was jedoch in Kauf genommen wird, besonders wenn das Testverfahren leicht durchzuführen ist, z.B. bei auxotrophen Mutanten. Die Selektion der mutierten Zellen durch Einzelprüfung unter einer großen Anzahl von Konidien ist allerdings mühsam. Für die effiziente Identifizierung ist die gezielte Anreicherung der gesuchten Mutanten hilfreich.

## **2.7 Filtrations-Anreicherungsverfahren**

Die Herstellung und Isolierung von ungezielt erzeugten Mutanten kann in drei Schritte gegliedert werden: ungerichtete Mutagenese, Anreicherung ausgerichtet auf den Phänotyp und Identifizierung der gesuchten Mutanten. Zur Anreicherung wurde

für *N. crassa* das „Filtrations-Anreicherungs“-Verfahren entwickelt (Case, 1963). Es erfordert ein Selektionsmedium, in dem die Auskeimungsrate der gesuchten Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp und anderen Mutanten stark vermindert ist. Aus Flüssigkulturen, die mutagenisierte Konidien enthalten, werden die ausgekeimten und zu Hyphen herangewachsenen Konidien mittels sukzessiver Filtration durch Glaswolle entfernt, während die noch nicht ausgekeimten Konidien der gewünschten Mutanten durch die Glaswolle passieren und so im Filtrat angereichert werden. Anschließend werden sie auf Agarplatten, die das für das Wachstum der Mutanten erforderliche Medium enthalten, angezogen (Davis und de Serres, 1970).

## 2.8 Induzierbarer qa Promotor

In dieser Arbeit wurde ein regulierbarer Promotor für *N. crassa* benötigt. Einer der wenigen, charakterisierten, induzierbaren Promotoren in *N. crassa* ist der qa-Promotor, der die Bildung von Enzymen des Chinasaure-Katabolismus steuert. Chinat und Shikimat können von vielen Pilzen als alternative Kohlenstoffquelle genutzt werden. Der Abbau dieser Komponenten führt über Protocatechuat zu Succinat und Acetat (Abb. 12; Griffin, 1994; Keller und Hohn, 1997).

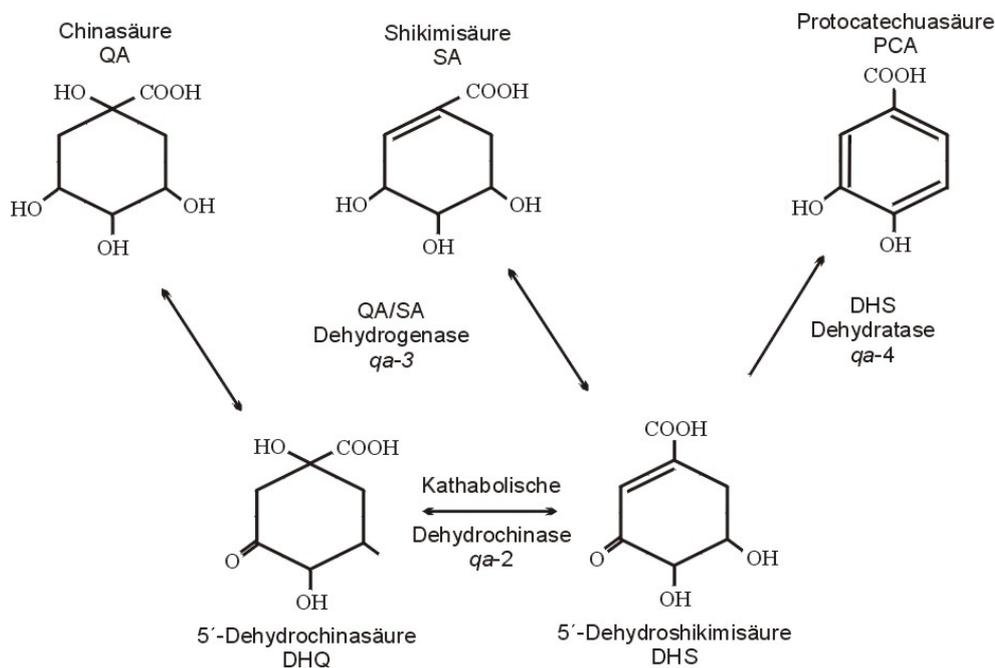


Abb. 12: Chinat/Shikimat Katabolismus in *N. crassa*. *qa-2*, *qa-3* und *qa-4* stellen die kodierenden Gene der entsprechenden, induzierbaren Enzyme dar. Protocatechuasäure wird zunächst zu Carboxymuconat und dann in weiteren Schritten zu Succinat und Acetat umgesetzt.

In *N. crassa* sind fünf Strukturgene und zwei regulatorische Gene bei der Nutzung von Chinasaure als Kohlenstoffquelle involviert. Alle sieben Gene sind eng verknüpft und bilden das qa-Gencluster (Abb. 13; Giles *et al.*, 1985), das ein kontinuierliches DNA-Segment von 17,3 kbp einnimmt. Drei Genpaare werden divergierend transkribiert. Die zwei regulatorischen Gene befinden sich am Ende des Clusters und kodieren einen Aktivator (QA-1F) und einen Repressor (QA-1S). Drei Strukturgene (*qa-2*, *qa-3* und *qa-4*) kodieren Enzyme, die den Katabolismus von Chinasaure katalysieren (Abb. 12). Ein Strukturgen (*qa-y*) kodiert für eine Chinat-Permease. Die Funktion des fünften Gens ist noch unklar.

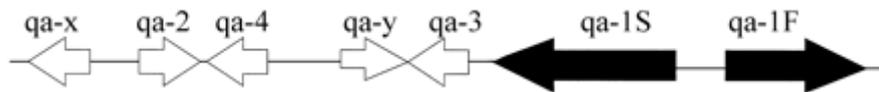


Abb. 13: Genorganisation im *qa* Cluster von *N. crassa*. Kodierende Bereiche sind als Pfeile dargestellt, zwei regulatorische Gene (schwarze Pfeile) und fünf Strukturgene (weiße Pfeile).

Den größten Beitrag zum Verständnis der Regulation haben Untersuchungen von ungezielt erzeugten Mutanten erbracht, die Chinasäure nicht als Kohlenstoffquelle nutzen können. Mutagenisierte Konidien wurden einer Filtrations-Anreicherung unterzogen, wobei im Selektionsmedium Chinasäure als einzige Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Dabei wurden Mutanten mit Defekten in den verschiedenen Genen des *qa*-Clusters, isoliert. Einzig *qa-y*, das für eine Chinat-Permease kodiert, war nicht betroffen. Spätere Studien mit einer *qa-y*-Mutante, die durch homologe Rekombination mit einer defekten Genkopie, erzeugt wurde, zeigten einen zwar eingeschränkten, aber ausreichenden Chinasäure-Transport in die Zelle (Whittington *et al.*, 1987; Giles *et al.*, 1991).

Die Kontrolle des *qa*-Systems findet auf der Ebene der Transkription statt (Patel *et al.*, 1981). Der Aktivator bindet an konservierte, regulatorische Sequenzen 5' von den *qa*-Genen und aktiviert die Transkription der Strukturgene, seines eigenen Gens (autoreguliert) und die des Repressors *qa-1S*. Bei Abwesenheit des Induktors Chinasäure bilden der Repressor und der Aktivator einen inaktiven Komplex, wodurch eine Aktivierung der Transkription unterdrückt wird. Chinasäure bindet an den Repressor und der Aktivator kann die Expression der *qa*-Gene einleiten (Giles *et al.*, 1991).

Das Aktivatorprotein wechselwirkt an spezifischen Bindestellen der DNA. Diese wurden als symmetrische 16 Bp Sequenzen in den 5'-flankierenden Regionen der *qa* Gene identifiziert. Insgesamt wurden 14 Aktivatorbindestellen im Cluster gefunden. Die Promotoren der *qa*-Gene in Verbindung mit QA-1F-Bindestellen können in *N. crassa* zur kontrollierten Transkription von klonierten Genen genutzt werden. Der induzierbare *qa-2* Promotor wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen verwendet (Campbell *et al.*, 1994).

## 2.9 Ziel und Strategie der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Ausarbeitung eines Verfahrens zur Isolierung ungezielt erzeugter Komplex I-Mutanten von *N. crassa*. Dazu ist die effiziente Selektion aus der Vielfalt von mutierten Konidien nach einer ungezielten Mutagenese notwendig. Voraussetzung dafür ist zum Einen eine einfach zu bestimmende Eigenschaft von Komplex I-Mutanten, die eine Unterscheidung von Wildtyp und anderen Mutanten erlaubt. Zum Anderen ist eine gezielte Anreicherung von Komplex I-Mutanten wichtig um die Zahl der zu untersuchenden Klone einzuschränken. Für die Filtrations-Anreicherung müssen Bedingungen verfügbar sein unter denen das Auskeimen von Komplex I-Mutanten zunächst möglichst spezifisch unterdrückt wird und nach der Anreicherung muss die Hemmung wieder aufgehoben werden.

Komplex I-Mutanten besitzen nur einen wenig charakteristischen Phänotyp, da der Elektronentransfer von NADH zu Ubichinon von der internen, alternativen NADH Dehydrogenase übernommen wird. Die fehlende Energiekonservierung führt nur zu geringen Einbußen im Wachstum. Das Fehlen von Komplex I hat jedoch deutlichere Auswirkungen, wenn der Elektronenfluss durch die Atmungskettenkomplexe III und IV beeinträchtigt ist. Dann mangelt es den Komplex I-Mutanten an ATP. Gestützt durch die schon festgestellte Antimycinsensitivität von Komplex I-Mutanten (Rakatzi, Diplomarbeit, 1998), wird dadurch auch die Blockierung der Auskeimung erwartet. Zur Selektion sollten die Kultivierungsbedingungen deshalb so gewählt werden, dass der Elektronenweg von Ubichinon auf Sauerstoff über die nicht-protonenpumpende alternative Ubichinol Oxidase verläuft. Um das zu erreichen, bieten sich der Entzug eines essentiellen Stoffes zur Bildung der Komplexe, wie z.B. Kupfer für Komplex IV, Hemmstoffe, wie z.B. Antimycin für Komplex III, oder eine genetische Inaktivierung von Komplex III oder IV an. Zur Überprüfung der Eignung zur Selektion von Komplex I-Mutanten wurde der Einfluss eines Komplex I-Defekts auf das Wachstum und Auskeimungsverhalten von Konidien unter diesen Bedingungen untersucht.

Für die notwendige Charakterisierung der Klone sollten Tests entwickelt werden, die eine routinemäßige Prüfung auch vieler Klone mit vertretbarem Zeitaufwand erlaubt. Erst nach einer Auswahl interessanter Klone sollte eine zwar eindeutige aber auch aufwendige Identifizierung von Komplex I-Mutanten in Frage kommen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Medien und Lösungen

Luria-Broth (LB):	10 g/l Casein-Hydrolysat 10 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt 15 g/l Agar (optional)
LB/Amp:	LB-Medium 100 mg/l Ampicillin
Vogels Minimalmedium: (Vogel, 1956)	3 g/l Natriumcitrat 5 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 2 g/l $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 5 $\mu\text{l}$ Biotin 0,1 ml Spurenelementlösung 20 g/l Saccharose
Agarmedium	Vogels Minimalmedium 16 g/l Agar 15 g/l Sorbose
Antimycin-Selektionsmedium:	Vogels Minimalmedium 5 g/l Saccharose 3 mg/l Antimycin
Antimycin-Agarplatten:	Antimycin-Selektionsmedium 4,5 g/l Sorbose (nach Autoklavierung zugegeben) 16 g/l Agar
Kreuzungsmedium: (Westergaard, 1947)	1 g/l $\text{KNO}_3$ 0,7 g/l $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l NaCl 0,5 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin 0,1 ml Spurenelementlösung 15 g/l Saccharose 16 g/l Agar pH 6,5
Spurenelementlösung: (Davis und de Serres, 1970)	50 g/l Citronensäure 50 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

---

	2,5g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5g/l $\text{H}_3\text{BO}_3$ 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,5g/l $\text{MnSO}_4$
Transformationsplatten:	20 ml/l 50 x Vogelsmedium 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin 1 M Sorbit 0,1 ml/l Spurenelementlösung 15 g/l L-Sorbose 20 g/l Saccharose 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 16 g/l Agar 0,5 mg/l Benomyl
Topagarose:	0,7 % (w/v) Low Melting Agarose 20 ml/l 50 x Vogelsmedium 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin 1 M Sorbit 0,1 ml/l Spurenelementlösung 15 g/l L-Sorbose 20 g/l Saccharose
DNA-Probenpuffer 5x:	50 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 10 mM Ethylendiaminteressigsäure (EDTA) 445 mM Tris-Borat, pH 8,3
Protein-Probenpuffer 4x:	1 M Saccharose 200 mM Tris-Acetat, pH 6,8 5 mM EDTA 7 mM Dithioerythritol (DTE) 5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Kammerpuffer:	2 M Glycin 0,25 M Tris-Cl, pH 8,3 0,5% (w/v) SDS
Isolationspuffer:	50 mM Tris-Ac, pH 7,0, 15 % Saccharose, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Lysepuffer:	50 mM EDTA, pH 8,0 0,2 % SDS 100 $\mu\text{g/ml}$ RNase A
PBS:	130 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$

	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBST:	PBS mit 0,1 % Tween-20
SOB (Hanahan, 1983):	2 % Casein-Hydrolysat 1,5 % Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 6,7-7,0
SSC:	150 mM NaCl 15 mM Na-Citrat, pH 7,2
STET:	8 % Saccharose 50 mM Tris-Cl, pH 8,0 50 mM EDTA 5 % Triton-X-100
TB :	10 mM Pipes [1,4 Piperazinbis(ethansulfonsäure)] 55 mM MnCl <sub>2</sub> 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl
TBE:	89 mM Tris-Borat 1 mM EDTA, pH 8,3
TE:	10 mM Tris-Cl, pH 8,0 1 mM EDTA

### 3.2 Mikroorganismen, Vektoren und Oligonukleotide

#### Mikroorganismen

<i>E. coli</i>	DH5 $\alpha$ (Hanahan, 1983)
<i>N. crassa</i>	Wildtyp SL 74 OR23 1A (FGSC 987)
<i>N. crassa</i>	Wildtyp SL 74 OR8 1a (FGSC 988)
<i>N. crassa</i>	Mutante <i>nuo20.9</i> (Krüll, 1995)
<i>N. crassa</i>	Mutante <i>uco5</i> (Nehls, unveröffentlicht)

#### Vektoren

pCSN43	(Staben <i>et al.</i> , 1989)
pMYX2	(Campbell <i>et al.</i> , 1994)
pUCO5c	(Nehls, unveröffentlicht)

## Oligonukleotide

MYX2-Ascl 1	5'-TTGGCGCGCCGGGGATCCACTTAACG-3'
MYX2-Ascl 2	5'-TTGGCGCGCCGGGTACCTCTGGTTGG-3'
cDNA-Ascl 1	5'-TTGGCGCGCCATGGCGCCCGTCTCGATCG-3'
cDNA-Ascl 2	5'-TTGGCGCGCCTTAACCAATGACAAGCTTGCCC-3'
FeS-cDNA I	5'-ATGGCGCCCGTCTCGATCG-3'
FeS-cDNA II	5'-TTAACCAATGACAAGCTTGCCC-3'
hyg I	5'-CTGAACTCACCGCGACGT-3'
hyg II	5'-GGGCGTCGGTTTCCACTAT-3'
ben I	5'-GGGATCCACTCGACGAAGTAGG-3'
ben II	5'-TCCAGCTCGAGCGCATGAACG-3'

### 3.3 Anzucht der Mikroorganismen

Zur Anzucht von *E. coli* wurden 4 ml LB- bzw. LB/Amp-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskulturen wurden zum Animpfen größerer Kulturen zur analytischen Plasmidisolierung oder zum Anlegen von Stammkulturen verwendet. Stammkulturen wurden in 50 % (v/v) Glycerin bei -70 °C gelagert.

Zur Gewinnung von *N. crassa* Makrokonidien wurde 3 ml Vogels-Medium mit 1,5 % (w/v) Agar in 8 ml Reagenzgläsern mit Makrokonidien oder Hyphen angeimpft, 2 - 8 Tage unter Belichtung bei 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert (Sebald et al., 1979). Bei Anzucht der Mutante *nuo20.9* wurde dem Medium 150 mg/l Hygromycin B zugegeben. Das Wachstum in Flüssigkultur erfolgte in 100 - 1000 ml Schüttelkulturen (Vogels-Medium) 16 h lang unter Belichtung bei 28 °C (Weiss et al., 1970; Davis & de Serres, 1970). Durch Abfiltrieren mit einem Büchnertrichter unter Wasserstrahlvakuum wurden die Hyphen geerntet und zur Lagerung bei -70 °C eingefroren. Bei einer Kultivierung auf Agarplatten wurde dem Medium 1,5 % Sorbose zugegeben. Sorbose hemmt das Wachstum des Pilzes und bewirkt ein koloniales Wachstum auf den Platten (Brockman et al., 1963). Die Kultivierung der Mutante *uco5* benötigte eine 5 fache Inkubationszeit. Zur Induktion des qa2-Promotors wurden 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 zugesetzt.

Ascosporen wurden in Petrischalen auf Kreuzungsmedium gewonnen. Die Agarplatten wurden mit Makrokonidien zweier Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp angeimpft, für 14 Tage bei 24 °C im Dunklen kultiviert und anschließend die Petrischalen für 5 - 7 Tage bei 28 °C unter Belichtung inkubiert. Die an den Deckeln haftenden Ascosporen wurden in sterilem H<sub>2</sub>O suspendiert und bei 4 °C gelagert. Sie wurden auf Sorbosemedium ausplattiert, bei 60 °C 2 – 4 h hitzeaktiviert und anschließend für 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Die gebildeten Kolonien wurden einzeln in Agarröhrchen übertragen.

### 3.3.1 Kultivierung von *N. crassa* unter Kupfer-limitierten Bedingungen

Alle Glasgeräte für die Kupfer-limitierten Lösungen wurden über Nacht in 5 % Detergenzlösung (RBS 35, Carl Roth OHG) eingelegt und anschließend nacheinander für 30 min in konzentrierter Salzsäure und 1 % EDTA getaucht. Nach jedem Schritt wurde mehrmals gründlich mit bidestilliertem Wasser gespült (Schwab, 1973; Giorgio *et al.*, 1963). Vogelsminimalmedium (ohne Spurenelementlösung) wurde in 20-facher Konzentration angesetzt und auf zwei Arten ihres Kupfers entzogen. Anschließend wurde Spurenelementlösung ohne Kupfersulfat hinzugegeben. Die eingesetzten Salze hatten analytischen Reinheitsgrad. Die verdünnten Saccharose-haltigen sterilen Vogelsmedien wurden mit verminderten Konidienmengen ( $5 \cdot 10^4$  Konidien pro ml) angeimpft.

Zum Kupferentzug wurde als Chelat-Kationen-Austauscher Chelex 100 (200 - 400 mesh, BioRad) verwendet, das nach Herstellervorschrift in die Ca<sup>2+</sup>-Form überführt wurde (Abdullah *et al.*, 1972). Das Vogelsmedium-Konzentrat wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von 100 ml/h durch die Säule (0,8 x 6 cm) gepumpt (Schwab, 1973). Alternativ wurde Kupfer durch Extraktion nach Martens und Githens (1952) mit Zink Dibenzyldithiocarbamat (DBDC) in Tetrachlorkohlenstoff aus sauren Lösungen extrahiert. 1 l 20-fach konzentriertes Medium wurde dafür in einem 2 l Erlenmeyerkolben angesetzt und mit 2 ml einer 12 N HCl-Lösung versetzt. Nach Zugabe von 25 ml 0,015 % (w/v) DBDC-Lösung in CCl<sub>4</sub> wurde der Kolben für 45 min bei 250 upm geschüttelt. Die untere Phase wurde mit einer Glaspipette abgenommen und die Extraktion zwei mal wiederholt. Um Reste von DBDC zu extrahieren, wurde die

wässrige Lösung kurz mit 25 ml  $\text{CCl}_4$  gewaschen. Abschließend wurde mit Ammoniak der pH-Wert eingestellt (Giorgio *et al.*, 1963).

### 3.3.2 Zuckerbestimmung mittels Dünnschichtchromatographie

Auf Silica-Gel 60 DC-Platten (20·10 cm, Merck) wurden jeweils 2  $\mu\text{l}$  Kulturüberstand punktförmig mit einem Abstand von ca. 1 cm aufgetragen. Anschließend wurde die DC-Platte einige Minuten an der Luft getrocknet und in eine Trogkammer (Laufkammer) mit 50 % Ethylacetat, 20 % Ethanol (96 %ig), 10 % Essigsäure (60 %ig) und 10 % gesättigte Borsäure gestellt. Die Entwicklung der DC-Platte mit dem Laufmittel dauerte 30 - 40 min. Anschließend wurde die Platte getrocknet, bis kein Essigsäure-Geruch mehr vorhanden war. Zur Visualisierung und Lokalisierung der Zucker wurde eine Thymol-Lösung (0,5 g Thymol; 95 ml Ethanol (96 %ig); 5 ml konz.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) durch Eintauchen der DC-Platte (3 s) aufgetragen. In einem Trockenschrank wurde die Platte 10 min bei 110 °C erhitzt. Danach erschienen die Zucker als violette Banden. Durch Auftragung von Saccharoselösungen mit definierter Konzentration konnten nach Vergleich der Farbintensität und der  $R_f$  - Werte sowohl qualitative als auch halbquantitative Aussagen gemacht werden.

### 3.4 Präparation und Auftrennung von Mitochondrienproteinen aus *N. crassa*

2 - 3 g Hyphen aus 250 ml Flüssigkultur (Vogels Medium mit 2 % Saccharose) wurden mit 5 ml Isolationspuffer im Mörser gleichmäßig zerrieben. Zusammen mit 15 ml Glasperlen wurde die Masse in ein 70 ml-Kugelmühlengefäß gegeben, mit Isolationspuffer 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 (Weiss *et al.*, 1970). Das Sediment wurde entweder in 300  $\mu\text{l}$  zuckerfreiem Isolationsmedium oder in 500  $\mu\text{l}$  Reaktionsmedium aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

Für die Solubilisierung der Mitochondrienmembranproteine wurde 0,8 ml der Mitochondriensuspension in Isolationsmedium in ein Eppendorfgefäß mit 0,4 ml 20 % (w/v) Triton X-100 versetzt und das Gemisch 10 min bei 14000 upm zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde ein 5 - 25 % (w/v) Saccharosegradient (12 ml Ultrazentrifugenröhrchen) überschichtet und bei 150000 g (36000 upm, TST 41.14, Kontron Centrikon 2060 Ultrazentrifuge) 16 h zentrifugiert. Die Zuckergradienten wurden danach in 1 ml Portionen fraktioniert.

### 3.5 Verschiedene proteinchemische und analytische Methoden

Die enzymatische Aktivität des Komplex I wurde mit Hilfe der NADH-Ferricyanid Redoxaktivität bestimmt (Friedrich *et al.*, 1989). Dafür wurde die Oxidation von NADH durch Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3Fe(CN)_6$ ) photometrisch bei 410 nm gemessen. Das Reaktionsgemisch enthielt 10  $\mu$ l der Probe in 1 ml Messpuffer (50 mM Tris-Cl pH 7,5; 0,05 % Triton X-100), 1 mM  $K_3Fe(CN)_6$  und 0,1 mM NADH. Die zeitliche Extinktionsänderung wurde bei Raumtemperatur mit einem Shimadzu UV 120-02-Spektralphotometer bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient für  $K_3Fe(CN)_6$  beträgt  $\epsilon_{410\text{ nm}} = 1\text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

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.

Zur Bestimmung der Atmungsaktivität der isolierten Mitochondrien wurden 0,2 - 1,0 mg Mitochondrienprotein in einem auf 30 °C temperierten 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Succinat (10 mM) als Substrat bei Anwesenheit verschiedener Hemmstoffe inkubiert und der Sauerstoffverbrauch mit einer Clark-Elektrode (Gilson) verfolgt (Weiss *et al.*, 1970). Als Hemmstoffe wurden 1  $\mu$ M Antimycin A, 1 mM KCN oder 2 mM SHAM eingesetzt.

Zur spektroskopischen Bestimmung der Cytochrome *a*, *b* und *c* wurden 300  $\mu$ l der Mitochondriensuspension mit 300  $\mu$ l 10 % Triton X-100 versetzt, homogenisiert und 12 min bei 14000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert. Der Überstand wurde 3-fach verdünnt und das Absorptionsspektrum von 500 nm bis 650 nm erst der

unbehandelten oxidierten Probe und nach Zugabe von einigen Körnchen Dithionit der reduzierten Probe aufgenommen. Der Cytochromgehalt wurde aus dem Differenzspektrum (dithionitreduzierte Form minus luftoxidierte Form) mit den Extinktionskoeffizienten für Cytochrom *aa*<sub>3</sub>,  $\epsilon_{605\text{nm}} = 23 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , Cytochrom *b*,  $\epsilon_{560\text{nm}} = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , und Cytochrom *c*,  $\epsilon_{550\text{nm}} = 19 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , berechnet.

Zur Westernblot Analyse wurden zu je 20  $\mu\text{l}$  Proben mit 150 - 500  $\mu\text{g}$  Mitochondrienprotein 30  $\mu\text{l}$  Probenpuffer zugegeben, die Suspension etwa 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, durch SDS-PAGE mit einem 3 % Sammel- und einem 16 % Trenngel (Laemmli, 1970) bei 180 V und 35 mA in 16 bis 18 h aufgetrennt und in einer Tank-Blot-Apparatur in Blotpuffer auf Cellulosenitratmembranen (Schleicher & Schuell) bei 4 °C und 1 mA pro  $\text{cm}^2$  für 1 - 3 h transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde anschließend 1 h in PBS mit 3 % (w/v) Magermilchpulver, dann 5 min mit PBST gewaschen und anschließend 2 - 4 h mit einem polyklonalen Antiserum gegen die 20,9 kDa Untereinheit des Komplex I in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST mit 3 % (w/v) Rinderserumalbumin inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit PBST wurde die Membran, 1 h in PBST mit 1 : 3000 verdünnten Protein A-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Zymed) geschüttelt. Nach erneutem Waschen mit PBS und 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 wurden die Proteinbanden mit 0,05 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin, 0,03 % (w/v)  $\text{NiSO}_4$ , 0,03 % (w/v)  $\text{CoSO}_4$  und 0,1 % (v/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  gefärbt (De Blas *et al.*, 1983).

### 3.6 Transformation von Mikroorganismen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 1000 ml SOB-Medium mit 200  $\mu\text{l}$  einer Übernachtskultur angeimpft und bei 18 °C unter starkem Schütteln bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden 10 min auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (4 °C, 2500 g, 10 min) sedimentiert, in 80 ml TB resuspendiert, erneut nach zehnminütiger Inkubation auf Eis abzentrifugiert und in 20 ml TB aufgenommen. Nach Zugabe von Dimethylsulfoxid bis zu einer Endkonzentration von 7 % wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Zur Transformation wurden 200  $\mu\text{l}$  der kompetenten Zellen aufgetaut, mit 10 - 200 ng Plasmid-DNA versetzt und für mindestens 15 min auf Eis inkubiert. Die

Transformationsansätze wurden 90 s auf 42 °C erhitzt und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden kurz abzentrifugiert, in 50 - 150 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB/Amp-Agarmedium ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Transformation von *N. crassa* wurden mehrere Schrägagarkulturen mit je 2 ml 1 M Sorbit suspendiert. Die Konidienkonzentration wurde durch Zählen in einer Thomakammer bestimmt und auf  $6 \cdot 10^8$  Konidien pro ml eingestellt. Die Zellwände wurden mit 20 mg/ml Lysing Enzymes (Sigma L-1412) für 2 h bei 28 °C unter leichtem Schütteln abgebaut, die Protoplasten für 5 min bei 1000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert und anschließend zweimal mit 1 M Sorbit und einmal mit 1 M Sorbit, 1 % PEG 3350 gewaschen. Die Konzentration der Protoplasten wurde bestimmt und auf  $2 \cdot 10^8$  pro ml eingestellt. Je 400 µl dieser Suspension wurden mit 4 µg DNA für 20 min auf Eis inkubiert und 3 mal im Abstand von je 1 min elektroporiert (750 V,  $\tau = 250 \mu\text{s}$ , Eppendorf Multiporator). Nach zwanzigminütiger Kühlung auf Eis wurde 1 ml Vogels-Medium mit 1 M Sorbit zugegeben und mindestens 1 h bei 28 °C geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden jeweils mit 10 ml Topagarose (0,7 % Low Melting Agarose, BioRad) gemischt, auf Transformationsplatten ausplattiert und 3 - 7 Tage bei 28 °C inkubiert. Die einzelnen Transformanten wurden mit einer sterilen Platinnadel auf Schrägagarröhrchen mit Chinasäure übertragen.

### 3.7 DNA Isolierung

Die Isolierung von Plasmid DNA aus *E. coli* erfolgte in Anlehnung an die Boiling-Lysis-Methode (Holmes und Quigley, 1981). 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* wurden 30 s bei 14000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 500 µl kaltem STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 µl Lysozymlösung (50 mg/ml in TE-Puffer) wurde der Ansatz 15 min auf Eis, 3 min in kochendem Wasser und wieder 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 14000 g zentrifugiert und das Sediment mit einem Zahnstocher aus dem Eppendorfgefäß entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mit 500 µl Isopropanol 10 min bei -20 °C gefällt, durch 15 min Zentrifugation bei 14000 g sedimentiert. Die getrocknete

DNA wurde in 50 µl Wasser aufgenommen. Für die Plasmidisolierung im großen Maßstab wurden die Zellen aus einer 50 ml LB/Amp-Übernachtskultur geerntet und die DNA mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift isoliert.

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *N. crassa* wurde 300 - 500 mg (Feuchtmasse) frisches, in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Mycel fein gemörsert und in ein 2 ml Safelock-Eppendorfgefäß mit 0,9 ml Lysepuffer versetzt und 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. Die Trennung der Phasen wurde durch 2 minütige Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) erhalten. Anschließend wurde die DNA mit einem Volumen Isopropanol gefällt und abzentrifugiert (10 min, 14000 g). Das DNA-Sediment wird mindestens eine Stunde an der Luft getrocknet und in 50 - 100 µl Wasser aufgenommen. Die DNA wird mit zwei Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 5 M NaCl-Lösung erneut gefällt. Nach Sedimentierung und Trocknung wird das DNA-Sediment anschließend in 50 - 100 µl Wasser mit 1 µg/ml RNase A aufgenommen.

### 3.8 Molekularbiologische Methoden

Zur Southernblot Analyse wurde die DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosegele wurden jeweils 1 h in konz. HCl-Lösung und anschließend in 0,4 M NaOH geschwenkt. Aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente auf Nylonmembranen (Biodyne B, Pall) mit 250 mM Na-Phosphat, pH 7,2, über Nacht bei Raumtemperatur übertragen (Southern, 1975). Die radioaktive Markierung wurde mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-ATP (3 Ci/mmol) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) durchgeführt. 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 und Gilbert, 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 Bioanalyser Fuji BAS 1800 durchgeführt.

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente durch die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin-Elmer) in einem Gesamtvolumen von 50 µl in dünnwandigen 200 µl Reaktionsgefäßen (Biozym Diagnostik GmbH) durchgeführt (Mullis und Faloona, 1987). Verwendet wurden der 10 x Expandpuffer und der Enzymmix des Expand Long Template PCR System (Roche). 50 - 200 ng DNA wurden als Matrize mit je 100 pmol Oligonukleotid-Primer und 0,8 µl Enzymmix in Expandpuffer mit 1,75 mM MgCl<sub>2</sub> 5 min bei 95 °C denaturiert. Es wurden unter variierenden Bedingungen 20 - 30 PCR-Zyklen durchgeführt. Nach Beendigung der Zyklen wurde zur vollständigen DNA-Synthese 10 min bei 72 °C inkubiert. Bei präparativen Ansätzen wurde die amplifizierte DNA aus einem 0,8 % Agarosegel mit dem QIAEX II Kit (Qiagen) gereinigt und isoliert.

Zur Restriktion wurden Ansätze von 0,2 - 2 µg Plasmid oder genomischer DNA wurden in 20 µl Gesamtvolumen mit 5 - 10 U Restriktionsenzym für 1 - 4 h gespalten. Restriktionen im großen Maßstab wurden in 50 - 100 µl Gesamtvolumen mit 5 - 10 U Restriktionsenzym pro µg DNA für 1 - 4 h durchgeführt.

Zur Dephosphorylierung (Sambrook *et al.*, 1989) wurde linearisierte DNA 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).

Zur Ligation wurden linearisierte DNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis des Inserts zu Vektor von 3 : 1 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 – 16 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. 10 - 30 ng DNA des Ligationsansatzes wurden zur Transformation eingesetzt.

Zur elektrophoretische Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in Abhängigkeit von der Fragmentgröße 0,8 - 1 % Agarosegele (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer bei einer Spannung von 2 - 8 V/cm verwendet (Sambrook et al., 1989). Dabei wurden die DNA-Fragmente durch UV-Fluoreszenz des Ethidiumbromid-Komplexes bei 254 nm sichtbar gemacht. Bei präparativen Gelen wurde nach gelelektrophoretischer Trennung von 5 - 20 µg DNA 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.

### **3.9 Mutagenese von *N. crassa* mit ultravioletter Strahlung und Filtrations-Anreicherung**

Aus dem in Schrägagarröhrchen kultivierten Stamm wurde eine Suspension hergestellt. Zur Konzentrationsbestimmung der Konidiensuspension wurde eine Neubauer- oder Thoma-Zählkammer verwendet. Für die Mutagenese wurde zunächst 5 ml einer  $2 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$  Suspension aus Makrokonidien und sterilem Wasser in eine Petrischale gegeben. Die Bestrahlung wurde über offenen Schalen bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt (Davis und de Serres, 1970). Durch Behandlung in unregelmäßigen Zeitintervallen (bis höchstens 30 Minuten) konnte eine Zeit-Effekt-Beziehung aufgestellt werden. Dafür wurde jeweils ein Aliquot der behandelten Suspensionen ausplattiert und die gewachsenen Kolonien gezählt. Als Referenz wurden nicht bestrahlte Konidien verwendet.

Die Konzentration der lebensfähigen Konidien wurde mit Hilfe der Dosis-Effekt-Beziehung und der Behandlungszeit berechnet.  $1,5 \cdot 10^6$  der lebensfähigen Konidien wurden in 50 ml Selektionsmedium aufgenommen ( $3 \cdot 10^4$  Konidien pro ml Endkonzentration) und bei 28 °C geschüttelt. Die ausgekeimten Konidien wurden durch einen sterilen Trichter mit Glaswolle abfiltriert. Nach der Filtration wurde ein Aliquot auf Vogels-Minimalmedium Agarplatten ausplattiert, die das Wachstum von Komplex I-Mutanten gewährleisten. Nach zwei bis sechs Tagen wurden die entstandenen Kolonien ausgestochen und einzeln in Schrägagarröhrchen kultiviert.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Auswirkungen defekter Atmungskettenkomplexe auf das Wachstum von *N. crassa*

Die Entwicklung eines Selektionsverfahrens für Komplex I-Mutanten von *N. crassa* basiert auf einem verzögerten Wachstum durch Blockierung der protonenpumpenden Elektronenwege in der Atmungskette. Dazu wurden die Auswirkungen defekter Atmungskettenkomplexe auf das Wachstum untersucht. Komplex I-Mutanten von *N. crassa* wurden bereits intensiv charakterisiert. Sie zeigen kein auffälliges Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp (vgl. 2.5). Zur Bestimmung des Phänotyps von *N. crassa*-Mutanten, die durch einen Enzymdefekt die Elektronen von Ubichinol zu Sauerstoff über die alternative Ubichinol Oxidase übertragen, wurde eine Komplex III-Mutante (*uco5*) herangezogen. Bei einer Kombination der Defekte in Komplex I und Komplex III ist die Atmung vollkommen von der energie-konservierenden Protonentranslokation entkoppelt. Zur Untersuchung der Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten von *N. crassa* wurden Kreuzungen zwischen Komplex I- und Komplex III-Mutanten durchgeführt.

#### 4.1.1 Genausstattung, Wachstum und Atmungsaktivität einer Komplex III-Mutante von *N. crassa*

Die Komplex III-Mutante *uco5* wurde freundlicherweise von Dr. Uwe Nehls zur Verfügung gestellt. Sie war durch homologe Rekombination des *uco5*-Gens mit einer defekten Genkopie hergestellt worden. Das *uco5*-Gen kodiert für die FeS-Untereinheit, Untereinheit 5 des Atmungskettenkomplex III, der Ubichinol: Cytochrom c Oxidoreduktase. Es lagen zwei Isolate vor (*uco5-a* und *uco5-b*), dessen Unterschiede nicht bekannt waren. Beide Stämme wurden zunächst auf ihr Wachstumsverhalten und die Atmungsaktivität ihrer Mitochondrien untersucht.

Im Vergleich zum Wildtyp wuchsen sie in Vogels Minimalmedien sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkulturen 5 fach langsamer. In Anwesenheit von

Hygromycin wuchsen sie nicht, obwohl das Hygromycinresistenzgen (*hph*-Gen) bei der Herstellung der Mutanten als dominanter Transformationsmarker eingesetzt worden war. Durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit genomischer DNA der Mutanten als Template und den Primern hyg I und hyg II wurde ein 990 Bp großes Fragment amplifiziert, das in der Größe dem *hph*-Gen entspricht. In Ansätzen mit genomischer DNA des Wildtyps trat dieses Fragment nicht auf.

Deswegen wurde die Anwesenheit des *hph*-Gens auch durch Southern-Analyse überprüft. Dafür wurde die genomische DNA mit Hind III und Bam HI verdaut und mit dem *hph*-Gen, das durch PCR mit den Primern hyg I und hyg II aus dem Plasmid pCSN43 amplifiziert wurde, hybridisiert. Die Sonde markierte wie erwartet in der genomischen DNA von *nuo20.9* ein 2,8 kBp-Fragment und kein Fragment in Wildtyp-DNA (Abb. 14). Bei den *uco5*-Mutanten wurden zwei DNA-Fragmente erkannt (2,5 kBp und 3,5 kBp). Da das *hph*-Gen keine Hind III- oder Bam HI-Schnittstelle enthält, ist es entweder doppelt vorhanden oder es besitzt eine Mutation, die zu einer weiteren Schnittstelle führt. Für letztere Begründung spricht die Intensitätsverteilung der Banden in Abbildung 14. Die Doppelbande trat nur bei Verwendung vom Hind III auf.

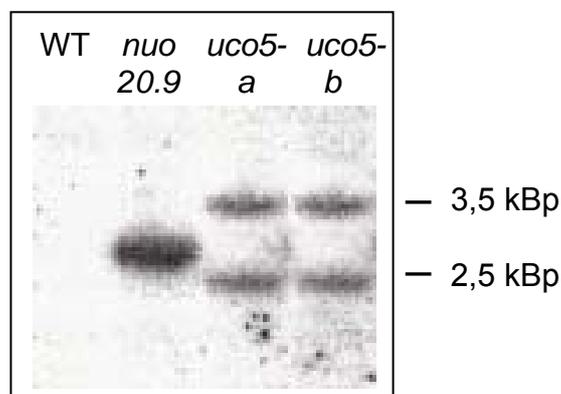


Abb. 14: Southern-Analyse von genomischer DNA des Wildtyps (WT) und der Mutanten *nuo20.9*, *uco5-a* und *uco5-b* von *N. crassa*. Die DNA wurde mit Hind III und Bam HI geschnitten und mit einer *hph*-Gen Sonde hybridisiert.

Die fehlende Hygromycinresistenz der *uco5*-Mutante ist demnach entweder auf einen Defekt im *hph*-Gen zurück zu führen oder auf die geringe Vitalität der Mutanten.

Zur Untersuchung des Komplex III-Defekts wurde die Atmungsaktivität und Inhibitorsensitivität isolierter Mitochondrien des Wildtyps (74A) und der *uco5*-

Mutanten mit Succinat als Substrat polarographisch bestimmt (Tab. 2). Die Succinatatmung wurde nahezu vollständig durch Salicylhydroxamsäure (SHAM) gehemmt, was eindeutig zeigte, dass in beiden *uco5*-Mutanten Komplex III defekt ist und Succinat über die alternative Ubichinol Oxidase veratmet wird.

Tab. 2: Antimycin- und Salicylhydroxamatsensitivität der Succinatatmung von Mitochondrien aus *N. crassa* Wildtyp bzw. Mutanten *uco5*. Die Antimycin-sensitive Atmung erfolgt über Komplex III, die Salicylhydroxamat-sensitive Atmung über die alternative Ubichinol Oxidase.

Stämme	Succinatatmung in Anwesenheit von	
	Antimycin	Salicylhydroxamat
	[U/g Protein]	
WT	42	1
<i>uco5-a</i>	2	43
<i>uco5-b</i>	2	32

#### 4.2 Letalität von Komplex I-/Komplex III-Doppelmutanten

Beantwortung der Frage, ob *N. crassa* mit einer ausschließlich alternativen, also nicht-protonenpumpenden Atmungskette über die alternative NADH Dehydrogenase und Ubichinol Oxidase, lebensfähig ist, wurden Kreuzungen zwischen einer Komplex I-Mutante und den *uco5*-Mutanten durchgeführt und die erhaltenen Ascosporen durch Southern-Analyse untersucht.

Da die Paarungstypen der Mutanten *uco5-a* und *uco5-b* nicht bekannt waren, wurden jeweils Kreuzungen mit den Komplex I-Mutanten *nuo20.9*, Paarungstyp a, und *nuo78*, Paarungstyp A, angesetzt. Beide *uco5*-Mutanten bildeten mit *nuo20.9* Ascosporen, die auf Sorboseplatten ohne Hygromycin ausplattiert wurden. Auf die Resistenzselektion wurde wegen der vermuteten Vitalitätsschwächung der Doppelmutanten verzichtet. Insgesamt 245 Kolonien wurden auf Schrägagarröhrchen überführt. Davon zeigten 17 Klone im Vergleich zur *uco5*-Mutante ein verlangsamtes Wachstum. Bei vier Kulturen blieb die Konidienbildung gänzlich aus.

Zur Genotypbestimmung der 17 langsam wachsenden Klone wurde ein Southernblot der genomischen DNA, die mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI geschnitten wurde, mit einer radioaktiven *hph*-Sonde durchgeführt. Da das Hygromycinresistenzgen in den Ausgangsmutanten in unterschiedlicher Umgebung vorliegt, ermöglicht der Southernblot die Identifizierung von Doppelmutanten (Abb. 14 und 15).

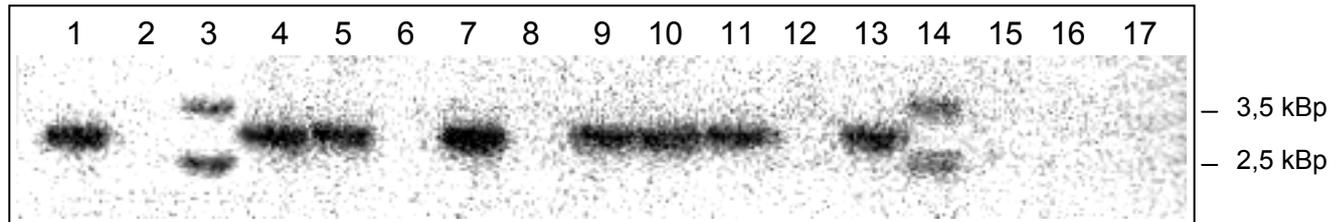


Abb. 15: Southern-Analyse langsam wachsender Kreuzungsmutanten aus den Ausgangsstämmen *nuo20.9* und *uco5*. Die genomische DNA wurde mit Hind III und Bam HI geschnitten und mit einer *hph*-Sonde hybridisiert. Durch Vergleich mit dem Bandenmuster der Ausgangsmutanten *nuo20.9* und *uco5* (Abb. 14) wurde der Genotyp der Klone festgestellt.

Keiner der ausgewählten Stämme zeigte eine Kombination der Gendefekte aus den Ausgangsmutanten, was darauf schließen lässt, dass Komplex I-/Komplex III-Doppelmutanten nicht (oder fast nicht) lebensfähig sind. Die Ergebnisse zeigen, dass eine vollständige Störung der protonenpumpenden Atmungskette nicht ausreichend kompensiert werden kann. Die mitochondriale Atmung kann also nicht ausschließlich über alternative Enzyme erfolgen.

#### 4.2 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten in Kupfer-mangel Medium

Komplex IV, die Cytochrom *c* Oxidase, enthält drei Kupferionen als Redoxgruppen und Kupfermangel im Kulturmedium hat eine verminderte Synthese des Komplex IV und eine vermehrte Synthese der alternativen Ubichinol Oxidase zur Folge (Schwab, 1973). Es wurde deshalb überprüft, ob Kupfermangel zur Selektion von Komplex I-Mutanten geeignet ist. Dazu wurde unter Kupfer-limitierten Bedingungen das Wachstum der Komplex I-Mutante *nuo20.9* mit dem des Wildtyps verglichen. Kupfer-limitiertes Medium wurde entweder durch Extraktion mit einem spezifischen

Komplexbildner oder durch Chelat-Kationen-Austausch-Chromatographie hergestellt. Zur Kontrolle wurden Wildtyp und Komplex I-Mutante auch in Kupfer-haltigen Medien kultiviert.

Tab. 3: Wachstum von *N. crassa* Wildtyp und Komplex I-Mutante unter Kupfer-limitierten und Kupfer-reichen Bedingungen. Zur Kultivierung wurden jeweils 0,5 l Vogels-Minimalmedium mit  $5 \cdot 10^4$  Konidien pro ml angeimpft und 24 h kultiviert. Chelex 100 steht für den verwendeten Chelat-Kationen-Austauscher und DBDC (Dibenzylthiocarbamat) für einen Kupfer-spezifischen Komplexbildner, die zum Entzug von Kupferionen aus den Medien eingesetzt wurden.

Stämme	Hyphengewicht [g]		
	Cu-limitiertes Medium		Cu-reiches Medium
	Chelex 100	DBDC	
Wildtyp 74 A	3,1	3,3	3,2
Komplex I-Mutante <i>nuo20.9</i>	2,7	2,5	2,8

Weder mit dem Wildtyp noch mit der Komplex I-Mutante waren die Hyphenausbeuten unter Kupfer-limitierten Bedingungen signifikant niedriger als die unter Kupfer-supplementierten Bedingungen (Tab. 3).

Die Auswirkung des Kupfermangels auf die Cytochromausstattung und die Atmungsaktivität wurde mit isolierten Mitochondrien untersucht. Die Differenzspektren von dithionitreduzierten zu luftoxidierten Mitochondrien aus Kupfer-limitierend gewachsenen Hyphen zeigten sowohl beim Wildtyp als auch bei der Komplex I-Mutante einen stark (> 90 %) erniedrigten Cytochrom  $aa_3$ -Gipfel bei 605 nm auf, bei normalen Absorptionsgipfel der Cytochrome *b* und *c* bei 560 nm und 550 nm (Abb. 16).

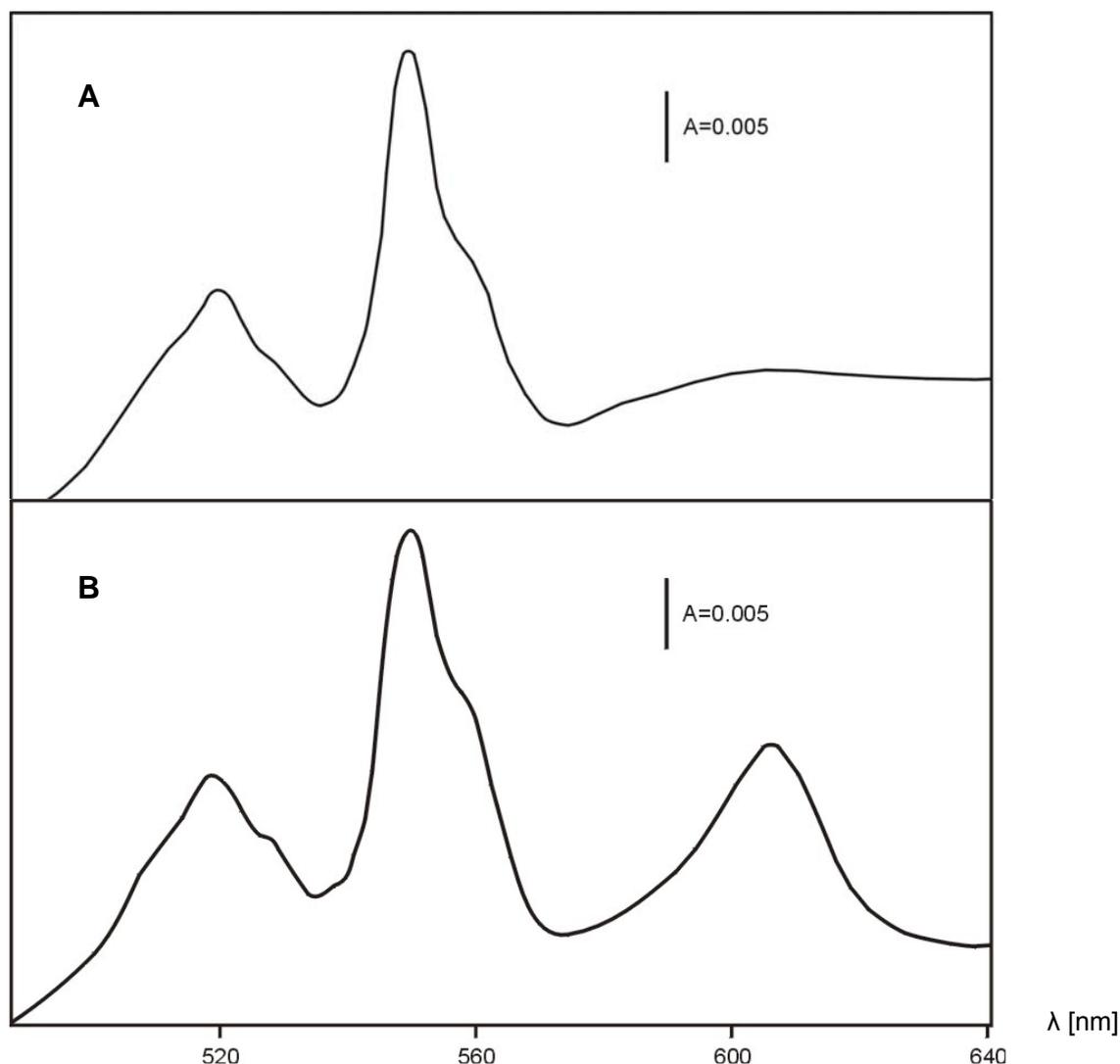


Abb. 16: Differenzspektren von reduzierten minus oxidierten Mitochondrien aus der Komplex I-Mutante *nuo20.9*, die (A) unter Cu-limitierten Bedingungen und (B) unter Normalbedingungen kultiviert wurde. Reduziert wurde mit Natriumdithionit, oxidiert mit Luftsauerstoff.

Die polarographisch bestimmte Succinatatmung der Mitochondrien aus Kupferlimitierten Kulturen war vergleichbar mit der Succinatatmung der Mitochondrien aus Kupfer-reichen Kulturen. Die Sensitivität gegenüber SHAM, einem Hemmstoff der alternativen Ubichinol Oxidase, war in den Mitochondrien aus den Kupfermangel-Hyphen nur wenig (~ 15 %) erhöht (Tab. 4). Demnach führte die starke Verminderung der Komplex IV-Konzentration in den Mitochondrien nur zu einer geringen Verminderung der Succinatatmung und nur zu einer leichten Induktion der Ubichinol Oxidase. In der Kette von Succinat Dehydrogenase, Komplex III und Komplex IV scheint eine Erniedrigung von Komplex IV um 90 % noch zu keiner großen Erniedrigung der gesamten Atmungsaktivität zu führen.

Tab. 4: Atmungsaktivität und Inhibitorsensitivität der Mitochondrien aus der unter Kupfer-limitierten Bedingungen gewachsenen Komplex I-Mutante *nuo20.9*. Chelex 100 steht für den verwendeten Chelat-Kationen-Austauscher und DBDC (Dibenzylthiocarbamat) für einen Cu-spezifischen Komplexbildner, die zum Entzug von Kupferionen aus den Medien eingesetzt wurden. Succinat und die Hemmstoffe wurden während einer Messung nacheinander zugegeben.

Substrat und Hemmstoffe	Atmungsaktivität [U/g]		
	+Cu	DBDC	Chelex 100
Succinat	47	51	72
+SHAM	38	32	49
+KCN	0	1	0

Wegen dieser nur unwesentlich verminderten Atmungsaktivität hatte die stark verminderte Synthese des Komplex IV keine Einschränkung des Wachstums der Komplex I-Mutante zur Folge. Erwartungsgemäß ergab auch die Filtrations-Anreicherungs-Methode unter Kupfer-limitierten Bedingungen mit einer Mischung von Wildtyp und Komplex I-Mutante keine Anreicherung der Mutantenkonidien.

#### 4.3 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten in Antimycin-haltigem Medium

Um die mitochondriale Atmung an den Komplexen III und IV vorbei über die alternative Oxidase zu leiten und damit Komplex I als alleinige Protonenpumpe wirken zu lassen, wurden *N. crassa* Wildtyp und Komplex I-Mutante *nuo20.9* in Gegenwart des Komplex III-Hemmstoffs Antimycin kultiviert. Im Einklang mit den Ergebnissen von Rakatzi (1998) war das Wachstum der Komplex I-Mutante reduziert.

Darauf wurde die Eignung des Antimycinmediums zur Anreicherung von Komplex I-Mutanten durch die Filtrations-Anreicherungs-Methode überprüft, indem Komplex I-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp in Selektionsmedium mit Antimycin und die Anreicherung von Antimycin-sensitiven Mutanten aus UV-behandelten Wildtypsporen

untersucht wurden. Dazu wurde Antimycinmedium mit Konidien von Wildtyp und Hygromycin-resistenter Komplex I-Mutante *nuo20.9* in einem Verhältnis von 1:1 angeimpft. Die Suspensionen wurden im 8 - 15 Stundentakt zur Entfernung der gebildeten Hyphen sukzessiv filtriert. Nach jeder Filtration wurden Konidien aus dem Filtrat ausplattiert und einzeln auf Hygromycinresistenz getestet. Es wurde jedoch kein Anstieg des Anteils von *nuo20.9* mit fortlaufender Zeit nach den Filtrationen festgestellt. Auch Veränderungen der Kultivierungsbedingungen, wie Temperatur, Sorbosezusatz, Antimycin- oder Saccharosekonzentration änderte daran nichts.

Entweder zeigte die Komplex I-Mutante im Antimycinmedium kein verzögertes Auskeimen im Vergleich zum Wildtyp oder es fand keine Regenerierung der *nuo20.9*-Konidien auf den Platten ohne Antimycin statt. Zur Überprüfung des Wachstums in Flüssigmedium wurden die Stämme getrennt voneinander in hoher Konidienkonzentration ( $1 \cdot 10^6$  pro ml) kultiviert. Nach 30 Stunden Inkubation bei 28 °C wurden die Suspensionen filtriert und eine Zuckerbestimmung des Filtrates durchgeführt.

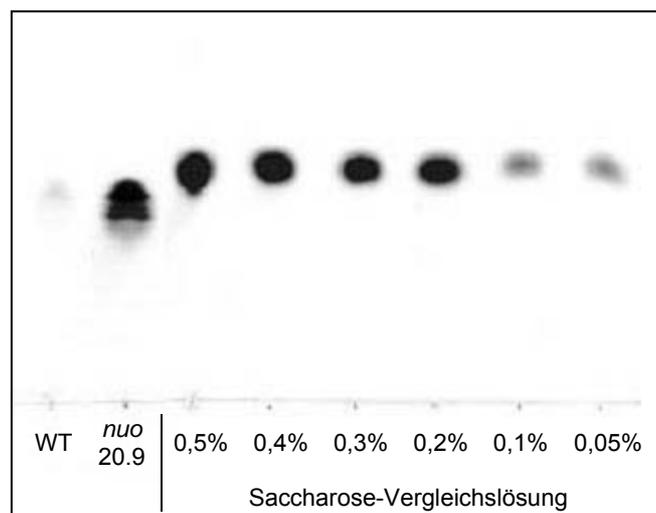


Abb. 17: Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung von Zuckergehalten in Kulturüberstände. Jeweils  $1 \cdot 10^6$  Wildtyp (WT)- und *nuo20.9*-Konidien pro ml wurden in Antimycinmedium inkubiert. Zum Vergleich wurden gleiche Volumina von Saccharoselösungen definierter Konzentration aufgetragen.

Das in Abbildung 17 dargestellte Chromatogramm zeigt eine erhebliche Differenz der Zuckergehalte von Wildtyp- und *nuo20.9*-Konidien suspensionen. Der geringere Zuckerverbrauch von Komplex I-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp, bestätigt ein verzögertes Wachstum im Antimycinmedium. Somit scheint eine irreversible

Hemmung der Auskeimung durch Antimycin stattzufinden. Auch durch Erhöhung der Waschschriffe zur besseren Entfernung des Antimycins aus der Konidiensuspension wurde keine Verbesserung der Auskeimungsrate erreicht.

Zur ungezielten Mutagenese wurden Wildtypkonidien (74A) nach ausgearbeiteten Bedingungen (Tsalastra, Diplomarbeit, 1998) mit UV-Strahlen behandelt. Die Konidien wurden 30 bzw. 45 h in Antimycinmedium inkubiert und anschließend die Hyphen abfiltriert. Nach der Filtration wurden mehrere Sorbose-Agarböden mit Konidien aus dem Filtrat angeimpft. Insgesamt 230 Kolonien wurden ausgestochen und in Schrägagarröhrchen kultiviert. Diese Klone wurden auf Antimycinsensitivität untersucht (Abb. 18).

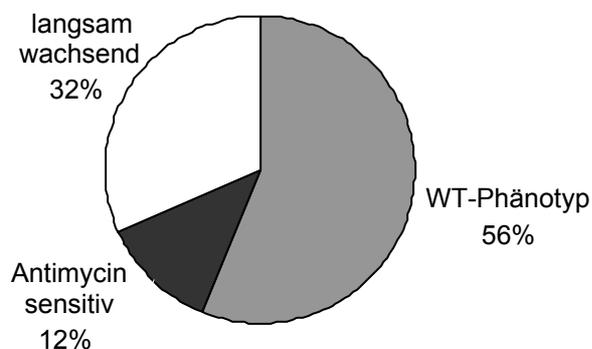


Abb. 18: Wachstumsverhalten selektierter Klone. Es wurde das Wachstumsverhalten von 230 Klonen nach Filtrations-Anreicherung in Antimycinmedium auf Selektionsmedien-Platten mit bzw. ohne Antimycin untersucht.

Mehr als die Hälfte der untersuchten Klone zeigte ein Wildtyp-ähnliches Wachstumsverhalten. Da die Auskeimung dieser Konidien als Folge der mutagenen Behandlung möglicherweise verzögert wurde, wurde die Inkubationszeit der behandelten Konidien in Antimycin-Selektionsmedium auf 70 Stunden verlängert. Diese Untersuchung ergab jedoch keine größere Anreicherung von Antimycinsensitiven Konidien.

Die 28 der insgesamt 230 untersuchten Klone mit Antimycinsensitivität (Abb. 18) wurden auf einen möglichen Komplex I-Defekt untersucht. Dazu wurden die isolierten Mitochondrienmembranen mit Detergenz solubilisiert, die Membranproteine durch Zuckergradientenzentrifugation nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufgetrennt und die Verteilung der NADH-Ferricyanid-Redoxaktivität im Gradienten bestimmt. Komplex I-Mutanten, in denen noch der periphere Arm des Komplex I

gebildet wird, zeigen eine Aktivität in der Mitte des Gradienten. Der intakte Komplex I aus Wildtypmitochondrien hingegen sedimentiert durch etwa  $\frac{3}{4}$  des Gradienten. Alle 28 Kulturen zeigten bei diesem Untersuchungsverfahren einen intakten Komplex I.

#### 4.4 Versuch der Selektion von Komplex I-Mutanten durch transkriptionale Regulation von Komplex III

Kreuzungsversuche zwischen der Komplex III-Mutante *uco5* und der Komplex I-Mutante *nuo20.9* (4.1.2) wiesen auf eine letale Wirkung der Kombination beider Gendefekte hin. Das entspricht das der gesuchten, charakteristischen Ausprägung eines Komplex I-Defekts. Zur Identifizierung von Komplex I-Mutanten lässt sich der Komplex III-Defekt aber nur nutzen, wenn die letale Wirkung der Doppelmutationen aufhebbar ist. Dazu wurde in der Komplex III-Mutante das defekte *uco5*-Gen durch ein intaktes Gen hinter einem regulierbaren Promotor ergänzt. Genkonstrukte aus dem Chinasaure induzierbaren *qa2*-Promotor und der intakten cDNA des in der *uco5*-Mutante ausgeschalteten Gens der FeS-Untereinheit wurden *in vitro* hergestellt durch ektopische Integration in das Genom der *uco5*-Mutante eingebracht. Die Integration der intakten cDNA mit induzierbarem Promotor sollte bei Induktion eine Komplementation des Komplex III-Defekts zur Folge haben. Die Abwesenheit des Induktors Chinasaure hingegen sollte eine Repression der Transkription bewirken und dadurch zu einem Komplex III-Defekt führen. Komplex I-Mutationen, die durch Mutagenese der regulierbaren Komplex III-Mutante erzeugt wurden, wären unter Repressionsbedingung im Wachstum gehemmt aber unter Komplementationsbedingungen lebensfähig.

##### 4.4.1 Konstruktion des pMUCO5c

Zur Erstellung des Genkonstrukts wurde der Expressionsvektor pMYX2 verwendet, der die induzierbare *qa2*-Promotorregion und ein Benomylresistenzgen enthält (Campbell *et al.*, 1994). Zur besseren Handhabung wurde in die Position 928 des Vektors pMYX2 eine singuläre Asc I-Schnittstelle, durch PCR mit den Primern MYX2-AscI 1 und 2, eingefügt (5'-<sup>928</sup>GGCGCGCC<sup>931</sup>-3'; Abb. 19). Die cDNA des *uco5*-

Gens wurde durch PCR mit den Primern cDNA-AscI 1 und 2 und mit pUCO5c als Template, amplifiziert. Dabei wurden Asc I-Schnittstellen flankierend zum kodierenden Bereich eingefügt. Zur Konstruktion von pMUCO5c wurde das 704 Bp große Asc I-Fragment, das die cDNA des *uco5*-Gens enthält, in die Asc I-Schnittstelle von pMYX2 zwischen Promotor und Terminator insertiert. Durch Restriktionsanalysen mit Hind III wurde die Orientierung der *uco5*-cDNA in pMUCO5c überprüft.

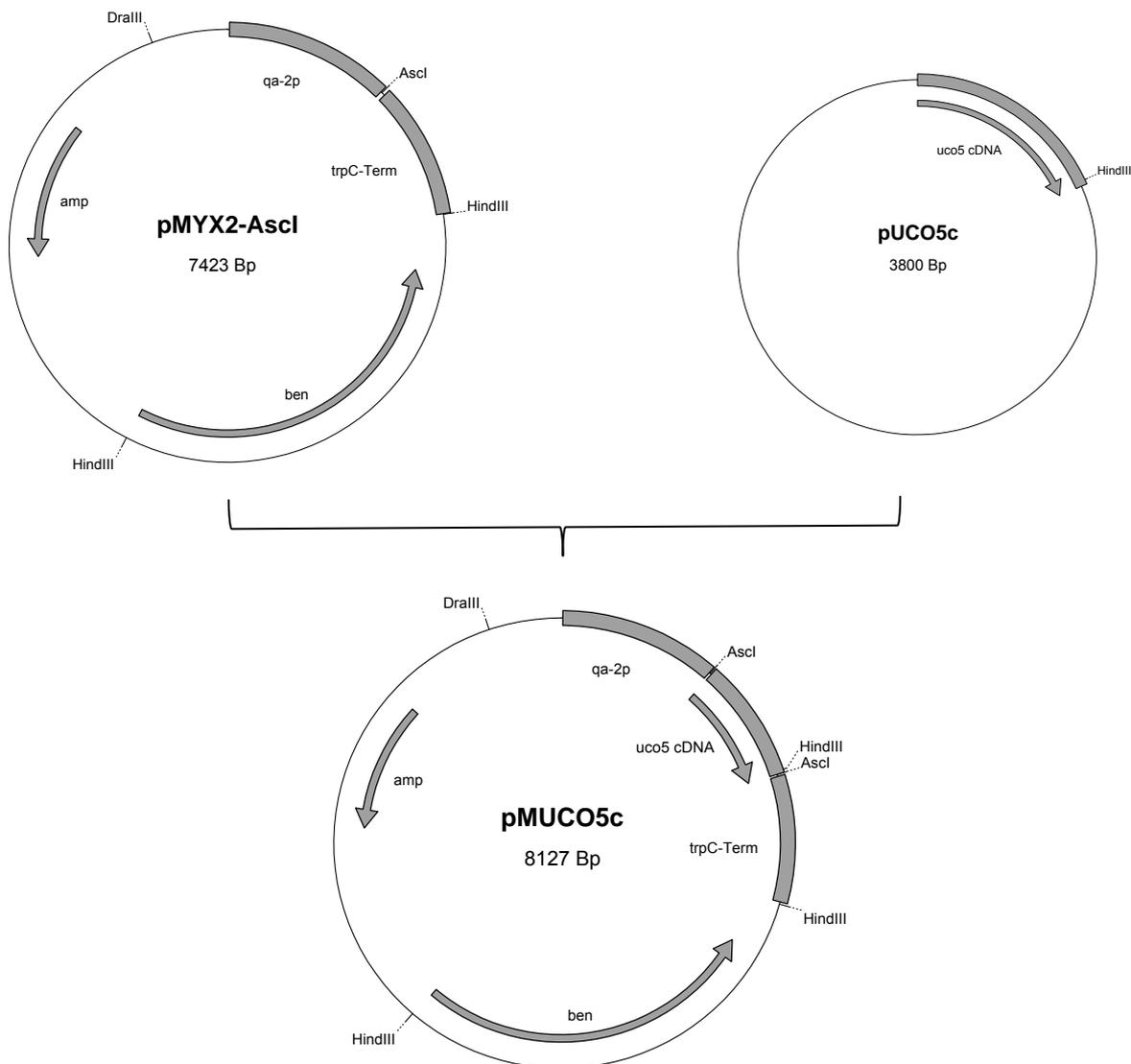


Abb.19: Konstruktion des Expressionsvektors pMUCO5c. Der Vektor pMYX2-AscI wurde durch Einfügen einer Asc I-Schnittstelle an Position 928 des Vektors pMYX2 erstellt. Zur Konstruktion von pMUCO5c wurde pMYX2-AscI durch Asc I gespalten und ein 704 Bp Asc I-Fragment mit der cDNA der FeS-Untereinheit, insertiert. Das 704 Bp-Insert wurde durch PCR mit den Primern cDNA-AscI 1 und 2 aus pUCO5c erhalten. Dabei wurden flankierend zum kodierenden Bereich Asc I-Schnittstellen eingefügt.

#### 4.4.2 Transformation der *uco5*-Mutante mit pMUCO5c

Der Vektor pMUCO5c wurde mit Dra III linearisiert und zur Transformation der *uco5*-Mutante eingesetzt. Auf Medien mit Benomyl ohne Chinasäure bildeten sich keine Kolonien. Bei Anwesenheit von Chinasäure (pH 6,8) in den Medien und Abwesenheit von Benomyl in der Topagarose wurden nach 5 – 14 Tagen Inkubation vier Kolonien pro Ansatz (4 µg Vektor-DNA) isoliert. Davon zeigten 50 % keine Benomylresistenz, was auf die lange Inkubationszeit und das Fehlen von Benomyl in der Topagarose zurückzuführen ist. Zur Überprüfung, ob die geringe Transformationsausbeute mit einem Defekt im Benomylresistenzgen zusammenhängt, wurde der Wildtyp (74A) mit dem Konstrukt pMUCO5c transformiert. Pro Ansatz ergaben sich durchschnittlich 40 Benomyl-resistente Transformanten. Die Bestimmung der Überlebensrate von *uco5*-Mutanten Konidien nach der Lysing-Enzyme Behandlung ergab nur 1 - 2 % wachstumsfähige Protoplasten. Dies deutet darauf, dass die *uco5*-Mutante wegen ihrer starken Vitalitätseinbußen das Transformationsverfahren nur selten überlebt. Durch Erniedrigung der Lysing-Enzyme-Konzentration und der Elektroporationsspannung wurde keine Verbesserung der Ausbeute erreicht.

Von 10 Benomyl-resistenten Transformanten des *uco5*-Stammes wurde genomische DNA präpariert, mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI verdaut und durch Southern-Analyse untersucht. Als Sonde wurde ein DNA-Fragment durch PCR mit den Primern FeS-cDNA I und II und mit genomischer DNA des Wildtyps als Template amplifiziert. Dieses Fragment stellt den ORF (open reading frame) des *uco5*-Gens dar. Zur besseren Übersicht wurde nicht der vollständige *uco5*-ORF als Sonde eingesetzt, sondern ein 685 Bp großes Bam HI-Fragment verwendet. Alle isolierten Transformanten zeigten das Bandenmuster der *uco5*-Mutante und besitzen somit ein defektes *uco5*-Gen (Abb. 20). Bei sechs der 10 untersuchten Transformanten wurde durch das Auftreten einer zusätzlichen Bande eine ektopische Integration des Konstruktes in das Genom nachgewiesen.

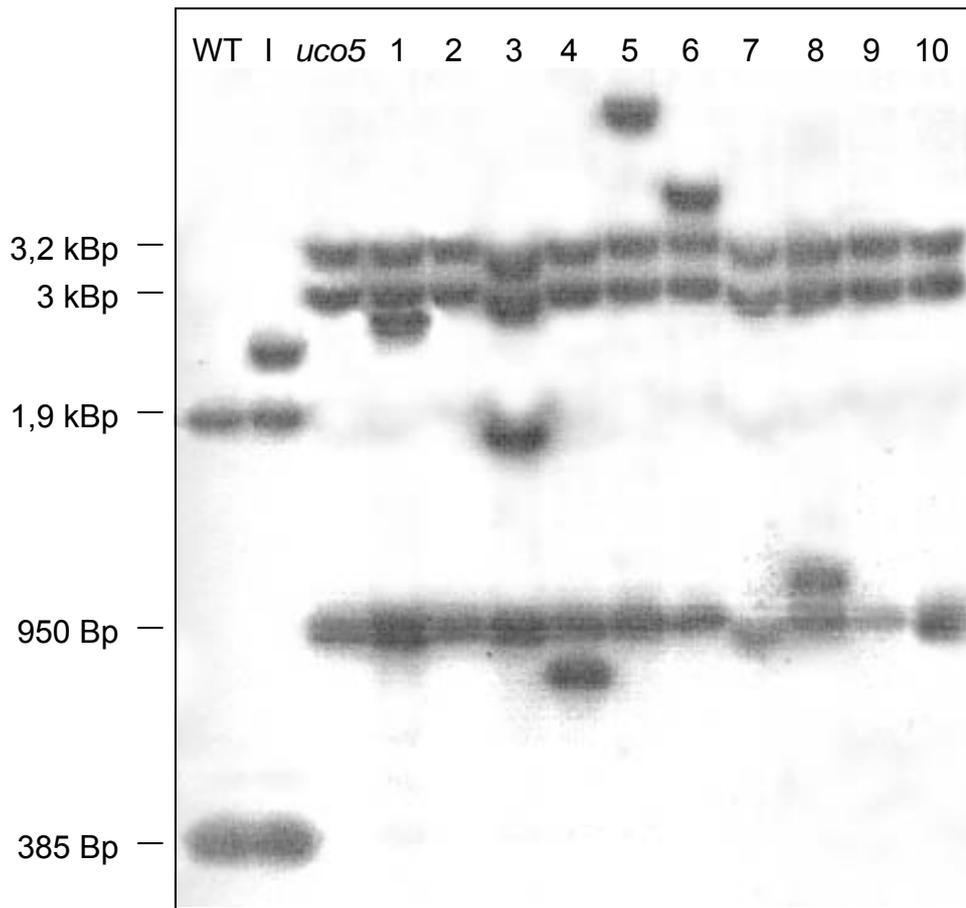


Abb. 20: Southern-Analyse isolierter Transformanten der *uco5*-Mutante. Die genomische DNA der Transformanten wurde mit Hind III und Bam HI gespalten und mit dem radioaktiv markierten 685 Bp Bam HI-Fragment des FeS-Gens als Sonde hybridisiert (*uco5*-Sonde). Die DNA des Ausgangsstammes wurde in Spur *uco5* und die zehn Benomyl-resistenten Transformanten in den Spuren 1 - 10 aufgetragen. Als Vergleich wurden in Spur WT der Wildtyp und in Spur I eine Transformante des Wildtyps aufgetragen. In Hind III/Bam HI gespalte­ner genomischer DNA des Wildtyps repräsentieren die 1,9 kBp und 385 Bp Fragmente den Teil des *uco5*-Originalgens, vom Startkodon bis zur Bam HI-Schnittstelle. In dem enthaltenden Intron ist eine Hind III-Schnittstelle vorhanden, weshalb in der cDNA der UCO5-Untereinheit nur eine Bande erkannt wird. Das Bandenmuster der *uco5*-Mutante ist unverstanden. Das markierte 950 Bp Fragment deutet auf den Verlust einer Bam HI-Schnittstelle. Der Vergleich des Bandenmusters der *uco5*-Mutante und der Transformanten zeigte bei sechs von zehn Transformanten eine zusätzliche Bande und somit eine heterologe Integration des Konstruktes.

Da weitere zusätzliche Banden durch Überlappung mit den Banden des Defektgens unerkant geblieben sein könnten, wurde eine weitere Southern-Analyse unter Verwendung eines Fragmentes des Benomylresistenzgens (*ben<sup>r</sup>*-Gen) als Sonde durchgeführt. Das 1040 Bp große Fragment wurde durch PCR mit den Primern *ben I*

und II und mit dem Vektor pMYX2 als Template amplifiziert. Das im Genom integrierte MUCO5c Konstrukt bildet bei einer Restriktion mit Hind III und Bam HI ein mit der Sonde hybridisierendes 2 kBp Fragment. Das Benomylresistenzgen ist ein homologer Transformationsmarker. Es unterscheidet sich vom *N. crassa* Tubulingen nur durch einen Basenpaaraustausch. In Hind III und Bam HI gespaltener genomischer DNA repräsentierte ein 2,5 kBp Fragment den von der Sonde erkannten Teil des Tubulingens (Abb. 21).

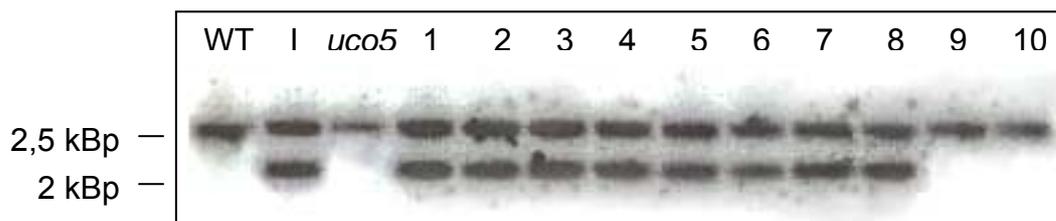


Abb. 21: Southern-Analyse Benomyl-resistente Transformanden der *uco5*-Mutante. Die genomische DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI verdaut und mit einem 1040 Bp Fragment des Benomylresistenzgens als Sonde hybridisiert. Für die Sonde wurde ein DNA-Fragment durch PCR mit den Primern ben I und II und dem Vektor pMYX2 als Template amplifiziert (ben<sup>r</sup>-Sonde). Die DNA des Ausgangsstammes (*uco5*-Mutante) wurde in Spur *uco5* und der zehn Benomyl-resistenten Transformanden in den Spuren 1 - 10 aufgetragen. Außerdem wurden in Spur WT die DNA des Wildtyps und in Spur I die einer Transformande des Wildtyps aufgetragen. Die Sonde erkennt in einer mit Hind III/Bam HI gespaltenen genomischen DNA ein 2,5 kBp Fragment, das ein Teil des Tubulingens darstellt. Bei Transformanden, die das Konstrukt MUCO5c integriert hatten, wird zusätzlich ein 2 kBp Fragment erkannt, das ein Teil des Benomylresistenzgens repräsentiert.

Bei acht der zehn untersuchten Transformanden wurde das Konstrukt in das Genom integriert. Zwei Transformanden zeigten keine Aufnahme des Konstruktes. Trotzdem wuchsen sie auf Benomyl-enthaltenden Medien. Vermutlich führte eine spontane Mutation des Tubulingens zu dieser Resistenz. Acht Transformanden, deren genomische DNA in den Spuren 1 - 8 aufgetragen wurden, wurden auf die Induzierbarkeit der *uco5*-cDNA Expression und die damit verbundene Komplementation des Komplex III-Defektes untersucht.

#### 4.4.3 Eigenschaften der Transformanden

Zur Untersuchung der Induktion und Repression des *uco5*-Gens wurden die Transformanden in Flüssigmedien mit und ohne Chinasäure kultiviert. Aus den Hyphen wurden Mitochondrien isoliert und zur polarographischen Bestimmung der Salicylhydroxamsäure (SHAM)- und Antimycin-sensitiven Atmung, eingesetzt. Die acht untersuchten Transformanden wurden vier verschiedenen Phänotypen zugeordnet (Tab.6). Eine Transformande (Abb. 20, Spur 1) zeigte bei Kultivierung mit Chinasäure den erwarteten Anstieg der Antimycin-sensitiven Atmung und damit eine Induktion der *uco5*-cDNA-Transkription (Tab.6, Nr.1). Sie wurde im weiteren als Mutante *cuco5* bezeichnet (complementation of u*co5*). Bei Kultivierung in Abwesenheit von Chinasäure war die Atmung zu 70 % mit SHAM hemmbar. Eine vollständige Repression der Transkription findet demnach nicht statt. Bei Chinasäure-Abwesenheit wurde ein 4fach geringeres Wachstum beobachtet. Allerdings wuchs auch bei Chinasäure-Anwesenheit die Transformande langsamer als der Wildtyp.

Tab.5: Atmungsaktivitäten isolierter Mitochondrien der Transformanden. Es sind je Phänotyp eine stellvertretende Messung dargestellt. Die Nummerierung entspricht der Spurnummer der Transformanden in Abb. 20. In Klammern sind die Transformanden angegeben, die den gleichen Phänotyp zeigen.

Hemmstoff- zusatz	Succinatatmung [U/g Protein]							
	1		7 (2,6,8)		3 (5)		4	
	-	+QA	-	+QA	-	+QA	-	+QA
-	10	33	34	24	21	20	10	11
SHAM	3	31	1	1	21	20	3	2
Antimycin	7	2	24	18	2	2	6	8
SHAM+Antimycin	1	2	1	1	1	0	0	0

Eine Gruppe von vier Transformanden (Abb. 20, Spuren 2, 6, 7 und 8) zeigte eine nahezu vollständige Hemmung der Succinatatmung durch SHAM ohne Einfluss des Induktors Chinasäure. Der Komplex III-Defekt wird in diesen Transformanden nicht komplementiert. Sie zeigen einen *uco5*-Mutanten Phänotyp mit einem stark beeinträchtigten Wachstum. Zwei Transformanden (Abb. 20, Spuren 3 und 5) zeigten

hingegen ein von Chinasäure unabhängiges starkes Wachstum. Die Succinatatmung ihrer Mitochondrien war nahezu vollständig SHAM-resistent. Der Komplex III-Defekt war in ihnen vollständig komplementiert. Die achte Transformante (Abb. 20, Spur 4) zeigt auch keine Regulation durch Chinasäure, jedoch war die Succinatatmung ihrer Mitochondrien zu 70 - 80 % durch SHAM hemmbar. Bei dieser Transformante fand nur eine eingeschränkte, nicht-regulierbare Komplementation statt. Chinasäure beeinflusste das Wachstum dieser Transformante (Abb. 20, Nr. 4) nicht und eine Verzögerung im Gegensatz zum Wildtyp wurde beobachtet.

Zur Untersuchung der Hygromycinresistenz der Transformanten wurden Hygromycin-enthaltende Agarmedien mit Konidien der Transformanten angeimpft und eine Southern-Analyse mit dem *hph*-Gen als Sonde durchgeführt. Keine der Transformanten zeigten ein Wachstum auf Agarmedien mit Hygromycin. Bei allen Transformanten wurden, wie bei der genomischen DNA der *uco5*-Mutante (Abb. 14), zwei Fragmente (2,5 kbp und 3,5 kbp) von der *hph*-Sonde erkannt. Da sogar die Transformanten, die eine vollständige Komplementation des Komplex III-Defekts aufwiesen (Tab. 5, Nr. 3 und 5) keine Hygromycinresistenz zeigten, ist das aus der Ausgangsmutante *uco5* stammende *hph*-Gen defekt.

#### 4.4.4 Kreuzung der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5* mit der Komplex I-Mutante *nuo20.9*

Ob sich die regulierbare Komplex III-Mutante *cuco5* für die Isolierung ungerichtet erzeugter Komplex I-Mutanten eignet, wurde zunächst mit einer Referenzmutante mit einem zusätzlichen Komplex I-Defekt untersucht. Zur Erzeugung dieser Mutante wurde die *cuco5*-Mutante mit der Komplex I-Mutante *nuo20.9* gekreuzt. Die gebildeten Ascosporen wurden auf Medium mit Chinasäure ausplattiert, 53 Kolonien auf Schrägagarröhrchen kultiviert und auf Benomyl- bzw. Hygromycinresistenz getestet. Von Sechs Klonen, die beide Resistenzen zeigten, wurde genomische DNA präpariert, mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI gespalten und durch Southernblot untersucht. Zur Bestimmung der Genotypen wurden nacheinander drei Sonden eingesetzt (Abb. 19). Zwischen den Hybridisierungsschritten wurde die Membran durch „strippen“ von der radioaktiven Sonde befreit.

Erste Sonde war ein Fragment des *hph*-Gens, das die Disruption des *nuo20.9*- und des *uco5*-Gens durch das Hygromycinresistenzgen anzeigt (vgl. 4.1.1). Die Hygromycinresistenz der Stämme setzt das Vorhandensein des von der *nuo20.9*-Mutante abstammenden intakten *hph*-Gens voraus. Durch die zweite Sonde, *ben*<sup>r</sup>, wurde überprüft, ob die Benomylresistenz der Mutanten auf dem Resistenzgen aus dem MUCO5c-Konstrukt oder einer spontanen Mutation im Tubulingen beruhte (vgl. Abb. 21). Abschließend wurde mit der *uco5*-Sonde das integrierte MUCO5c-Konstrukt im Genom und das defekte *uco5*-Gen identifiziert (vgl. Abb. 20). Bei allen sechs Mutanten wurden die erwarteten Resistenzgene und damit das defekte *nuo20.9*-Gen und das integrierte MUCO5c-Konstrukt nachgewiesen. Vier Mutanten zeigten zusätzlich ein defektes *uco5*-Gen (Abb. 22), was sie als *nuo20.9/cuco5*-Doppelmutanten nachwies.

Zum Vergleich wurden Ascosporen ohne Chinasäure ausplattiert und die entstandenen Kolonien wie oben beschrieben auf Resistenzen untersucht. Von insgesamt 106 isolierten Kolonien zeigten 11 Klone ein Wachstum auf Hygromycin- und auf Benomyl-enthaltenden Agarmedien. Die Southern-Analysen zeigten kein defektes *uco5*-Gen. Demnach ist die Anwesenheit des Induktors Chinasäure essentiell für das Auskeimen und Anwachsen der *nuo20.9/cuco5*-Doppelmutante.

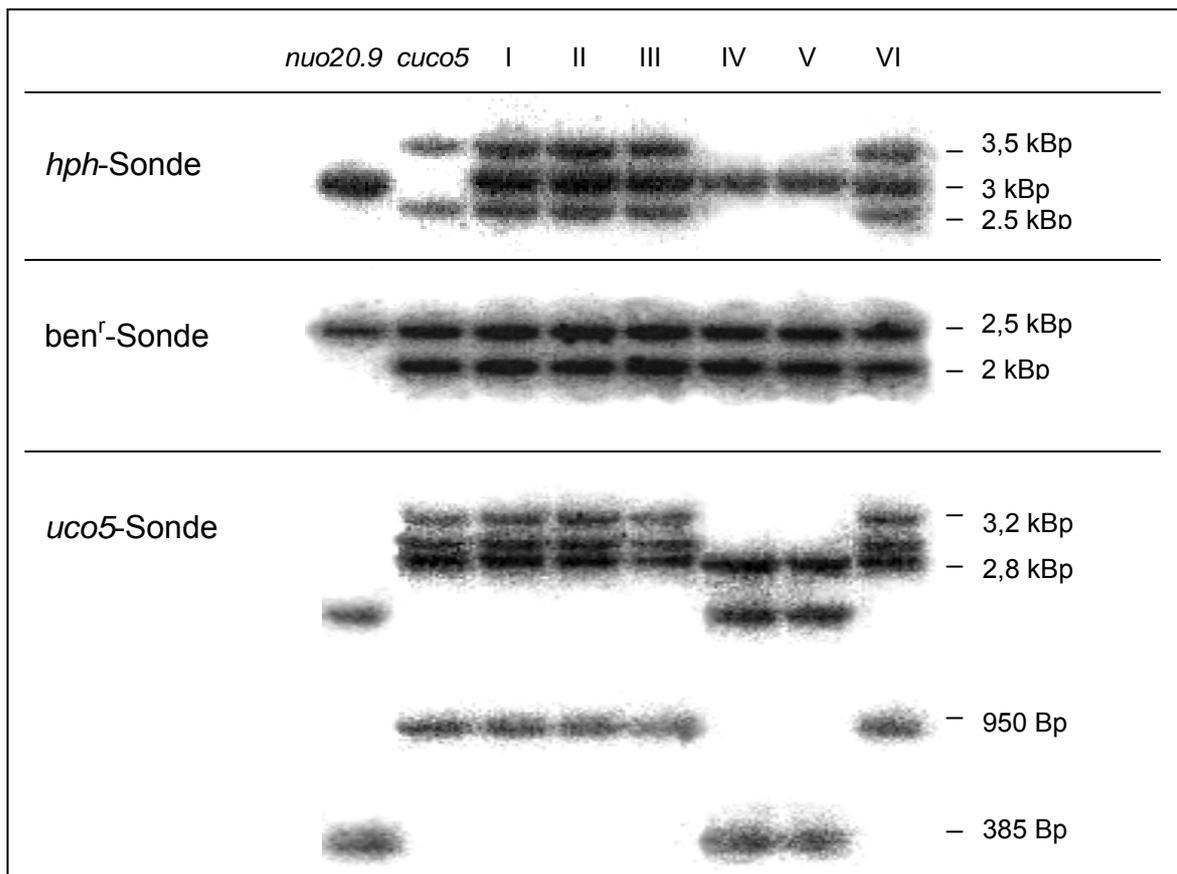


Abb. 22: Southernblot von DNA aus Hygromycin- und Benomyl-resistenter Kreuzungsmutanten (Spuren I - VI) und der Ausgangsmutanten (*nuo20.9* und *cuco5*). Die DNA wurde mit den Restriktionsenzymen Hind III und Bam HI geschnitten und den Sonden *hph*, *ben<sup>r</sup>* und *uco5* nacheinander hybridisiert. Mit der *hph*-Sonde werden die defekten *nuo20.9*- und *uco5*-Gene nachgewiesen. Die Hygromycinresistenz der Stämme erfordert mindestens die Erkennung des 3 kBp-Fragmentes durch die *hph*-Sonde. Die *ben<sup>r</sup>*-Sonde wurde zur Überprüfung des integrierten MUCO5c-Konstruktes eingesetzt. Die Benomylresistenz der Stämme kann durch das Resistenzgen des Konstruktes oder durch spontane Mutation des Tubulingens auftreten (vgl. Abb. 21). Zum Nachweis des integrierten MUCO5c-Konstruktes wird neben dem Tubulingen-enthaltenden 2,5 kBp-Fragment ein zusätzliches 2 kBp-Fragment von der *ben<sup>r</sup>*-Sonde erkannt. Die Hybridisierung der *uco5*-Sonde mit Fragmenten der genomischen DNA sollte die Anwesenheit des integrierten MUCO5c-Konstruktes, durch Erkennung des *uco5*-cDNA enthaltenden 2,8 kBp-Fragmentes bestätigen und den Defekt des *uco5*-Gens zeigen (vgl. Abb. 20).

Zur Untersuchung des Komplex I-Defektes in den Doppelmutanten wurde das Mitochondrienprotein durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine Cellulosenitrat-Membran geblottet und mit dem Antiserum gegen die 20,9 kDa Untereinheit des Komplex I inkubiert (Abb. 23). Erwartungsgemäß wurde in den Mutanten *cuco5* und *uco5* wie im Wildtyp die 20,9 kDa Untereinheit von dem

Antiserum erkennt, in den Mitochondrien der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* hingegen wurde diese Untereinheit nicht gefunden.

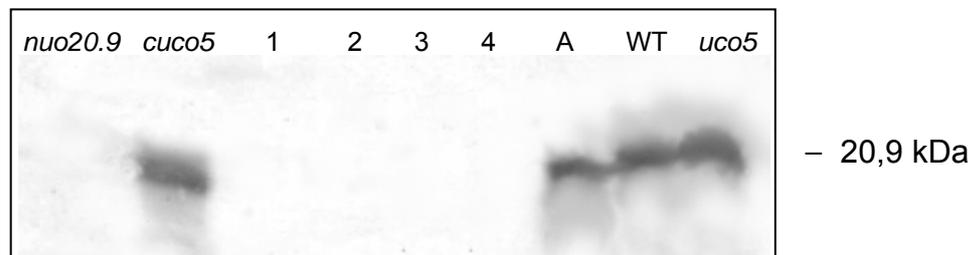


Abb. 23: Westernblot von Mitochondrien auf die 20,9 kDa Komplex I-Untereinheit der *nuo20.9/cuco5*-Doppelmutanten (1 - 4), der Einzelmutanten *nuo20.9* und *cuco5*, des Wildtyps WT, der Komplex III-Mutante *uco5* und einer sehr langsam wachsenden Kreuzungsmutante A, die keine Hygromycinresistenz aufwies.

Die Regulation der Expression von Komplex III in den Doppelmutanten wurde durch polarographische Bestimmung der Succinatatmung und der Inhibitorsensitivität isolierter Mitochondrien aus Kulturen mit und ohne Chinasäure, überprüft. Entsprechend den Ergebnissen mit dem Ausgangsstamm *cuco5* (Tab.5, Nr.1) zeigten die vier untersuchten Doppelmutanten, die in Anwesenheit von Chinasäure kultiviert wurden, eine vollständige Komplementation des *uco5*-Gendefektes. Bei Abwesenheit von Chinasäure verblieb eine eingeschränkte Antimycin-sensitive Atmung. Alle vier *nuo20.9/cuco5* Doppelmutanten zeigten also eine eingeschränkte Repression bei Abwesenheit des Induktors.

#### 4.4.5 Einfluss des Komplex I-Defektes auf das Wachstum der *cuco5*-Mutante

Zur Entwicklung eines Selektionsverfahrens für Komplex I-Mutanten wurde das Wachstumsverhalten der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* bei verschiedenen Kultivierungsbedingungen mit und ohne Chinasäure überprüft. Gesucht wurden Bedingungen, die einen möglichst großen Einfluss des Komplex I-Defektes zeigen.

Zunächst wurden die Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* in Flüssigmedien mit 2 %, 1 % und 0,5 % Saccharose jeweils mit und ohne Chinasäure mit der gleichen Konidienanzahl angeimpft und nach drei Tagen geerntet (Abb. 24).

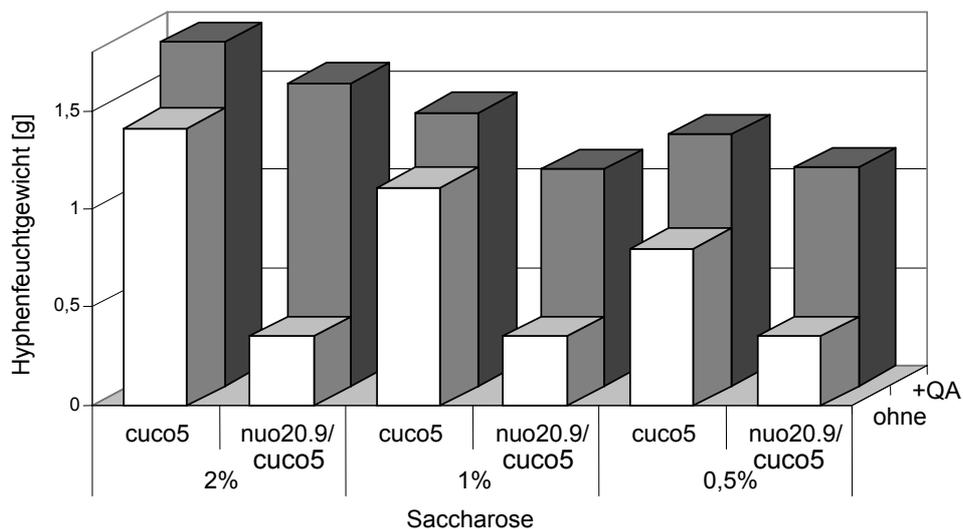


Abb. 24: Chinasäure-abhängiges Wachstum von *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* in Vogelmedien mit 2 %, 1 % bzw. 0,5 % Saccharose. Es wurden jeweils 100 ml Medium mit  $7,5 \cdot 10^6$  Konidien angeimpft. Nach drei Tagen Schütteln bei 28 °C wurden die Hyphen geerntet und das Feuchtgewicht bestimmt. (+QA) steht für einen Zusatz von 0,1 % Chinasäure (dunkle Balken) und (ohne) für die Abwesenheit von Chinasäure im Medium (helle Balken).

Beide Mutanten wuchsen in Anwesenheit von Chinasäure besser als in Abwesenheit des Induktors. Bei der Doppelmutante war die Chinasäureabhängigkeit aber stärker ausgeprägt. Das Wachstum der *cuco5*-Mutante war mit und ohne Chinasäure abhängig von der Saccharosekonzentration, dagegen zeigte das Wachstum der Doppelmutante bei Abwesenheit von Chinasäure keine Abhängigkeit von der Zuckerkonzentration. Für eine Selektion eignet sich deshalb eine höhere Saccharosekonzentration besser.

Das Wachstum der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* mit bzw. ohne Chinasäure wurde außerdem in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Konidien bestimmt. Vogelsmedium mit 2 % Saccharose wurden mit  $1,5 - 30 \cdot 10^4$  Konidien pro ml bzw. mit einer unbestimmten Anzahl an Konidien, die mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen wurden, angeimpft. Nach vier Tagen wurden die Hyphen geerntet und gewogen (Abb. 25). Bei geringen Konidienkonzentrationen zeigt die Ausgangsmutante *cuco5* ein Chinasäure-abhängiges Wachstum. Ab einer Konzentration von  $7,5 \cdot 10^4$  Konidien pro ml war diese Abhängigkeit nicht mehr erkennbar. Bei der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* war die Chinasäureabhängigkeit jedoch unabhängig von der Konidienzahl.

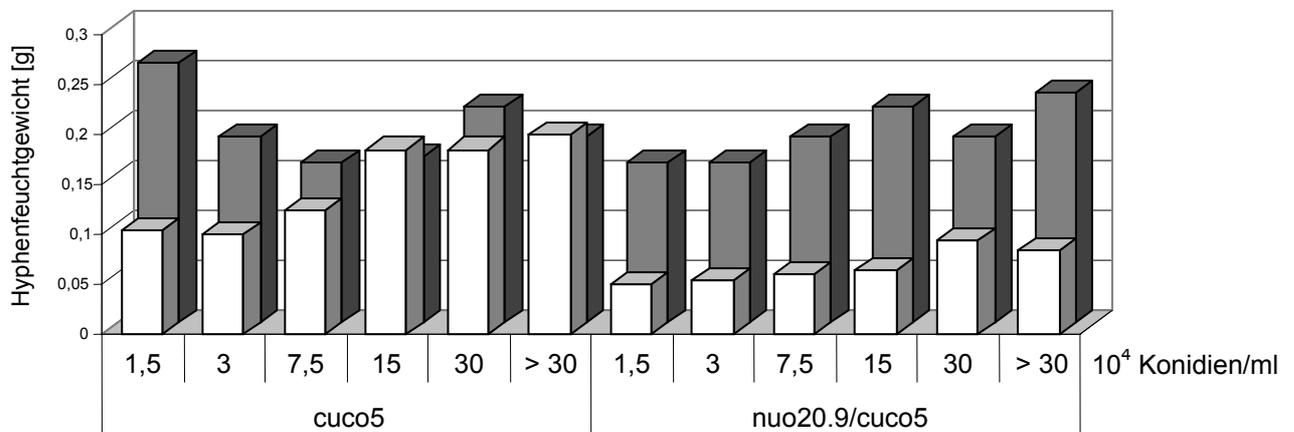


Abb. 25: Vergleich des Wachstums mit und ohne Chinasäure der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* in Abhängigkeit von der Konidienkonzentration. Es wurden jeweils 4 ml Vogelsmedium (2 % Saccharose) mit  $1,5 - 30 \cdot 10^4$  Konidien pro ml bzw. einen Überschuss an Konidien ( $> 30$ ) angeimpft und nach vier Tagen Inkubation geerntet. Die weißen Balken stellen die Hyphenmassen aus Kulturen ohne Chinasäure und die dunklen Balken die aus Kulturen mit Chinasäure dar.

Zur Untersuchung des Wachstumsverhaltens auf festem Medium wurden Agarplatten mit und ohne Chinasäure sowohl punktförmig als auch flächig angeimpft. In Abbildung 26 sind die punktförmig angeimpften Platten nach 4, 5, 7 und 14 Tagen Inkubation dargestellt. Dabei wurde ein stark verzögertes Wachstum der *nuo20.9/cuco5*-Doppelmutante auf der Platte ohne Chinasäure beobachtet. Nach zwei Wochen hatten sich noch keine Lufthyphen und Makrokonidien gebildet. Im Gegensatz dazu wurde auf den Platten mit Chinasäure bereits nach sieben Tagen eine starke Konidienbildung beobachtet.

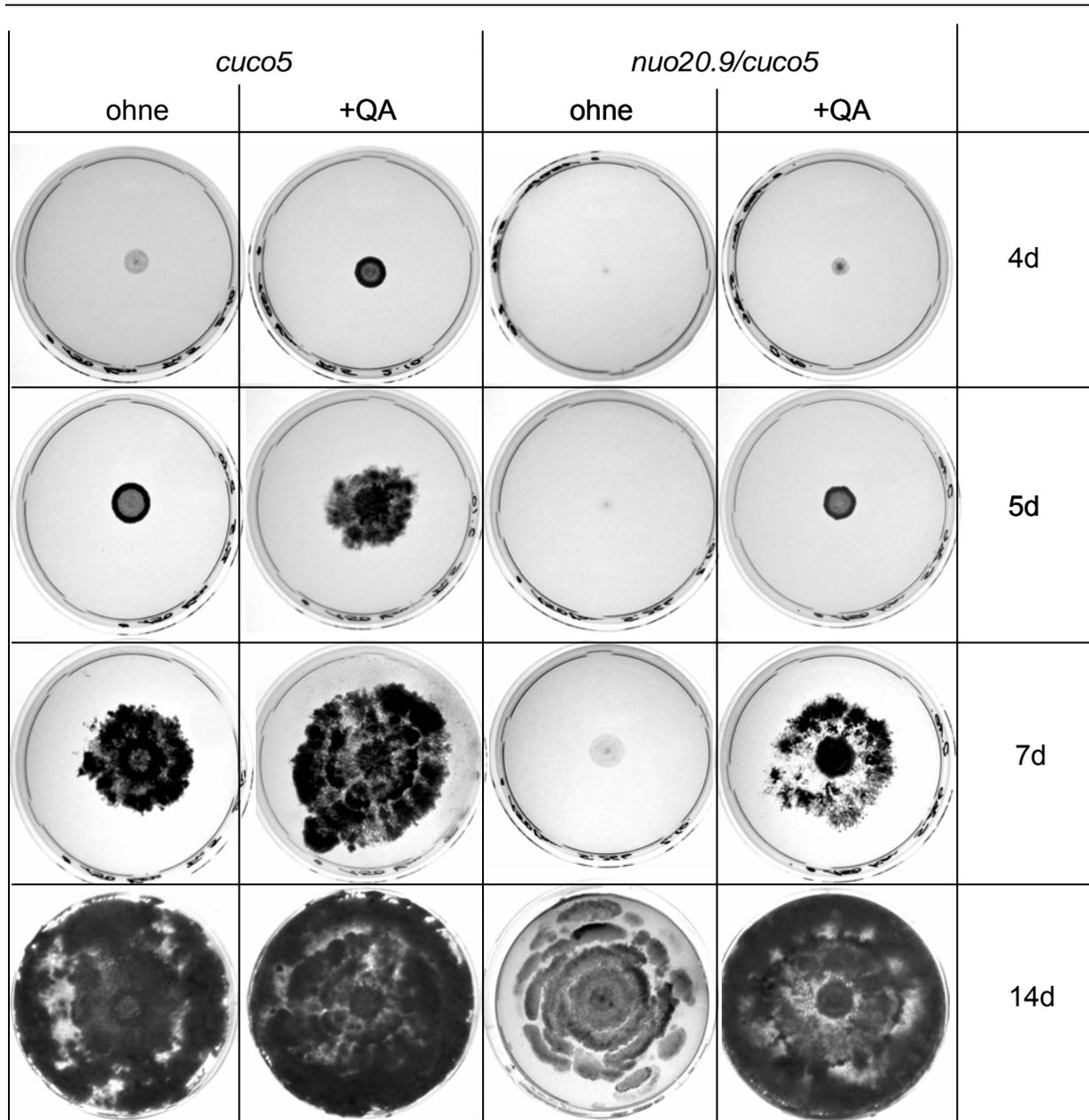


Abb. 26: Wachstumsvergleich der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* auf Sorboseplatten mit (+QA) und ohne Chinasäure. Pro Platte wurden 150 Konidien zentral aufgetragen. Dargestellt sind die Platten nach 4, 5, 7 und 14 Tagen.

Gegenüber der Mutante *cuco5*, die auf Platten ohne Chinasäure nur eine leichte Verzögerung des Wachstums zeigte, wurde die Chinasäure-Abhängigkeit der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* deutlich.

In Abbildung 27 ist die Zunahme der Kolonienanzahl bei flächigem Animpfen der Agarplatten in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration dargestellt.

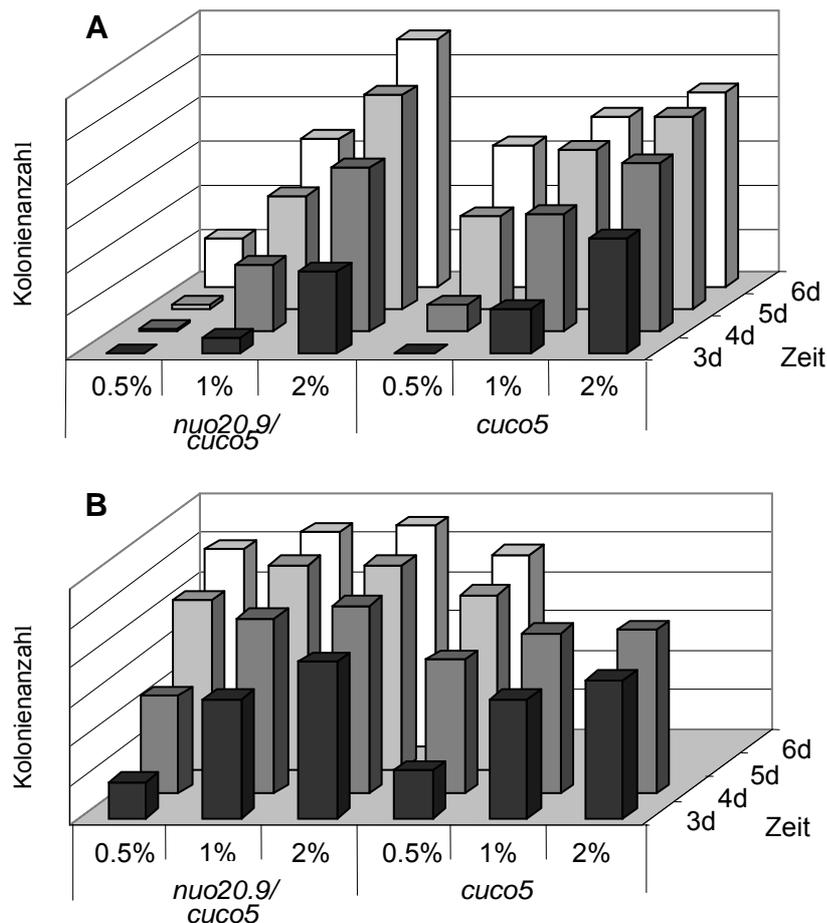


Abb. 27: Wachstum der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* auf Platten ohne (A) und mit (B) Chinasäure in Abhängigkeit von der Saccharosekonzentration (2 %, 1 %, 0,5 %). Die *cuco5*-Kolonienanzahl auf den Platten mit 1 % und 2 % Saccharose mit Chinasäure (B) konnten wegen des starken Wachstums ab vier Tagen nicht mehr bestimmt werden (fehlende Balken).

Bei Abwesenheit von Chinasäure zeigt die Doppelmutante eine starke Saccharose-abhängigkeit der Kolonienbildung. Bei 0,5 % Saccharose bildete *nuo20.9/cuco5* erst nach sechs Tagen Kolonien. Bei der *cuco5*-Mutante wuchsen die Kolonien schnell ineinander, wodurch die Bestimmung der Kolonienzunahme erschwert wurde (Abb. 27).

In Abwesenheit von Chinasäure bildete die Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* keine Lufthyphen mit Konidien. Zur Überprüfung dieses Befundes wurden Schrägagar-röhrchen mit einer großen Anzahl von Konidien angeimpft. In Abbildung 28 sind die Kulturen nach einer Woche dargestellt.

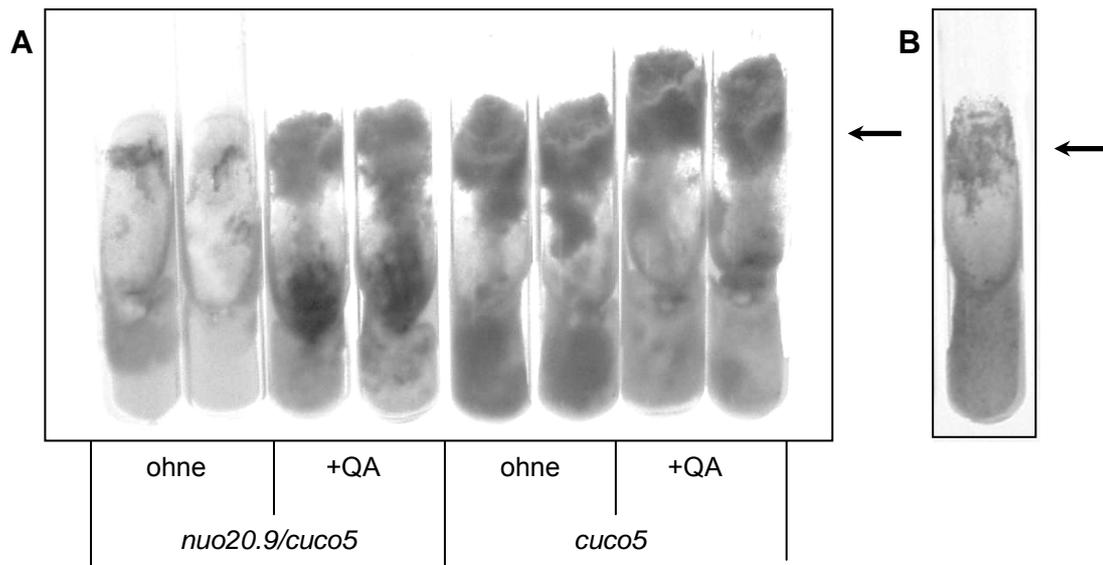


Abb. 28: Schrägagarkulturen der Mutanten *cuco5*- und *nuo20.9/cuco5*. Gezeigt sind Schrägagarröhrchen mit 1,5 % Sorbosemedien (A) ohne bzw. mit (+QA) Chinasäure. Zum Vergleich ist in (B) eine *nuo20.9/cuco5*-Kultur auf Sorbosefreiem Medium ohne Chinasäure dargestellt. Die Konidien sind als dunkle Bereiche in Höhe der Pfeile erkennbar.

Die Ausgangsmutante *cuco5* bildete in An- und Abwesenheit von Chinasäure viele Konidien. Die Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* zeigte bei Anwesenheit von Chinasäure eine starke Konidienbildung, die mit einer dunklen Ausscheidung begleitet wurde. Bei Abwesenheit von Chinasäure war das Wachstum verzögert und die Konidienbildung blieb aus. Zum Vergleich wurde die Doppelmutante auch in einer Schrägagarkultur ohne Sorbose angezogen (Abb. 28, B). Die Konidienbildung war ohne Sorbose etwas stärker.

#### 4.4.6 Anwendung der Filtrations-Anreicherung zur Selektion von Komplex I-Mutanten

Für das Filtrations-Anreicherungs-Verfahren wurde ein Selektionsmedium gesucht, in dem das Auskeimen der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* gegenüber der regulierbaren Komplex III-Einfachmutante *cuco5* stark verzögert ist. Flüssigkulturen mit Konidien der beiden Mutanten wurden jeweils getrennt angesehen und die Hyphen nach 8, 14, 24, 32, 38, 48 und 58 h Wachstum durch Glaswolle abfiltriert. Ein konstantes

Volumen des Filtrates wurde auf Chinasäure-Platten verteilt. In Abbildung 31 ist die Kolonienzahl gegen die Wachstumszeit in der Flüssigkultur aufgetragen.

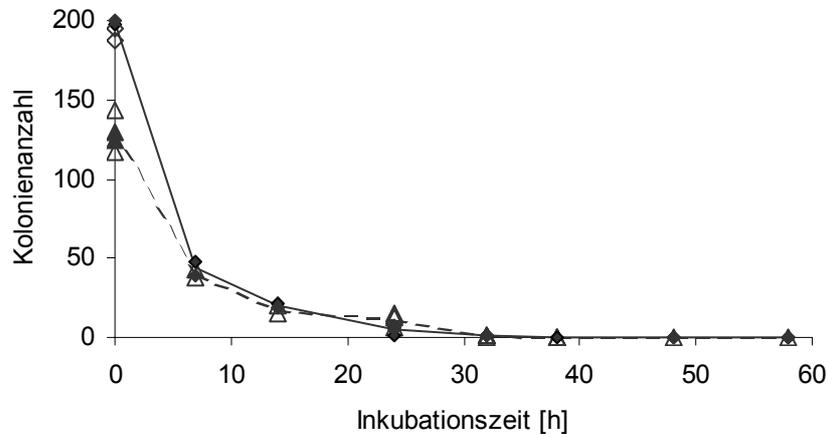


Abb. 31: Abnahme wachstumsfähiger Konidien der Mutanten *cuco5* ( $\Delta$ , gestrichelte Linie) und *nuo20.9/cuco5* ( $\diamond$ , durchgezogene Linie) im Filtrations-Anreicherungs-Verfahren. Jeweils 50 ml Vogelsmedium mit 2 % Saccharose wurden pro Stamm mit  $3 \cdot 10^4$  Konidien/ml angeimpft. Die Zahl der wachstumsfähigen Konidien wurde durch Ausplattieren eines Aliquots (10  $\mu$ l) nach jeder Filtration bestimmt. Zu Beginn (Inkubationszeit 0 h) wurden Aliquots vor ( $\blacktriangle$  bzw.  $\blacklozenge$ ) und nach der Filtration ausplattiert.

Über die Anzahl der Kolonien nach jeder Filtration konnte auf den Anteil ausgekeimter Konidien, die am Filter zurückgehalten wurden, geschlossen werden. Die Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* zeigte im Vergleich zur Einfachmutante *cuco5* kein verzögertes Auskeimen trotz Chinasäureabwesenheit. Die Erwartung, dass die Kurve mit der Doppelmutante flacher verläuft, erfüllte sich nicht.

Auffällig ist die starke Abnahme der Konidienzahl im Filtrat beider Ansätze schon nach acht Stunden. Zur Überprüfung ob die Konidien unabhängig von Größe und Auskeimungsstadium von Filter zurückgehalten werden, wurden Proben aus nicht inkubierten Ansätzen vor und nach einer Filtration auf Agarplatten ausplattiert. Dabei wurde keine Abnahme der Konidien im Filtrat festgestellt (Abb. 31). Durch Herabsetzung der Saccharosekonzentration im Medium wurde untersucht, ob der hohe Zuckergehalt ein differenziertes Auskeimen der Konidien unterdrückt. Dafür wurden Saccharosegehalte von 1% und 0,5% gewählt und wie oben beschrieben eingesetzt (Abb. 32, A bzw. C).

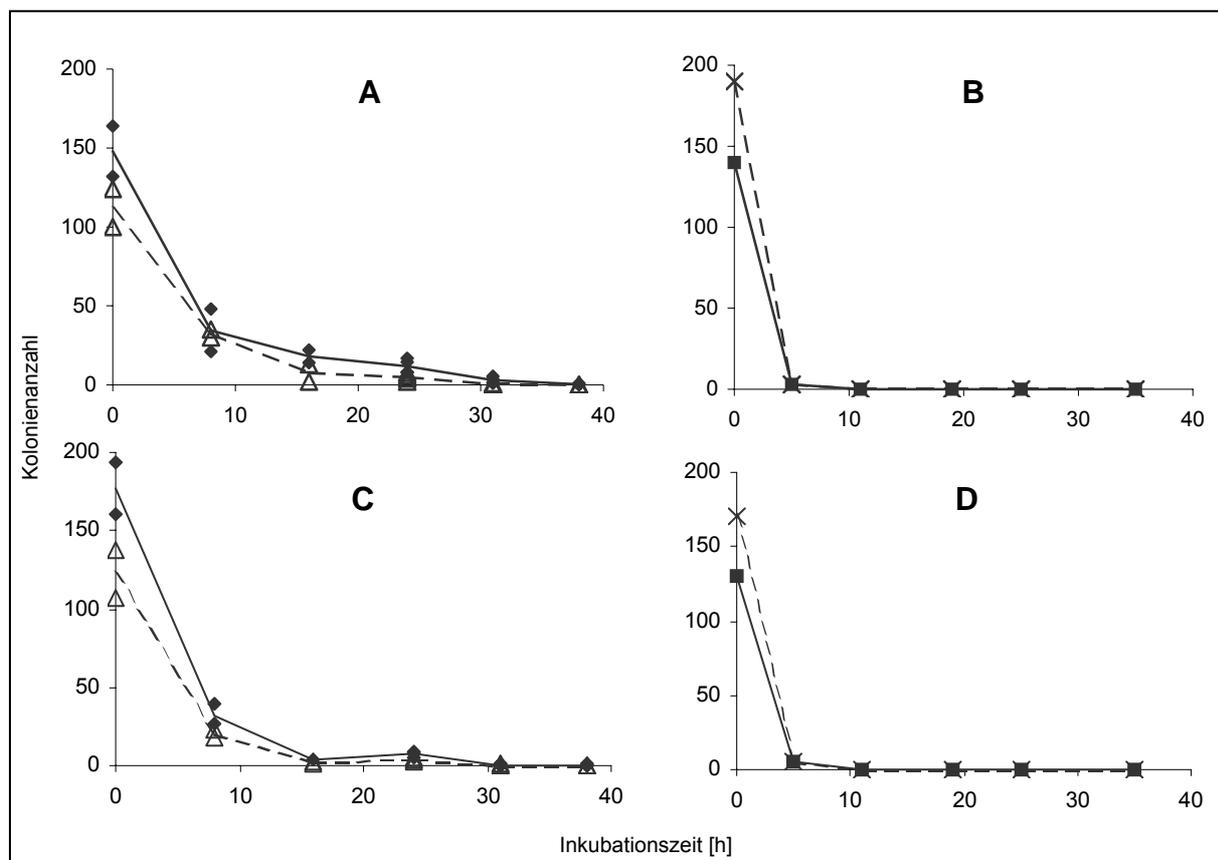


Abb. 32: Abnahme wachstumsfähiger Konidien der Mutanten *cuco5* (Δ, gestrichelte Linie) und *nuo20.9/cuco5* (◆, durchgezogene Linie) im Filtrations-Anreicherungs-Verfahren mit 1 % (A) bzw. 0,5 % (C) Saccharose Medien. Zum Vergleich wurden der Wildtyp (x, gestrichelte Linie) und die Komplex I-Mutante *nuo20.9* (■, durchgezogene Linie) in (B) mit 0,5 % Saccharose und in (D) mit 1 % Saccharose angesetzt.

Das Auskeimen der Konidien wurde durch geringere Saccharosegehalte nicht stark beeinflusst. Es wurde zwar ein leicht verzögertes Auskeimen von Doppelmutanten-Konidien festgestellt, was jedoch im Rahmen der Meßungenaugigkeiten blieb. Zum Vergleich wurden Konidien des Wildtyps und der *nuo20.9*-Mutante in Medien mit erniedrigten Saccharosegehalten angesetzt. Schon nach fünf Stunden wurden im Filtrat nicht mehr als 4 % der Ausgangskonzentration von Konidien beider Stämme nachgewiesen.

Die Chinasäureabhängigkeit der *nuo20.9/cuco5*-Mutante wurde, im Vergleich zur Ausgangsmutante *cuco5*, durch Zusatz von Sorbose verstärkt (4.4.5). Zur Überprüfung, ob Sorbose auch die Konidienauskeimung beeinflusst, wurde dem Kultivierungsmedium 3 % bzw. 6 % Sorbose beigefügt (Abb. 33).

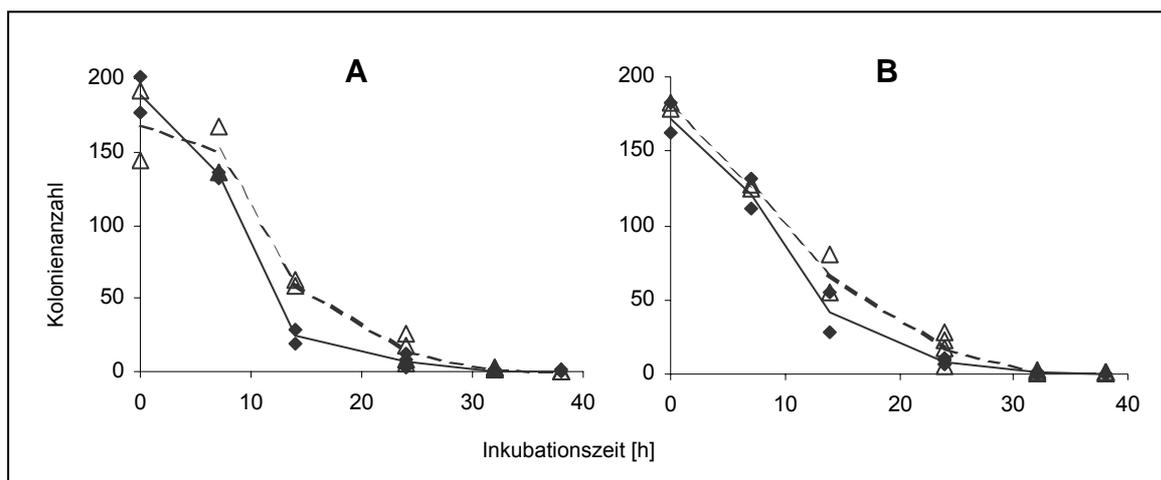


Abb. 33: Sorboseeinfluss auf die Auskeimung von *cuco5*- (Δ, gestrichelte Linie) und *nuo20.9/cuco5*- (◆, durchgezogene Linie) Konidien. Es wurden 2 % Saccharose-Vogelmedium mit 3 % (A) und 6 % (B) Sorbose eingesetzt.

Das Auskeimen der Konidien beider Mutanten wurde durch Sorbose im Medium verzögert. Bei 6 % Sorbose wird der Effekt im Vergleich zu 3 % Sorbose-Ansätzen nur leicht verstärkt. Beim Vergleich der beiden Mutanten scheint eine größere Verzögerung der *cuco5*-Konidien Auskeimung stattzufinden. Das widerspricht den Ergebnissen auf Agarmedium (Abb. 26) und könnte auf eine größere Anfälligkeit der Doppelmutanten-Konidien auf die Toxizität von Sorbose zurückzuführen sein.

Trotz des großen Wachstumsunterschiedes zwischen den Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* bei Abwesenheit von Chinasäure, konnte kein differenziertes Auskeimen erreicht werden, das bei einer Mischung der Stämme zu einer Anreicherung der Doppelmutante-Konidien führen würde.

#### 4.4.7 Mutagenisierung der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5* durch UV-Behandlung

Zur Untersuchung der Chinasäureabhängigkeit der mutagenisierten *cuco5*-Mutante wurden Konidien durch UV-Strahlung behandelt und ihr Wachstumsverhalten in An- bzw. Abwesenheit von Chinasäure untersucht.

Zur Bestimmung der optimalen Bestrahlungszeit wurde eine Dosis-Effekt-Beziehung aufgestellt (Abb. 29). Dazu wurden Überlebensraten von Konidiensuspensionen mit unterschiedlichen Behandlungszeiten bestimmt. Von David und de Serres (1970) wurde eine Überlebensrate von höchstens 50 % und mindestens 20 % bei UV-Mutagenese von *N. crassa* Makrokonidien vorgeschlagen, um einen möglichst hohen Anteil mutierter Konidien zu erhalten. Die optimale Behandlungszeit der *cuco5*-Mutante liegt dementsprechend zwischen 22 min und 14 min.

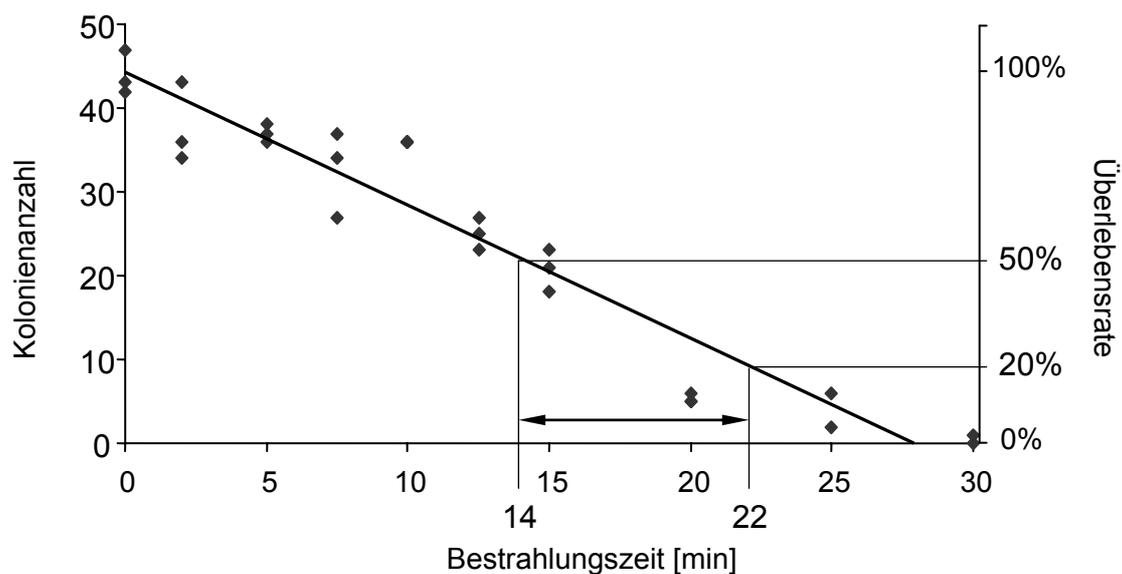


Abb. 29: Dosis-Effekt-Beziehung der UV-Bestrahlung von *cuco5*-Mutanten Konidien. Aufgetragen ist die Behandlungszeit mit UV-Licht (254 nm) gegen die Anzahl gewachsener Kolonien, wobei jeweils von 200 Konidien ausgegangen wurde. Zur Berechnung der Überlebensrate wurde die Zahl gewachsener Kolonien der unbehandelten Suspension als Bezugsgröße verwendet. Dargestellt ist der Bereich der optimalen Überlebensrate und der sich daraus ergebende optimale Bestrahlungszeit-Bereich von 14 bis 22 Minuten.

Eine Konidiensuspension wurde 17,5 min bestrahlt, auf Chinasäure-Agarplatten vereinzelt und die gewachsenen Kolonien auf Schrägagarröhrchen mit Chinasäure kultiviert. Zur Überprüfung der Chinasäureabhängigkeit wurde jeweils Vogelsmedium (2 % Saccharose) mit bzw. ohne Chinasäure mit einer unbestimmten Konidienanzahl von 45 isolierten Klonen angeimpft. Die Verhältnisse der Feuchtgewichte Chinasäure-freier Kulturen zu Chinasäure-haltigen Kulturen lagen in einem Bereich von 0,6 bis 1,5. Wie erwartet zeigten die meisten Klone ein Verhältnis um 1 ( $\pm 0,2$ , 70 %), was den Ansätzen mit der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5*

entspricht. Kein Klon zeigte ein Massenverhältnis unter 0,5, wie es für die Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* bestimmt worden war.

Bestrahlte Konidien wurden außerdem in Chinasäure-freiem Flüssigmedium suspendiert und für 76 Stunden geschüttelt. Durch sukzessive Filtration wurden die ausgekeimten Konidien entfernt und jeweils gleiche Volumen des Filtrates auf Chinasäure-Agarplatten ausplattiert (Abb. 30). Die erste Filtration wurde nach einer Stunde durchgeführt und deutete einen Anstieg der Konidien im Filtrat an, da einige mutagen behandelte Konidien eine Regenerierungszeit benötigen, um anwachsen zu können (Abb. 30). Nach 24 Stunden war die Zahl der Kolonie-bildenden Konidien auf ein Zehntel gesunken. Insgesamt 59 Kolonien wurden isoliert und auf Chinasäuresensitivität untersucht. Dazu wurde wieder das Verhältnis der Feuchtgewichte aus Kulturen mit und ohne Chinasäure bestimmt. Die meisten Klone zeigten unabhängig von der Inkubationszeit ein Massenverhältnis um 1. Zwei Klone, die aus dem Filtrat nach 58 bzw. 76 Stunden stammen, zeigten ein Massenverhältnis von unter 0,5, wie es für eine Komplex I-Mutation zu erwarten ist.

Zur Überprüfung der Zuverlässigkeit dieser Phänotyp-Bestimmung wurden die 59 Klone nach einer Woche erneut untersucht. Dabei zeigten 34 Kulturen eine Abweichung von über 20 % und 10 Klone sogar eine Abweichung von über 50 %. Auch die beiden Chinasäure-abhängigen Klone, die bei der ersten Bestimmung ein Massenverhältnis unter 0,5 zeigten, ergaben bei der zweiten Bestimmung ein Verhältnis von über 0,8. Die Reproduzierbarkeit des Wachstumsverhaltens ist offensichtlich noch unzureichend. Andererseits ist die Methode bei der Mutante *cuco5* und der Doppelmutante sehr zuverlässig (< 12 % Abweichung) und keiner der 106 untersuchten Klone zeigte ein Massenverhältnis von unter 0,5, wie es bei der *nuo20.9/cuco5*-Doppelmutante der Fall ist. Die Chinasäureabhängigkeit der *cuco5*-Mutante mit zusätzlichem Komplex I-Defekt, scheint, zumindest nach dem Vergleich mit einer geringen Anzahl von ungezielt erzeugten Mutanten, spezifisch zu sein.

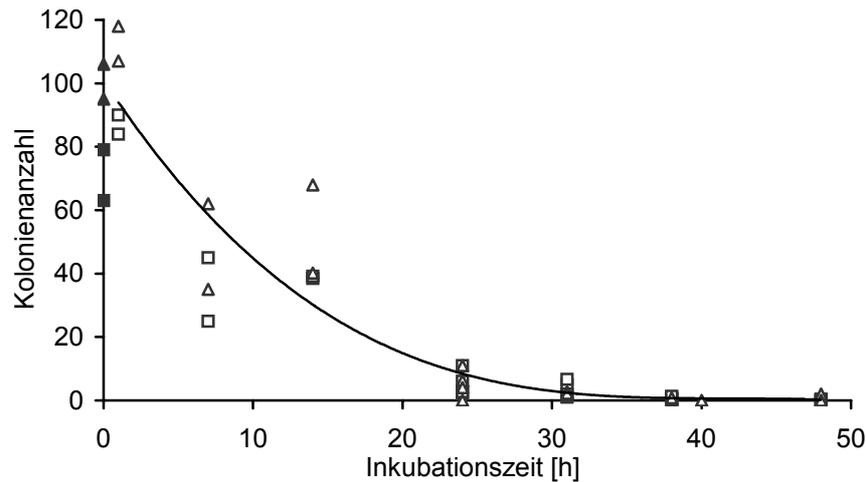


Abb. 30: Abnahme der Konidienkonzentration einer mutagen behandelten *cuco5*-Mutanten Suspension durch sukzessive Filtration. Die Konidien wurden nach 17,5 Minuten UV-Bestrahlung in Vogelsmedium (2 % Saccharose) bei einer Konzentration von  $3 \cdot 10^4$  Konidien pro ml inkubiert. Es wurden parallel zwei Kolben angesetzt (□ und △), nach je 7 - 10 Stunden Inkubation wurden die Konidien suspensionen sukzessiv durch Glaswolle filtriert und mehrere Chinasäure-Platten mit einem konstanten Volumen des Filtrates angeimpft. Vor der Inkubation wurden Agarplatten der unfiltrierten Konidien suspension ausplattiert (▲ und ■). Aufgetragen sind die gewachsenen Kolonien gegen die Inkubationszeit der Konidien suspensionen.

Das durchgeführte Filtrations-Anreicherungs-Verfahren mit Chinasäure-freiem Medium und anschließender Regenerierung auf Chinasäure-enthaltendem Medium, zeigte keine Anreicherung von Chinasäure-abhängigen Mutanten. Sogar nach 76 Stunden zeigten 70 % der isolierten Klone ein Wachstum, wie die Ausgangsmutante *cuco5*.

## 5. Diskussion

### 5.1 Randbedingungen zur Identifizierung ungezielt erzeugter Komplex I-Mutanten

Komplex I besteht aus etwa 38 Untereinheiten, von denen 7 mitochondrial kodiert sind. Es ist zu erwarten, dass zusätzliche Proteine benötigt werden, die spezifisch an der Expression und Assemblierung der Komplex I-Untereinheiten beteiligt sind. Zwei Proteine, CIA84 und CIA30, die für die Bildung des Membranarms von Komplex I essentiell sind, wurden bereits identifiziert. Die Charakterisierung von atemungsdefekten Mutanten der Hefe *S. cerevisiae* zeigte, dass die Atmungskettenkomplexe eine erhebliche Zahl von Hilfsproteinen für die Bildung der funktionalen Enzyme benötigen (Suzuki *et al.*, 1997; Grivell *et al.*, 1999; Chacinska und Boguta, 2000). Postuliert man die Notwendigkeit von etwa zehn zusätzlichen Genen für die Biosynthese von Komplex I kommt man in der Summe auf etwa 50 spezifische Gene zur Bildung des aktiven Komplex I. Da die Gesamtzahl der Gene von *N. crassa* etwa 10000 beträgt, betreffen 0,5 % aller induzierten Gendefekte Gene von Komplex I. Komplex I-Mutationen sind rezessiv, da sie durch Fehlen oder Schädigung eines Genproduktes entstehen. Das Vorkommen von dominanten Allelen im selben Kern durch paraloge Proteine kann vernachlässigt werden, da *N. crassa* vermutlich aufgrund des RIP-Effekts nur einen sehr geringen Anteil paraloger Proteine aufweist (Mannhaupt *et al.*, 2003). Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass in Heterokaryoten durch Komplementation die Anzahl der Komplex I-Mutationen, die durch ihren Phänotyp in Erscheinung treten, verringert werden. Dadurch wird nicht der Anteil von Komplex I-Mutanten an der Gesamtheit induzierter Mutanten verringert, sondern nur die Häufigkeit der selektierbaren Mutanten in der behandelten Konidien suspension.

Das Genom von *N. crassa* ist etwa 40 MBp groß, wobei etwa die Hälfte kodierend ist (Schulte *et al.*, 2002). Bei einer statistischen Verteilung von einer Mutation pro Zelle, würde die Hälfte der Konidien eine Mutation in einem kodierenden Bereich aufweisen. Des Weiteren führen nicht alle Mutationen, die in einem Gen vorliegen zu einem Gendefekt. Die Ausbeute von Mutanten wäre dabei sehr gering. Somit müsste

die mutagene Dosis erhöht werden, damit der Anteil an Heterokaryoten verringert und die Anzahl an Mutationen, die zu einem Gendefekt führen erhöht wird.

Um eine optimale Mutantenausbeute zu erhalten, wurden Rückmutations-Analysen mit spezifischen, auxotrophen Mutanten von *N. crassa* durchgeführt. Dabei wurde durch Variierung der Strahlendosis eine Beziehung von Mutanten pro überlebende Zelle aufgestellt. Es wurde jedoch nur der maximale, rückmutierte Konidienanteil der überlebenden Zellen bestimmt, was keine Aussagen über den absoluten Anteil an Wildtyp-phänotypischen Konidien zulässt (David und de Serres, 1970). Die Strahlendosis ist bei einer UV-Mutagenese nicht linear mit der Mutantenausbeute verknüpft. Eine wahllose Erhöhung der Bestrahlungszeit führt schließlich zur Abnahme der Mutantenausbeute.

Geht man davon aus, dass der Mutantenanteil unter optimalen Überlebensraten 50-30 % beträgt, ist der Anteil an Komplex I-Mutanten nach einer mutagenen Behandlung nur 0,25 – 0,1 %, d.h. nur ca. jede tausendste lebensfähige Konidie ist eine Komplex I-Mutante. Die Isolierung der gesuchten Mutanten wird durch eine spezifische Anreicherung, basierend auf ein verzögertes Auskeimen der gesuchten Konidien, vereinfacht. Bei einer 10fachen Anreicherung der Mutanten müssten durchschnittlich nur noch etwa hundert Klone je Komplex I-Mutante überprüft werden.

Die enzymologische Charakterisierung jeder einzelnen Mutante wäre auch nach einer Anreicherung zu aufwendig, um eine Isolierung mehrerer Komplex I-Mutanten zu ermöglichen. Eine vereinfachte Identifizierung von Komplex I-Mutanten, basierend auf ihrem Wachstumsverhalten müsste auch bei 10facher Anreicherung eine Untersuchung von einigen Tausend Klonen zulassen.

## **5.2 Die Auswirkung von defekten Atmungskettenkomplexen in *N. crassa***

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Selektionsverfahrens zur Identifizierung ungerichtet erzeugter Komplex I-Mutanten von *N. crassa*. Komplex I-Mutanten von *N. crassa*, die durch gezielte Inaktivierung eines Strukturgens erzeugt wurden (vgl. 2.5), zeigen unter normalen Kultivierungsbedingungen kein auffällig

differenziertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Der Bypass des Elektronenflusses von NADH auf Ubichinon durch die nicht-protonenpumpende, alternative NADH Dehydrogenase führt zwar zu einer Einbuße von 40 % der Energiekonservierung pro Elektronentransfer von NADH auf Sauerstoff, verzögert das Wachstum aber nur geringfügig. Die Komplex III-Mutante *uco5* (4.1.1) hingegen zeigt ein sechsfach langsames Wachstum. Bei einem Komplex III-Defekt verläuft der Elektronenweg durch die Atmungskette über Komplex I und die nicht protonenpumpende alternative Ubichinol Oxidase. Dabei ist die Effizienz für den Aufbau des Membranpotentials zwar um 60 % niedriger als im Wildtyp, jedoch im Vergleich zur Komplex I-Mutante nur um ein Drittel erniedrigt. Die verringerte ATP-Ausbeute in der *uco5*-Mutante scheint daher keine hinreichende Erklärung der beobachteten Vitalitätsbeeinträchtigung zu sein.

In ungezielt erzeugten Mutanten von *N. crassa*, die den Verlust eines oder mehrerer Cytochrome aufweisen, ist eine erhöhte Konzentration der alternativen Ubichinol Oxidase anhand der Antimycin-resistenten Atmung nachweisbar (Slayman *et al.*, 1974; Stade und Brambl, 1981). Ein Großteil dieser Cytochrom-defizienten Mutanten zeigen einen ähnlichen Phänotyp, wie die *uco5*-Mutante. Einige jedoch, wie zum Beispiel die *cyb-1-1* Mutante, zeigen nur ein leichtes Wachstumsdefizit gegenüber dem Wildtyp (Bertrand und Collins, 1978). Der *cyb-1-1* Mutante fehlt ein Teil der Cytochrom *b*-Untereinheit, wobei der restliche Komplex III gebildet wird. Es wurde postuliert, dass einige Mutationen, die zu einem Defekt in den Cytochromkomplexen führen, auch die Regulation der alternativen Oxidase-Induktion beeinträchtigen können. Bestärkt wird diese Aussage durch die Tatsache, dass in Pilzen wie z.B. *Candida albicans*, die neben der induzierbaren alternativen Ubichinol Oxidase ein konstitutives Enzym enthalten, ein Defekt der Chytochromkomplexe keine Beeinträchtigung der Vitalität hervorruft (Huh und Kang, 1998; Joseph-Horne *et al.*, 1998). In der *uco5*-Mutante konnte durch Messung der SHAM-sensitiven Atmung isolierter Mitochondrien jedoch keine Erniedrigung der alternativen Ubichinol Oxidaseaktivität festgestellt werden.

Ob der Pilz eine vollständig entkoppelte Atmung kompensieren kann und welche Auswirkungen die Entkopplung gegebenenfalls auf das Wachstum von *N. crassa* hat, sollte durch Untersuchung einer Komplex I/III-Doppelmutante beantwortet werden.

Da Kreuzungsversuche zwischen der Komplex I-Mutante *nuo20.9-* und der Komplex III-Mutante *uco5* keine Komplex I/III-Doppelmutanten (4.1.1) ergaben, scheint eine gekoppelte Atmung essentiell für das Auskeimen und Anwachsen von *N. crassa* Ascosporen zu sein. Bestätigt wurde dieser Befund bei Kreuzungen zwischen einer Komplex I-Mutante und der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5*. Alle Nachkommen, die eine Kombination der Defekte von Komplex I und Komplex III aufwiesen, enthielten das cDNA-Konstrukt, das den Komplex III-Defekt komplementieren kann (4.4.4). Die alternativen Atmungskettenenzyme sind demnach nur in Verbindung mit protonenpumpenden Enzymkomplexen effizient. Es sind auch keine Pilze bekannt, in denen Komplex I abwesend und die alternative Ubichinol Oxidase anwesend ist (Joseph-Horne *et al.*, 2001).

In *N. crassa* ist unter normalen Wachstumsbedingungen wenig oder keine alternative Oxidaseaktivität vorhanden. Erst bei Störung des Cytochrom-Elektronenweges wird die Bildung der alternativen Ubichinol Oxidase induziert (Li *et al.*, 1996). Daraus ergibt sich, dass *N. crassa* unter Bedingungen, die zu einer Expression der alternativen Oxidase führen, auf einen intakten Komplex I angewiesen ist. In dieser Arbeit wurde geprüft, wie solche Bedingungen zur Selektion von Komplex I-Mutanten genutzt werden können. Dafür wurde das Wachstums- und Auskeimungsverhalten von Komplex I-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Es wurden Bedingungen gesucht, die eine effektive Anreicherung von Komplex I-Mutanten aus der Vielfalt von ungezielt erzeugten Mutanten gewährleisten und Methoden, die Einzelüberprüfungen von vielen Klonen in kürzester Zeit ermöglichen.

### 5.3 Kupfer-limitiertes Medium zur Selektion von Komplex I-Mutanten

Kupfermangel hat eine stark verminderte Synthese des Komplex IV und eine Induktion der alternativen Ubichinol Oxidase zur Folge (Schwab, 1973). Durch Differenzspektren von Mitochondrien aus Kupfer-limitierend gewachsenen Hyphen wurde kein Cytochrom *a* bzw. *a*<sub>3</sub> nachgewiesen, was auf ein nicht oder nur in Spuren vorhandenes Komplex IV schließen ließ (4.2). Eine Kultivierung von Komplex I-Mutanten unter Kupfer-limitierten Bedingungen zeigte jedoch keine Beeinträchtigung des Wachstums (Tab. 3). Die Bestimmung der Atmungsaktivitäten isolierter

Mitochondrien zeigten zwar eine Induktion der alternativen Ubichinol Oxidase, jedoch wurde noch 75 % der Atmung durch Cyanid gehemmt. Die starke Verringerung von Komplex IV in den Mitochondrien führte zu keiner gravierenden Störung des Elektronenweges durch die Cytochromkomplexe. Die durch Komplex IV katalysierte Teilreaktion ist in der Atmungskette nicht geschwindigkeitsbestimmend. Die Komplex IV-Konzentration spiegelt sich deshalb nicht in der gemessenen Umsatzgeschwindigkeit wieder.

Obwohl die Induktion der alternativen Ubichinol Oxidase eine Störung des Elektronenweges anzeigt macht sich ein zusätzlicher Komplex I-Defekt nicht signifikant im Wachstum bemerkbar. Auch die Minimierung des Kupfers in den Konidien, indem die eingesetzten Konidien schon bei Kupfer-limitierten Bedingungen gewonnen wurden, zeigte bei anschließender Kultivierung der Komplex I-Mutante keinen Unterschied. Kupfer-limitiertes Medium eignet sich somit nicht zur Selektion von Komplex I-Mutanten, da keine Differenzierung zum Wildtyp erreichbar war.

#### **5.4 Selektion von Komplex I-Mutanten durch Hemmung von Atmungskettenenzymen**

Ein differenziertes Wachstum von Komplex I-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bei Anwesenheit von Antimycin, als Komplex III-Inhibitor, wurde schon in einer früheren Arbeit festgestellt. Eine Differenzierung durch Hemmung des Komplex IV durch Cyanid im Selektionsmedium wurde dagegen nicht beobachtet (Rakatzi, 1998). Basierend auf den ausgearbeiteten Kultivierungsbedingungen wurde die Kolonienbildung auf Agarmedien von Komplex I-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp bei Antimycin-Anwesenheit untersucht und eine Differenzierung des Wachstums auf Agarmedien erzielt (4.3). Eine Vereinfachung der Methode durch Auftragung von Suspensionstropfen hat trotz Variierung der eingesetzten Konidienzahl keinen eindeutigen Wachstumsunterschied zwischen den Stämmen gezeigt. Eine Erklärung für diesen Widerspruch wurde nicht klar. Vermutlich ist die Antimycinsensitivität von Komplex I-Mutanten auf Agarplatten abhängig von der eingesetzten Konidienmenge. Die Überprüfung einer großen Anzahl von Klonen wäre aufwendig, da von jedem

Stamm eine Gehaltsbestimmung der Konidien suspension durchgeführt werden müsste.

Das Wachstum der Stämme in Antimycin-Flüssigkulturen wurde durch Zuckerumsatzbestimmungen untersucht und die Antimycinsensitivität von Komplex I-Mutanten bestätigt (4.3). Obwohl Komplex I-Mutanten im Selektionsmedium ein stark verzögertes Wachstum zeigen, führte das nicht zu einer Anreicherung im Filtrationsverfahren. Eine Erklärung ist, dass die Ausbildung der Mutantenkolonien nach einer Antimycinbehandlung eingeschränkt ist. Dies lässt eine irreversible Hemmung der Auskeimung vermuten.

Im Verlauf der Experimente wurden mehrere Antimycin-sensitive Mutanten identifiziert, die jedoch nicht Komplex I-defizient waren (4.3). Die Ursache für eine erhöhte Empfindlichkeit gegen Antimycin könnte ein Defekt in der alternativen Ubichinol Oxidase sein. Da dieses Enzym von einem Gen kodiert wird und nur ein weiteres essentielles regulatorisches Gen bekannt ist, ist die Häufigkeit solcher Mutanten eher gering. Eine erhöhte Antimycinsensitivität ist ebenfalls zu erwarten bei Mutanten, die einen verlangsamten Zuckerumsatz aufweisen, da sie für ein schnelles Wachstum stärker auf eine effiziente Nutzung der umgesetzten Energiequellen angewiesen sind. Diese Mutanten würden auf Störungen der Atmungskette etwa durch Antimycin empfindlicher reagieren als der Wildtyp. Schließlich ist nicht bekannt ob Antimycin ausschließlich auf den Komplex III der Atmungskette wirkt. Bei höheren Konzentrationen hemmt Antimycin auch das Wachstum des Wildtyps, so dass eine Selektion von Mutanten, die bisher unbekannte Zielstellen des Antimycins treffen, vorstellbar ist.

Von Bertrand *et al.* (1983) wurden Antimycinmedien zur Selektion von ungezielt erzeugten alternative Ubichinol Oxidase-Mutanten von *N. crassa* erfolgreich eingesetzt. Das Selektionsmedium enthielt eine Antimycinkonzentration von 0,05 - 0,1 µg/ml. Komplex I-Mutanten zeigen unter diesen Bedingungen kein verzögertes Wachstum. Erst bei höheren Antimycinkonzentrationen (ab 2 µg/ml) und verringertem Saccharosegehalt (0,5 %) wurde ein differenziertes Wachstum beobachtet (Rakatzi, 1998). Eine vollständige Blockierung des Elektronenweges von Ubichinol zu Sauerstoff hat demnach größere Auswirkungen auf das Auskeimen von

Konidien als eine Entkoppelung von Elektronen- und Protonentransfer. Ein entsprechendes Vorgehen zur Selektion von Komplex I-Mutanten würde eine Hemmung der internen, alternativen NADH-Dehydrogenase (NDI1) voraussetzen. Nach Duarte *et al.* (2003) blieben Kreuzungen zwischen Komplex I-Mutanten von *N. crassa* und einer Mutante, die eine defekte interne alternative NADH Dehydrogenase aufwies, erfolglos. Außerdem konnten Komplex I-Mutanten von *Yarrowia lipolytica* erst dargestellt werden, nachdem der einzigen externen NADH Dehydrogenase eine mitochondriale Importsequenz angefügt wurde, da die aerobe Hefe keine interne, alternative NADH Dehydrogenase besitzt (Kerscher *et al.*, 2001). Da jedoch kein Inhibitor für das NDI1-Enzym bekannt ist, konnte die Hemmung der internen, alternativen NADH Dehydrogenase als Selektionsfaktor für Komplex I-Mutanten nicht untersucht werden.

Antimycin eignet sich nicht zur Identifizierung von Komplex I-Mutanten, da die Sensitivität zu wenig charakteristisch ist. Außerdem erfordert der Test auf Antimycinsensitivität eine Bestimmung der eingesetzten Konidienmenge, was bei einer großen Anzahl von Klonen sehr zeitaufwendig ist.

## 5.5 Transkriptionale Regulation der Komplex III-Aktivität

Eine vollständige Blockierung des Elektronenweges durch die Komplexe III und IV kann durch einen Gendefekt in einer Untereinheit der Komplexe III oder IV erfolgen. Da die Mutante *uco5* bereits existierte, wurde ein Komplex III-Defekt untersucht. Zur Nutzung für die Selektion von Komplex I-Mutanten muss eine Aufhebung des Komplex III-Defekts ermöglicht werden, da eine Kombination der Gendefekte letal wirkt. Dafür wurde die Mutante *cuco5* hergestellt. Sie entstand durch ektopische Integration einer *uco5*-cDNA mit vorgeschaltetem induzierbarem *qa2*-Promotor, in das Genom der *uco5*-Mutante. Durch An- und Abwesenheit des Induktors Chinasäure im Kultivierungsmedium sollte die Expression der intakten cDNA und damit die Komplementation des Komplex III-Defekts gesteuert werden.

### 5.5.1 *cuco5*-Mutante

Das System der transkriptionalen Regulation einer Genexpression durch den qa2-Promotor ist komplex und abhängig von mehreren Faktoren (2.8). Die Tatsache, dass von acht Transformanden, die durch die Genotypbestimmung identifiziert wurden, nur eine durch Chinasäure eine Induktion der Komplex III-Aktivität zeigte, unterstreicht das. Vier Transformanden zeigten einen *uco5*-Mutanten Phänotyp (Tab.5; Nr.2, 6, 7 und 8), was entweder von einer ausbleibenden Transkription oder von einem inaktiven Genprodukt herrührte. Vermutlich wurde nur ein Teil des MUCO5c Konstrukts in das Genom integriert. Bei zwei der vier Transformanden wurde zwar das Benomylresistenzgen durch Southernblot Analysen im Genom nachgewiesen, die *uco5*-cDNA jedoch nicht (4.4.2; Nr. 2 und 7). Bei den anderen beiden wurde ein zusätzliches Fragment von der *uco5*-Sonde erkannt, allerdings wurde die Vollständigkeit der *uco5*-cDNA nicht überprüft. Nach Giles *et al.* (1991) werden auch bei Repression die qa-Genprodukte in geringer Rate exprimiert. Diesen Phänotyp zeigt eine andere Transformande (Tab.6, Nr.4). Unabhängig von Chinasäure wird dabei eine eingeschränkte Komplementation gezeigt. Vermutlich ist die Aktivator-Bindestelle des qa2-Promotors beschädigt und das QA-1F-Protein kann keine Wechselwirkung mit der DNA zur Aktivierung der Transkription eingehen. Zwei weitere Transformanden zeigten einen Wildtyp-Phänotyp. Zwar war das Wachstum dieser Transformanden nur halb so schnell wie das des Wildtyp aber die Messung der Atmung zeigte eine vollständige Komplementation des Komplex III-Defektes. In diesen Mutanten scheint die Promotorregion modifiziert zu sein und eine Transkription ohne Aktivierung zu erlauben.

Bei den hier angenommenen Ursprüngen der Defekte wurde von einem intakten qa-Gencluster ausgegangen. Allerdings können die erhaltenen Phänotypen auch durch spontane Mutationen im Aktivator- oder Repressorgen im Ausgangsgenom, die zu fehlerhaften Interaktionen der Proteine führen, hervorgerufen werden.

Die verschiedenen Phänotypen der Transformanden spiegeln sich in den Eigenschaften der regulierbaren Transformande, *cuco5* wieder. Bei Abwesenheit von Chinasäure zeigt sie den Phänotyp der Transformande Nr.4 (Tab. 6). Die unvollständige Unterdrückung der Expression scheint in der Natur des qa2-

Promotors zu liegen und nicht an einem Defekt in der *cuco5*-Mutante. Bei Anwesenheit des Induktors Chinasäure wurde bei *cuco5* eine vollständige Komplementation des Komplex III-Defekts durch Messung der Atmungsaktivitäten nachgewiesen. Trotzdem wurde ein im Gegensatz zum Wildtyp verlangsamtes Wachstum festgestellt. Da in den Transformanden 3 und 5 eine Induktor-unabhängige Transkription der cDNA gemessen wurde, stammt das behinderte Wachstum der *cuco5*-Mutante bei Chinasäure-Anwesenheit anscheinend nicht von einem Regulationsdefekt, sondern möglicherweise aus der Ausgangsmutante *uco5*.

### 5.5.2 Einfluss eines Komplex I-Defekts in *cuco5*-Mutanten

Zur Überprüfung ob sich die *cuco5*-Mutante zur Selektion von ungezielt erzeugten Komplex I-Mutanten eignet, wurde eine Referenzmutante mit einem zusätzlichen Komplex I-Defekt durch Kreuzung der Stämme *cuco5* und *nuo20.9* erzeugt. Dadurch wurde der Einfluss eines Komplex I-Defekts auf das Wachstum und die Auskeimung von Konidien der *cuco5*-Mutante untersucht.

Die *cuco5*-Mutante zeigte nur bedingt ein Chinasäure-abhängiges Wachstum. Durch einen Komplex I-Defekt wurde diese Abhängigkeit verstärkt und ließ eine eindeutige Differenzierung zwischen Stämmen mit und ohne intaktem Komplex I zu (4.4.5).

Das Wachstum der *cuco5*-Mutante und der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* wurde sowohl in Flüssigmedien als auch auf Agarplatten untersucht. In beiden Fällen wurde eine starke Chinasäureabhängigkeit der Doppelmutante und eine Differenzierung der Stämme festgestellt. Bei Anwesenheit des Induktors Chinasäure in Flüssigkulturen zeigten die geernteten Hyphenmassen der Stämme eine Differenz von 12 %, bei Chinasäureentzug eine Differenz von 75 % (Abb.24). Dieser Effekt wurde auch bei zentral aufgetragenen Konidien auf Agarplatten beobachtet (Abb. 26). Nach einer Woche Inkubation zeigten die *cuco5*-Agarkulturen unabhängig von Chinasäure eine starke Sporulation. Die Doppelmutante zeigte nur bei Anwesenheit von Chinasäure eine Konidienbildung. Ohne Chinasäure wurde ein verzögertes Wachstum und das Ausbleiben von Lufthyphen- und Konidienbildung beobachtet.

Bei Chinasäure-Anwesenheit wird demnach die Transkription der *uco5*-cDNA induziert und eine Komplementation des Komplex III-Defekts findet statt. Dadurch werden Protonen durch Komplex III und IV zum Aufbau des Membranpotentials über die Membran gepumpt und der Komplex I-Defekt wird kompensiert. Bei Chinasäure-Entzug wird die Komplementation des Komplex III-Defekts so stark verringert, dass die Kombination mit einem Komplex I-Defekt die Bildung der protonenmotorischen Kraft vermindert und dadurch einen Effekt auf das Wachstum zeigt. Das Wachstum der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* wird bei Abwesenheit des Induktors stark verzögert jedoch nicht vollkommen unterdrückt. Dies ist auf die unvollständige Repression der Transkription und dadurch teilweisen Komplementation des Komplex III-Defekts zurückzuführen.

### 5.5.3 Anwendung der Mutante *cuco5* zur Selektion von Komplex I-Mutanten

Da ein Komplex I-Defekt in der Mutante *cuco5* zu signifikanten Veränderungen im Wachstum führt, galt es Bedingungen auszuarbeiten, die eine effektive Selektion ungerichtet erzeugter Komplex I-Mutanten ermöglichen. Das umfasste zum Einen ein einfaches, möglichst spezifisches Verfahren zur Durchmusterung (Screening) zahlreicher Klone zu entwickeln. Zum Anderen war das Ziel ein Anreicherungsverfahren, das die Zahl der zu charakterisierenden Klone deutlich reduziert.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung von Komplex I-Mutanten ist die Bestimmung des Wachstums in Flüssigmedium mit und ohne Chinasäure. Durch Animpfen kleiner Volumina Medien mit einer unbestimmten Konidienanzahl, die mit Hilfe eines Zahnstochers aufgenommen wurden, ist ein einfaches Animpfen möglich. Bei einer Konidienkonzentration größer  $7,5 \cdot 10^4$  pro ml war die gebildete Hyphenmasse unabhängig vom Inokulum. Bei der Anwendung dieses Tests auf mutagen behandelte Konidien zeigte keiner der Klone, wie die Doppelmutante ein Massenverhältnis ( $m_{\text{ohne}}/m_{\text{+QA}}$ ) von unter 0,5 (4.4.7), was für eine hohe Spezifität spricht. Diese Methode zur Bestimmung der Chinasäureabhängigkeit erfordert allerdings das Ernten und Wiegen der Hyphen zweier Kultivierungsansätze pro untersuchtem Klon, was bei einer Überprüfung von mehreren tausend Klonen sehr

aufwendig ist. Der Vorteil ist, dass Abstufungen der Chinasäureabhängigkeit von Stämmen durch Berechnung von Massenverhältnisse bestimmt werden könnten.

Eine einfachere Methode zur Selektion von Komplex I-Mutanten könnte die Sorbose-sensitive Lufthyphen- und Konidienbildung durch Animpfen von Sorbose-enthaltenden Schrägagarröhrchen mit einer unbestimmten Anzahl von Konidien sein (Abb. 28). Bei Chinasäureanwesenheit wurde die Sorbosesensitivität des Komplex I-defekten Stammes aufgehoben. Die Überprüfung einer großen Anzahl von Klonen ist in diesem Test durch Betrachtung der Kulturen möglich. Kulturen, die keine oder kaum Konidien bilden zeigen einen Komplex I-Defekt an.

Zur Entwicklung eines Anreicherungsverfahrens wurde nach Bedingungen gesucht, die eine Differenzierung der Auskeimung zeigen. Die zeitabhängige Kolonienbildung der Stämme auf Sorboseplatten ergab keinen großen Effekt. Die Chinasäureabhängigkeit der Doppelmutante hatte sich vorwiegend im Wachstum des Koloniedurchmessers gezeigt (Abb.24). Durch Erniedrigung der Saccharosekonzentration in den Medien auf 0,5 % zeigten die Kulturen der Doppelmutante nach fünf Tagen bei Abwesenheit von Chinasäure nur eine Kolonienanzahl von 6 % zu Kulturen von der *cuco5*-Mutante. Dies deutete auf eine Saccharosegehaltsabhängige Auskeimung.

Ein differenziertes Auskeimen der Stämme bei Chinasäure-Abwesenheit wurde jedoch auch bei Erniedrigung der Saccharosekonzentration im Kultivierungsmedium nicht beobachtet (4.4.6). Auffällig ist die schnelle Abnahme der Komplex I-defizienten Konidien. Bereits nach acht Stunden werden 75 % der eingesetzten Konidienmenge durch Filtration der Suspensionen entfernt. Auch durch Zugabe von Sorbose ins Medium wurde die Auskeimung nicht differenziert.

## 5.6 Ausblick

Bisher ist es gelungen Selektionsbedingungen zu erarbeiten, die eine Überprüfung von bis zu zweihundert Klonen pro Tag ermöglichen. Eine Vorselektion von Klonen, die ein langsames Wachstum auf Sorbose-enthaltenden, Chinasäurefreien

Agarmedien zeigen, vermindert den Aufwand. Diese Klone müssten des Weiteren auf ihre Chinasäureabhängigkeit untersucht werden, um eine Auswahl von interessanten Klone zu erhalten. Klone, die aufgrund ihres Phänotyps auf einen Komplex I-Defekt deuten, müssten durch einen enzymologischen Nachweis auf Komplex I-Anwesenheit untersucht werden.

Auch durch die vereinfachte Überprüfung des Phänotyps, ist der Aufwand für die Isolierung von Komplex I-Mutanten sehr hoch, da durchschnittlich pro isolierter Komplex I-Mutante tausend Klone überprüft werden müssten. Eine Anreicherung wäre demnach immer noch von großem Interesse. Obwohl das Wachstum der *cuco5*-Mutante durch einen Komplex I-Defekt erheblich eingeschränkt wird, gelang eine Filtrationsanreicherung nicht. Das könnte daran liegen, dass der Komplex I-Defekt stärker auf das Wachstum wirkt als auf das Auskeimen der Konidien. Auch langsam wachsende, bereits ausgekeimte Konidien werden durch die Filtration entfernt. Eine Verbesserung könnte durch Anwendung von Filtern mit definierten Porengrößen, die ausgekeimte Konidien erst ab einer bestimmten Größe zurückhalten, erzielt werden.

Die Identifizierung von Komplex I-Mutanten wäre nur der erste Schritt. Anschließend müssten die erhaltenen Komplex I-defekten Mutanten mit dem Wildtyp gekreuzt werden um Homokaryoten zu erhalten. Diese Klone müssten weiter charakterisiert werden, da nicht alle erhaltenen Komplex I-Mutanten von Interesse sind. Besonders Komplex I-Mutanten, die in gleichen Genen einen Defekt vorweisen, wie die durch gezielte Gendisruption erzeugten Mutanten, würden keine neuen Erkenntnisse bringen. Nur ein kleiner Teil der möglichen Komplex I-Mutanten beruhen auf bisher unbekanntem Genen. Die Mutanten bekannter Gene lassen sich durch Kreuzung aussortieren. Die Lokalisierung der Mutationen kann durch Kreuzungen mit „linkage tester“-Stämme eingegrenzt werden. Das betroffene Gen müsste anschließend durch Einzelüberprüfung der in Frage kommenden Gene identifiziert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des betroffenen Gens bei Mutanten mit unbekanntem defekten ist der Einsatz einer cDNA-Bank, basierend auf die Identifizierung von cDNAs, die durch Dominanzwirkung die Mutation kompensieren. Eine Erleichterung bei der Identifizierung der mutierten Gene wäre eine alternative Mutagenese-strategie. Statt der UV-Mutagenese wäre es möglich Mutanten durch Transformation

mit einem dominanten Selektionsmarker zu erzeugen. Die ektopische Integration des Markers in fremde Gene führt in der Regel zu deren Inaktivierung. Die Integrationsstelle ließe sich bei identifizierten Mutanten leicht durch PCR charakterisieren. Anhand der bekannten Genomsequenz ergibt sich daraus unmittelbar das betroffene Gen.

## 6. Literatur

- Abelmann A. (2000) Charakterisierung einer neuen Redoxgruppe im Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation, HHU Düsseldorf
- Abdullah, M.I., Royle, L.G., and Morris, A.W. (1972) Heavy metal concentration in coastal waters. *Nature*, **235**, 158-160
- Aboussekhra A., Biggerstaff M., Shivji M. K., Vilpo J. A., Moncollin V., Podust V. N., Protic M., Hubscher U., Egly J. M., Wood R. D. (1995) Mammalian DNA nucleotide excision repair reconstituted with purified protein components. *Cell* **80**, 859-868
- Abrahams J.P., Leslie A. G. W., Lutter R., Walker J. E. (1994) Structure at 2.8Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628
- Albury M. S., Dudley P., Watts F.Z., Moore A.L. (1996) Targeting the plant alternative oxidase protein to *Schizosaccharomyces pombe* mitochondria confers cyanide-insensitive respiration. *J. Biol. Chem.* **271**, 17062-17066
- Almeida T., Duarte M., Melo A. M., Videira A. (1999) The 24-kDa iron-sulphur subunit of complex I is required for enzyme activity. *Eur. J. Biochem.* **265**, 86-93
- Alves P. C. and Videira A. (1994) Disruption of the gene coding for the 21,3-kDa Subunit of the peripheral arm of complex I from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **269**, 7777-7784
- Alves P.C. and Videira A. (1998) The membrane domain of complex I is not assembled in the stopper mutant E35 of *Neurospora*. *Biochem. Cell Biol.* **76**, 139-143
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I., Nierlich D.P., Rose B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A., Staden R. and Young I. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-65
- Arst H. N., Jr. and MacDonald D. W. (1973) A mutant of *Aspergillus nidulans* lacking NADP-linked glutamate dehydrogenase. *Molec. gen. Genet.* **122**, 261-265
- Au H.C., Seo B.B., Yagi A., Yagi T., Scheffler I.E. (1999) The NDUFA1 gene product (MWFE protein) is essential for activity of complex I in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4354-4359
- Avalos J. E., Geever R. F., Case M. E. (1989) Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* **16**, 369-372
- Bauer M. F., Hofmann S., Neupert W., Brunner M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**, 25-31

- Beadle G. W. and Tatum E. L. (1941) Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **27**, 499-506
- Beadle, G. W., and Tatum, E. L. (1945) *Neurospora* II. Methods for producing and detecting mutations concerned with nutritional requirements. *Am. J. Bot.* **32**, 678-686
- Beadle G. W. and Coonradt V. L. (1944) Heterocaryosis in *Neurospora crassa*. *Genetics* **29**, 219-308
- Beers J., Glerum D. M., Tzagoloff A. (1997) Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.* **272**, 33191-33196
- Beisenherz G., Boltze H. J., Bücher T., Czok R., Garbade K. H., Meyer-Arendt E., Pfeleiderer G. (1953) Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang. *Z. Naturforsch.* **8b**, 555-557
- Bertrand H. and Collins R. A. (1978) A regulatory system controlling the production of cytochrome *aa<sub>3</sub>* in *Neurospora crassa*. *Mol. Gen. Genet.* **166**, 1-13
- Bertrand H., Argan C. A., Szakacs N. A. (1983) Genetic control of the biogenesis of cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. In R. J. Schweryen, K. Wolf, and F. Kaudewitz (ed.), *Mitochondria*. Walter de Gruyter Co., Berlin, 495-507
- Bisson R. and Schiavo G. (1986) Two different forms of cytochrome *c* oxidase can be purified from the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **261**, 4373-4376
- Blenkinsop C., Aitken A.E. and Wilson M.T. (1996) Physical and functional characterization of monomeric and dimeric cytochrome *c* oxidases. *Comp. Biochem. Physiol.* **115B**, 421-28
- Böttcher B., Scheide D., Hesterberg M., Nagel-Steger L. und Friedrich T. (2002) A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.* **277**, 17970-17977
- Brandt U. and Trumppower B. L. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **29**, 165-197
- Brandt U. (1997) Proton-translocation by membrane-bound NADH-ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerget.* **1318**, 79-101

- Brasseur G., Tron G., Dujardin G., Slonimski P. P., Brivet-Chvillotte P. (1997) The nuclear ABC1 gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain. *Eur. J. Biochem.* **246**, 103-111
- Brockman H. E., de Serres F. J. (1963) "Sorbose Toxicity" in *Neurospora crassa*. *Am. J. Botany* **50**, 709-714
- Buchanan S. K. and Walker J.E. (1996) Large-scale chromatographic purification of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase and complex I from bovine heart mitochondria, *Biochem. J.* **318**, 343-349
- Budde S. M., Van den Heuvel L. P., Janssen A. J., Smeets R. J., Buskens C. A., DeMeirleir L., Van Coster R., Baethmann M., Voit T., Trijbels J. M., Smeitink J. A. (2000) Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 63-68
- Campell J. W., Enderlin C. S., Selitrennikoff (1994) Vectors for expression and modification of cDNA sequences in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* **41**, 20-21
- Capaldi R.A. (1990) Structure and function of cytochrome c oxidase. *Ann. Rev. Biochem.* **59**, 569
- Capitanio N., Capitanio G., De Nitto E., Villiani G. and Papa S. (1991) H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. *FEBS Lett.* **208**, 179-82
- Case M. E. (1963) Procedure for filtration-concentration experiments. *Neurospora Newsletter* **3**, 7
- Chacinska A., Boguta M. (2000) Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria. *Acta Biochem. Pol.* **47**, 973-991
- Church G. M., Gilbert W. C. (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1991-1995
- Cogoni C. (2001) Homology-dependent gene silencing mechanisms in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 381-406
- Colson A. M. (1993) Random mutant generation and its utility in uncovering structural and functional features of cytochrome *b* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 211-220
- Cramer W.A., Martinez S.E., Furbacher P., Huang D., Smith J.L. (1994) The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 536-544

- Crofts, A. R. (1985) The mechanism of ubiquinol:cytochrom c oxidoreductase of mitochondria and of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. In *The Enzymes of Biological Membranes*, (Martonosi, A.N., ed.), Plenum Publ. Corp., New York. **4**, 347-382
- Crofts A. R. and Berry E. A. (1998) Structure and function of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 501-509
- da Silva M.V., Alves P.C., Duarte M., Mota N., Lobo-da-Cunha A., Harkness T. A. A., Nargang F.E., Videira, A. (1996) Disruption of the nuclear gene encoding the 20.8-kDa subunit of NADH:ubiquinone reductase of *Neurospora* mitochondria. *Mol. Gen. Genet.*, **252**: 177-183
- Davis R. H. and de Serres F. J. (1970) Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **17A**, 79-143
- Davis R. H. and Perkins D. D. (2002) *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Rev. Genet.*, **3**, 397-403
- De Blas A. L., Cherwinski H. M. (1983) Detection of antigens on nitrocellulose paper immunoblots with monoclonal antibodies. *Anal. Biochem.* **133**, 214-219
- de Vries H., Alzner-DeWeerd B., Breitenberger C. A., Chang D. D., de Jonge J. C., RajBhandry U. L. (1986) The E35 stopper mutant of *Neurospora crassa*: precise localization of deletion endpoints in mitochondrial DNA and evidence that the deleted DNA codes for a subunit of NADH dehydrogenase. *EMBO J.* **5**, 779-785
- de Vries S. and Grivell L. A. (1988) Purification and characterization of a rotenon-insensitive NADH :Q6 Oxidoreduktase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **176**, 377-384
- Djafarzadeh R., Kerscher S., Zwicker K., Lindahl M., Radermacher M., Brandt U. (2000) Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 230-238
- 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., Mota N., Pinto L., Videira A. (1998) Inactivation of the gene coding for the 30.4-kDa subunit of respiratory chain NADH dehydrogenase: Is the enzyme essential for *Neurospora*? *Mol. Gen. Genet.* **257**, 368-375
- Duarte M. and Videira A. (2000) Respiratory chain complex I is essential for sexual development in *Neurospora* and binding of iron sulfur clusters are required for enzyme assembly. *Genetics* **156**, 607-615

- Duarte M., Pópulo H., Videira A., Friedrich T., Schulte U. (2002) Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH:ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* **364**, 833–839
- Duarte M., Peters M., Schulte U., Videira A. (2003) The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochem. J.* **371**, 1-7
- Douce R. and Neuburger M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**, 371-414
- Ebbole, D.J. and Sachs, M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal Genet. Newsl.*, **37**, 17-18.
- Ewart G.D., Zhang Y.-Z. and Capaldi R.A. (1991) Switching of bovine cytochrome c oxidase subunit VIa isoforms in skeletal muscle during development. *FEBS Lett.* **292**, 79-84
- Fearnley I.M. and Walker J.E. (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex-I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 105-134.
- Fecke W., Sled V. D., Ohnishi T., Weiss H. (1994) Disruption of the gene encoding the NADH-Binding subunit of NADH:ubichinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulphur cluster N-3. *Eur. J. Biochem.* **220**, 551-558
- Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DANN restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13  
sowie die Ergänzung (1984) gleicher Titel, *Anal. Biochem.* **137**, 266
- Ferreirinha F., Duarte M., Melo A. M., Videira A. (1999) Effects of disrupting the 21 kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* **342**, 551-554
- Ferguson-Miller S., Brautigan D.L. and Margoliash E. (1978) Definition of cytochrome binding domains by chemical modification. *J. Biol. Chem.* **253**, 149-59
- Fincham J. R. and Pateman J. A. (1957) Formation of an enzyme through complementary action of mutant alleles in separate nuclei in a heterocaryon. *Nature* **176**, 741-742
- Fincham J. R. S., Day P. R., Radford A. (1979) Fungal Genetics. *Fourth ed.* University of California Press, Berkeley. 636 pp.
- Fincham J. R. (1989) Transformation in fungi. *Microbiol. Rev.* **53**, 148-170
- Frank V. and Kadenbach B. (1996) Regulation of the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. *FEBS Lett.* **382**, 121-124

- Friedrich T., Hofhaus G., Ise W., Nehls U., Schmitz B., Weiss H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 173-180
- Friedrich T., Strohdeicher M., Hofhaus G., Preis D., Sahm H., Weiss H. (1990) The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase. *FEBS Lett.* **265**, 37-40
- Friedrich T., Brors B., Hellwig P., Kintscher L., Rasmussen T., Scheide D., Schulte U., Mäntele W., Weiss H. (2000) Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 305-309.
- Friedrich T., van Heek P., Leif H., Ohnishi T., Forche E., Kunze B., Jansen R., Trowitzsch-Kienast W., Höfle G., Reichenbach H., Weiss H. (1994) Two binding sites of inhibitors in NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Eur. J. Biochem.* **219**, 691-698
- Fungal Genetic Stock Center (2002) Catalogue of strains 9<sup>th</sup> Edition. *Fungal Genet. Newsl.* **49**, Supplement
- Galagan J. E., Calvo S. E., Borkovich K. A., Selker E. U., Read N. D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C. B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Peterson D., Nelson M. A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C. P., Kinsey J. A., Braun E. L., Zelter A., Schulte U., Kothe G. O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotta E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Maucell E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzner R. L., Perkins D. D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R. J., Osmani S. A., DeSouza C. P. C., Glass L., Orbach M. J., Berglund J. A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D. O., Alex L. A., Mannhaupt G., Ebbole D. J., Freitag M., Pausen I., Sachs M. S., Lander E. S., Nusbaum C., Birren B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature.* **422**, 859-868
- Gennis R. B., Barquera B., Hacker B., Doren S. R. V., Arnaud S., Crofts A. R., Davidson E., Gray K. A., Daldal F. (1993) The *bc<sub>1</sub>* complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 195-209
- Giles N. H., Case M. E., Baum J., Geever R., Huiet L., Patel V., Tyler B. (1985) Gene organization and regulation in the *qa* (quinic acid) gene cluster of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* **49**, 338-358
- Giorgio A. J., Cartwright G. E., Wintrobe M. M. (1963) Preparation of a copper-deficient medium for yeast growth. *J. Bacteriol.* **86**, 1037-1040

- González A., Jiménez A., Vázquez D., Davies J.E., Schindler D. (1978) Studies on the mode of action of hygromycin B, an inhibitor of translocation in eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*. **521**, 459-469
- Graham L. A., Brandt U., Sargent J. S., Trumpower B. L. (1993) Mutational analysis of assembly and function of the iron-sulfur protein of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 245-257
- Griffin N. L. (1994) *Fungal Physiology*, pp. 215-300. Wiley-Liss, New York
- Grivell L. A., Artal-Sanz M., Hakkaart G., de Jong L., Nijtmans L. G., van Oosterum K., Siep M., van der Spek H. (1999) Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Lett.* **452**, 57-60
- Grossman L. and Brown D. M. (1969) In *Mutation as a Cellular Process*. Ciba Symposium. J. A.Churchill. **271**, 109-130
- Guénebaut V., Vincentelli R., Mills D., Weiss H., Leonard K. (1997) Three dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by elektron 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
- Hakvoort T.B.M., Moolenaar K., Lankvelt A.H.M., Sinjorgo K.M.C., Dekker H.L. and Muijsers A.O. (1987) Separation, stability and kinetics of monomeric and dimeric bovine heart cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **894**, 347-54
- Haltia T., Saraste M. and Wikström M. (1991) Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in proton translocation: A site-directed mutagenesis study. *EMBO J.* **10**, 2015-21
- 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., Werner S., Azevedo J. E., Vidiera A., Nargang F. E. (1995) Disruption of the gene encoding the 78-kilodalton subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation (RIP). *Curr. Genet.* **27**, 339-350
- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial elektron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1025-1069

- Hawlitsek G., Schneider H., Schmidt B., Tropschug M., Hartl F.-U., Neupert W. (1988) Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* **53**, 795-806
- Hell K., Herrmann J. M., Pratje E., Neupert W., Stuart R. A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2250-2255
- 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
- Horne T. J., Hollomon D. W., Wood P. M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acts* **1504**, 179-195
- Huebschmann C. (1952) A method of varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*. *Mycologia.* **44**, 599-604
- Huh W. and Kang S. (1998) Molecular cloning and funktional expression of alternative oxidase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **181**, 4098-4102
- Hunte C., Koepke J., Lange C., Rossmannith T., and Michel H. (2000) Structure at 2.3 angstrom resolution of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody F<sub>v</sub> fragment. *Structure with Folding & Design.* **8**, 669-684
- Iwata S., Ostermeier Ch., Ludwig B. and Michel H. (1995) Sructure at 2.8 A resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669
- Iwata S., Lee J. W., Okada K., Lee J. K., Iwata M., Rasmussen B., Link T. A., Ramaswamy S., Jap B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *Science* **281**, 64-71
- Izrailev S., Crofts A. R., Berry E. A., Schulten K. (1999) Steered molecular dynamics simulation of the Rieske subunit motion in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *Biophysical Journal* **77**, 1753-1768
- Jensen P., Wilson M. T., Aasa R., Malmstrom B. G. (1984) Cyanide inhibition of cytochrome c oxidase. A rapid-freeze e.p.r. investigation. *Biochem. J.* **224**, 829-837
- Joseph-Horne T., Wood P. M., Wood A. L., Moore A. L., Headrick J., Hollomon D. (1998) *J. Biol. Chem.* **273** 11127-11133
- Joseph-Horne T., Hollomon D. W., Wood P. M. (2001) Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 179-195

- Kadenbach B., Jarausch J., Hartmann R., Merle P. (1983) Separation of mammalian cytochrome c oxidase into 13 polypeptides by a sodium dodecyl sulfate-gel electrophoretic procedure. *Anal. Biochem.* **129**, 517-521
- Kadenbach B., Stroh A., Ungibauer M., Kuhn-Nentwig L., Büge U. and Jarausch J. (1986) Isozymes of Cytochrome c Oxidase: Characterization and Isolation from Different Tissues. *Methods Enzymol.* **126**, 32-45
- Kanno S., Iwai S., Takao M., Yasui A. (1999) Repair of apurinic/aprimidinic sites by UV damage endonuclease; a repair protein for UV and oxidative damage. *Nucleic Acids Research* **27**, 3096-3103
- Kaplan R. W. (1957) Genetik der Mikroorganismen. *Fortschr. Bot.* **19**, 288-323
- Keller N. P. and Hohn T. M. (1997) Review: Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **21**, 17-29
- Kerscher S. J., Eschemann A., Okun P. M., Brandt U. (2001) External alternative NADH:ubichinone oxidoreductase redirected to the rescues complex I deficiency in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Science* **114**, 3915-3921
- Kiebler M., Pfaller R., Sollner T., Griffiths G., Horstmann H., Pfanner N., Neupert W. (1990) Identification of a mitochondrial receptor complex required for recognition and membrane insertion of precursor proteins. *Nature* **348**, 610-616
- Kilbey B.J., de Serres F. J., Malling H. V. (1971) Identification of the genetic alteration at the molecular level of ultraviolet light-induced *ad-3B* mutants in *Neurospora crassa*. *Mutation Res.* **12**, 47-56
- Klaus C., Guiard B., Neupert W., Brunner M. (1996) Determinants in the presequence of cytochrome b2 for import into mitochondria and for proteolytic processing. *Eur. J. Biochem.* **236**, 856-861
- Krüll C. (1995) Spezifische Mutagenese der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Küffner R. (1998) Zur Assemblierung der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- LeClerc J. E., Borden A., Lawrence C. W. (1991) The thymine-thymine pyrimidine-pyrimidone(6-4) ultraviolet light photoproduct is highly mutagenic and specifically induces 3' thymine-to-cytosine transitions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 9685-9689
- Leif H., Weidner U., Berger A., Spehr V., Braun M., van Heek P., Friedrich T., Ohnishi T., Weiss H. (1993) *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I. *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 998-1001

- Li Q., Ritzel R. G., McLean L. L. T., 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
- Lindegren C. C. and Lindegren, G. (1941) X-ray and ultraviolet-induced mutations in *Neurospora*, I. X-Ray mutations; II. Ultraviolet mutations. *J. Hered.* **32**, 405-412
- Link T. A., Haase U. Brandt U. and Jagow G. (1993) What information do inhibitors provide about the structure of the hydroquinone oxidation site of ubihydroquinone:cytochrome *c* oxidoreductase? *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 221-232
- 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
- Lowry R. J., Durkee T. L., Sussmann A. S. (1967) Ultrastructural studies of microconidium formation in *Neurospora crassa*. *J. Bac.* **94**, 1757-1763
- Malling H. V. (1965) Identification of the genetic alterations in nitrous acid-induced ad-3 mutants of *Neurospora crassa*. *Mutat. Res.* **4**, 320-327
- Mannhaupt G., Montrone C., Haase D., Mewes H. W., Aign V., Hoheisel J. D., Fartmann B., Nayakatura G., Kempken F., Maier J., Schulte U. (2003) What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. **31**, 1944-1954
- Marques I., Duarte M., Videira A. (2003) The 9.8 kDa subunit of complex I, related to bacterial Na<sup>+</sup>-translocating NADH dehydrogenases, is required for enzyme assembly and function in *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.* **329**, 283-290
- Martens R. I. and Githens R. E. (1952) Small amounts of copper in dyes and rubber chemicals. Colorimetric determinations with zinc dibenzylthiocarbamate. *Anal. Chem.* **24**, 991-993
- McIntosh L., (1994) Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiol.* **105**, 781 -786
- Melo A. M., Duarte M., Videira A. (1999) Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1412**, 282-287
- Melo A. M., Duarte M., Moller L. M., Prokisch H., Dolan P. L., Pinto L., Nelson M. A., Videira A. (2001) The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 3947-3951
- Mewes H. W., Frishman D., Guldener U., Mannhaupt G., Mayer K., Mokrejs M., Morgenstern B., Munsterkotter M., Rudd S., Weil B. (2002) MIPS: a database for genomes and protein sequences. *Nucleic Acids Res.* **30**, 31-34
- Michell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148

- Michell P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J. Theor. Biol.* **62**, 327-367
- Michel H. (1999) Cytochrome c Oxidase: Catalytic Cycle and Mechanism of Proton Pumping - a Discussion. *Biochemistry* **38**, 15129-15140
- Millar A.H., Wiskich J.T., Day D.A. (1993) Organic acid activation of the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS lett* **329**, 259-262
- Mizutani A., Yukioka H., Tamura H., Miki N., Masuko M., Takeda R., (1995) Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyiminoacetamide fungicide. *Phytopathology* **85**, 306-311
- Mohr S., Stryker J. M., Lambowitz A. M. (2002) A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* **109**, 769-779
- Møller I.M. and Rasmusson A. G. (1998) The role of NADP in the mitochondrial matrix. *Trends Plant Sci* **3**, 21-27
- Møller I. M. (2001) Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 561-591
- Moore A. L. and Siedow J. N. (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1059**, 121-140
- 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:ubichinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption. *J. Mol. Biol.* **227**, 1032-1042
- Niini S. S. and Raudaskoski M. (1993) Response of ectomycorrhizal fungi to benomyl and nocodazole: growth inhibition and microtubule depolymerisation. *Mycorrhiza* **3**, 83-91.
- Orbach M. J., Porro E. B., Yanofsky C. (1986) Cloning and characterization of the gene for  $\beta$ -tubulin from a benomylresistant mutant of *Neurospora crassa* and its use as a dominant selectable marker. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2452-2461
- Ostermeier C., Harrenga A., Ermler U., and Michel H. (1997) Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody Fv fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10547-10553
- Papa S., Capitanio N., Capitanio G., De Nitto E. and Minuto M. (1991) The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry. *FEBS Lett.* **208**, 183-86

- Pall M. L., Brunelli J. P. (1993) A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genet. Newsl.* **40**, 59-26
- Patel V. B., Schweizer M., Dykstra C. C., Kushner S. R., Giles N. H. (1981) Genetic organization and transcriptional regulation in the *qa* gene cluster of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5783-5787
- Payen A. (1843) Extrait d'un rapport adressé à M. Le Maréchal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire du pain de munition. *Ann. Chim. Phys.* 3 Ser. **9**, 5-21
- Pentilla T. (1983) Properties and reconstitution of a cytochrome oxidase deficient in subunit III. *Eur. J. Biochem.* **133**, 355-61
- Perkins D. D., and Davis R. H. (2000) *Neurospora* at the millennium. *Fungal Genet. Biol.* **31**, 153-167
- Rakatzi I. (1998) Entwicklung eines Selektionsverfahrens zur Isolierung von Atmungskettenmutanten des Hyphenpilzes *Neurospora crassa*. Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität
- Rasmussen T., Scheide D., Brors B., Kinscher L., Weiss H., Friedrich T. (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferridoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **40**, 6124-6131
- Raut C. (1954) Heritable non-genic changes induced in yeast by ultraviolet light. *J. cell. Comp. Physiol.* **44**, 463-475
- Rieder R. and Bosshard H.R. (1980) Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bc<sub>1</sub>, and cytochrome c<sub>1</sub>. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **255**, 4732-39
- Robinson B.H. (1998) Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 271-286
- Saint-Georges Y., Hamel P., Lemaire C., Dujardin G. (2001) Role of positively charged transmembrane segments in the insertion and assembly of mitochondrial innermembrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 13814-13819
- Sakajo S., Minagawa N., Yoshimoto A. (1993) Characterization of the alternative oxidase protein in the yeast *Hansenula anomala*. *FEBS Lett* **318**, 310-312
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour, New York Cold Spring Harbour Laboratory Press.* **2. Aufl.**

- Saraste M. (1990) Structural features of cytochrome oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 331-366
- Sarker K. (1997) Charakterisierung des Membranarms des Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität
- Scacco S., Vergari R., Scarpulla R. C., Technikova-Dobrova Z., Sardanelli A., Lambo R., Lorusso V., Papa S. (2000) cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear-encoded 18kDA(IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* **275**, 17578-17582
- Schägger H., Brandt U., Gencic S. and von Jagow G. (1995) Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Methods Enzymol.* **260**, 82-96
- Schiavo G. and Bisson R. (1989) Oxygen influences the subunit structure of cytochrome c oxidase in the slime mold *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **264**, 7129-34
- 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
- Schroeder A. L. (1975) Genetic control of radiation sensitivity and DNA repair in *Neurospora*. In *Molecular Mechanisms for Repair of DNA* (Part B) (P. C. Hanawalt & R. B. Setlow eds.), Plenum Press, N. Y., pp. 567-576
- Schulte U., Arretz M., Schneider H., Tropschug M., Wachter E., Neupert W., Weiss H. (1989) A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature* **339**, 147-149
- Schulte U., Fecke W., Krüll C., Nehls U., Schmiede A., Schneider R., Onishi T., Weiss H. (1994) In vivo dissection of the mitochondrial respiratory chain NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 121-124
- Schulte U. and Weiss H. (1995) Generation and characterization of NADH:ubichinon oxido- reductase mutants in *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **260**, 3-14
- Schulte U. and 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. *BioFactos* **8**, 177-186

- Schulte U., Haupt V., Abelmann A., Brors B., Rasmussen T., Friedrich T., Weiss H. (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex I. *J. Mol. Biol.* **292**, 569-580
- Schulte U. (2001) Biogenesis of respiratory complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 205-212
- Schulte U., Becker I., Mewes H. M., Mannhaupt G. (2002) Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. *J. Biotechnol.* **94**, 3-13
- Schwab A. J. (1973) Mitochondrial protein synthesis and cyanide-resistant respiration in copper-depleted, cytochrome oxidase-deficient *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **35**, 63-66
- Schwitzguébel J. P. and Palmer J. M. (1982) Properties of mitochondria as a function of the growth stage of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **149**, 612-619
- Sebald W., Neupert W., Weiss H. (1979) Preparation of *N. crassa* mitochondria. *Meth. Enzymol.* **55**, 144-148
- Selker E. U. (1990) Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 579-613
- Shear C. L. and Dodge B. O. (1927) Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *J. Agric. Res.* **34**, 1019-1042
- Sherman F. (1964) Mutants of yeast deficient in cytochrom c. *Genetics* **49**, 39-48
- Shimura M., Ito Y., Ishii C., Yajima H., Linden H., Harashima T., Yasui A., Inooue H. (1999) Characterization of a *Neurospora crassa* photolyase-deficient mutant generated by repeat induced point mutation of the phr gene. *Fungal Genet. Biol.* **28**, 12-20
- Siedow J. N. (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis. In I. Zelitch (Ed.) *Plant biology 10*, Wiley-Liss, New York
- Siedow J. N. and Umbach A. L. (1995) Plant Mitochondrial Electron Transfer and Molecular Biology. *Plant Cell* **7**, 821-831
- Singer M. and Selker E. U. (1995) Genetic and epigenetic inactivation of repetitive sequences in *Neurospora crassa*: RIP, DNA methylation and quelling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **197**, 165-177
- Singh A., Ursic D., Davies J. (1979) Phenotypic suppression and misreading in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **277**, 146-148
- Sinha R. P., Harder D. P. (2002) UV-induced DANN damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol.* **1**, 225-236

- Skulachev, V. P. (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett* **423**, 275-80
- Slayman C. W., Rees D. C., Orchard P. P., Slayman (1974) Generation of Adenosine Triphosphate in Cytochrom-deficient Mutants of *Neurospora*. **250**, 396-408
- Solioz M., Carafoli E. and Ludwig B. (1982) The cytochrome c oxidase of *Paracoccus denitrificans* pumps protons in a reconstituted system. *J. Biol. Chem.* **257**, 1579-1582
- Soulimane T., Buse G., Bourenkov G. P., Bartunik H. D., Huber R., Than M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant *ba<sub>3</sub>*-Cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. *EMBO J.* **19**, 1766-1776
- Southern E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517
- 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
- Stade S., Brambl R. (1981) Cytochrome c oxidase in cytochrom c oxidase-deficient mutant strains of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **256**, 10235-10238
- Suzuki C. K., Rep M., van Dijl J. M., Suda K., Grivell L. A., Schatz G. (1997) ATP-dependent proteases that also chaperoneprotein biogenesis. *Trends. Biol. Chem.* **22**, 118-123
- Suyama Y., Munkres K. D., Woodward V. W. (1959) Genetic analyses of the pyr-3 locus of *Neurospora crassa*: the bearing of recombination and gene conversion upon intraallelic linearity. *Genetica* **30**, 293-311
- Tanton L. L., Nargang C. E., Kessler K. E., Li Q., Nargang F. E. (2003) Alternative oxidase expression in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Biol.* **39**, 176-190
- Takao M., Yonemasu R., Yamamoto K., Yasui A (1996) Characterization of a UV endonuclease gene from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and its bacterial homolog. *Nucleic Acids Research*, **24**, 1267-1271
- Towbin H., Staehlin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**, 4350-4353
- Trueblood C. E. and Poyton R. O. (1987) Differential effectiveness of yeast cytochrome c oxidase subunit genes results from differences in expression not function. *Mol Cell Biol.* **7**(10), 3520-3526
- Trumpower B. L. (1990) Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**, 101-129.

- Trumpower B. L. (1991) The threesubunit cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex of *Paracoccus denitrificans*. Its physiological function, structure, and mechanism of electron transfer and energy transduction. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**, 241-255
- Tsalastra W. (1998) Identifizierung ungerichtet erzeugter NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase Mutanten von *Neurospora crassa*. Diplomarbeit Heinrich-Heine-Universität
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamasita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yoshikawa S. (1995) Structures of Metal Sites of Oxidized Bovine Heart Cytochrome c Oxidase at 2,8 Å. *Science* **269**, 1069-1074
- Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa- Itoh K., Nakashima R., Yaono R, and Yoshikawa S. (1996) The whole structure of the 13-Subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-44
- Tuschen G., Sackmann U., Nehls U., Haiker H., Buse G., Weiss H. (1990) Assembly of NADH:Ubichinone Reductase (Complex I) in *Neurospora* Mitochondria, *J. Mol.Biol.* **213**, 845-857
- Tzagoloff A., Nobrega M., Gorman N., Sinclair P. (1993) On the functions of the yeast COX10 and COX11 gene products. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**, 593-598
- Umbach A. L., Wiskich J.T., Siedow J.N. (1994) Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular disulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Lett* **348**, 181–184
- Videira A., (1998 ) Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**, 89-100
- Videira A. and Duarte M. (2001) On Complex I and other NADH:ubiquinone reductases of *Neurospora crassa* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 197-203.
- Vogel H.J. (1956) A convient growth media of *Neurospora crassa*. *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42-47
- von Jagow G., Link T. A. and Ohnishi T. (1986) Organization and function of cytochrome *b* and ubiquinone in the cristae membrane of beef heart mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **18**, 157-179.
- Walker J. E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Rev. Biophys.* **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 mitchondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **197**, 257-264

- Weidner U., Geier S., Ptock A., Friedrich T., Leif H. and Weiss H. (1993) The Gene locus of the proton-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*. Organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of the mitochondrial complex I. *J. Mol. Biol.* **233**, 109-122.
- Weiss H., von Jagow G., Klingenberg M., Bücher T. (1970) Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria: preparation with a grind-mill. *Eur. J. Biochem.* **14**, 75-82
- Weiss H., Friedrich T., Hofhaus G., Preis D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563-576
- Westergaard M., Mitchell H.K. (1947) *Neurospora* V. A Synthetic Medium Favoring Sexual Reproduction. *Am. J. Bot.* **34**, 573-577
- Whittington H. A., Francisco da Silva A. J., Grant S., Roberts S. F., Lamb H., Hawkins A. R. (1987) Identification and isolation of a putative permease gene in the quinic acid utilization (*QUT*) gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genetics* **12**, 135-139
- Wikström M., Krab K. and Saraste M. (1981) Proton-Translocating Cytochrome Complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 623-655
- Witt H., Malatesta F., Nicoletti F., Brunori M. and Ludwig B. (1998) Tryptophan 121 of Subunit II is the Electron Entry Site to Cytochrome c Oxidase in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **273**, 5132-36
- Xia D., Yu C. A., Kim H., Xia J. Z., Kachurin A. M., Zhang L., Yu L., Deisenhofer J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60-66
- Yagi T., Seo B. B., di Bernardo S., Nakamaru-Ogiso E., Kao M. C., Matsuno-Yagi A. (2001) NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 233-242
- Yasui A. and McCready S. J. (1998) Alternative repair pathways for UV induced DNA damage. *BioEssays* **20**, 291-297
- Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yaono R., Yamashita E., Inoue N., Yao M., Fei M. J., Libeu C. P., Mizushima T. *et al.* (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. *Science* **280**, 1723-1729
- Yu C. A., Xia J. Z., Kachurin A. M., Yu L., Kim H., Deisenhofer J. (1996) Crystallization and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome-*bc<sub>1</sub>* complex. *Biochem. Biophys. Acta* **1275**, 47-54
- Yu X. C. and William Margolin W. (1998) Inhibition of Assembly of Bacterial Cell Division Protein FtsZ by the Hydrophobic Dye 5,5'-Bis-(8-anilino-1-naphthalenesulfonate) *J. Biol. Chem.* **273**, 10216-10222

Zhang Z., Huang L., Chi Y. I., Kim K. K., Crofts A. R., Berry E. A., Kim S. H. (1998)  
Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*. *Nature* **392**, 677-684

## Danksagung

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

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Weiss für die interessante Themenstellung, die Betreuung und die kritische Durchsicht des Manuskriptes bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ulrich Schulte für die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die wertvollen Anregungen und die ständige Unterstützung.

Für die Einführung in die Molekularbiologie und die fortwährende Hilfsbereitschaft danke ich Dr. Jörg Hennemann.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts danke ich für die nette Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Meiner Labornachbarin Martina Wesemann danke ich für das freundschaftliche und „ordentliche“ Arbeitsumfeld sowie für die vielen Tipps im Laboralltag, besonders in Bezug auf die Benutzung der FPLC. Sven Karschnia danke ich für die Bereitschaft, jegliches Rechnerproblem zu lösen und Thorsten Borgs dafür, dass auch am Wochenende ein freundliches Gesicht im Institut anzutreffen war.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Roland Greul, die mich mit Geduld, Verständnis und Liebe während dieser Zeit unterstützt haben.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στους αγαπημένους μου γονείς, που με την αγάπη και την βοήθειά τους με υποστηρίζουν όλα αυτά τα χρόνια.

*Mut steht am Anfang des Handelns, Glück am Ende.*

*Demoklit, griech. Naturphilosoph, 460-370 v. Chr.*