

**Isolationsverfahren für den peripheren Arm des
Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora crassa***

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Thorsten Borgs

Düsseldorf, im Dezember 2005

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

1. Referent: Prof. Dr. Hanns Weiß
2. Referent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2005

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	
2.1 Das System der oxidativen Phosphorylierung	3
2.2 Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase	5
2.3 Spaltung des Komplex I	9
2.4 Biogenese des Komplex I	10
2.5 Affinitätschromatographie mit Peptid-Tags	14
2.6 Thema der Arbeit	15
3. Material und Methoden	
3.1 Lösungen, Puffer und Medien	17
3.2 Mikroorganismen, Vektoren und Oligonukleotide	20
3.3 Anzucht von Mikroorganismen	20
3.4 Analytische Mitochondrienpräparation	21
3.5 Präparation der Mitochondrienmembran von <i>N. crassa</i>	22
3.6 Isolierung des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit KSCN	23
3.7 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der <i>N. crassa</i> -Mutante <i>nuo20.9</i>	24
3.8 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der <i>N. crassa</i> -Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i>	25
3.9 Molekularbiologische Methoden	25
3.10 Verschiedene analytische Methoden	29
3.11 Massenspektrometrie und Sequenzanalyse	30

4. Ergebnisse

4.1	Isolierung des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit KSCN	31
4.1.1	Untereinheitensammensetzung des durch Rhodanid-Spaltung erzeugten peripheren Arms	36
4.2	Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der Mutante <i>nuo20.9</i>	37
4.3	Erzeugung der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i> und Isolierung des affinitätsmarkierten peripheren Arms	39
4.3.1	Strategie zur Erzeugung der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i>	39
4.3.2	Erzeugung der Doppelmutante <i>nuo20.9/30.4</i>	39
4.3.3	Erzeugung des His-Tag Affinitätsvektors zur Komplementation der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i>	40
4.3.4	Transformation der Mutante <i>nuo20.9/30.4</i> mit pN30.4his	43
4.3.5	Affinität des peripheren Arms aus der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i> für Ni-NTA	44
4.3.6	Isolierung des peripheren Arms aus der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i> durch His-Tag-Affinitätschromatographie	46

5. Diskussion

5.1	Der periphere Arm als Subkomplex des Komplex I	51
5.2	Isolierung des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit Kaliumrhodanid	52
5.3	Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der Mutante <i>nuo20.9/30.4his</i>	53
5.4	Vergleich der Präparationen des peripheren Arms	54

6. Literatur 55

1. Zusammenfassung

Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase, auch Atmungskettenkomplex I genannt, koppelt die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von vier Protonen über die innere Mitochondrienmembran. Der Enzymkomplex trägt so zum Aufbau eines elektrochemischen Membranpotentials bei, das die Synthese von ATP sowie Transportprozesse antreibt. Komplex I hat eine L-förmige Struktur mit einem peripheren, in die mitochondriale Matrix ragenden Arm, und einem in der inneren Mitochondrienmembran liegenden Membranarm. Der Mechanismus der elektronengetriebenen Protonentranslokation ist unverstanden, da es bislang nicht gelang eine hochaufgelöste Kristallstruktur des Komplex I zu bestimmen. Ein Grund dafür kann in der Größe und Struktur des Komplex I liegen sowie in den über viele Schritte verlaufenden und das Protein stark beanspruchenden Präparationsverfahren. In unserem Institut wird deswegen versucht, die beiden Arme des Komplex I getrennt zu isolieren und kristallisieren.

Zur Präparation des peripheren Arms des Komplex I wurde bisher von einer *Neurospora crassa*-Mutante (Mutante *nuo20.9*) ausgegangen, in der ein Gen einer 20.9 kDa Untereinheit des Membranarms von Komplex I ausgeschaltete worden war und deswegen nur noch den peripheren Arm assemblieren kann. Die Präparation erstreckte über vier Reinigungsschritte und endete mit einer geringen Ausbeute.

In dieser Doktorarbeit wurde nach Alternativen zu diesem Präparationsverfahren des peripheren Arms gesucht, die es erlauben, das Protein schonender und mit besserer Ausbeute zu isolieren. Zwei Ansätze wurden verfolgt. Zum einen wurde der periphere Arm durch Spaltung des zuvor isolierten Komplex I mit dem chaotropen Salz Kaliumrhodanid, Zuckergradientenzentrifugation in Anwesenheit von Rhodanid und anschließender Anionenaustauschchromatographie gewonnen. 800 g Hyphen ergaben so 2 mg des peripheren Arms, der jedoch nur in Anwesenheit von Detergenz löslich war. Zum andern wurde eine Untereinheit des peripheren Arms aus einer Mutante, die nur den peripheren Arm assemblieren kann, mit einem His-Tag versehen und der periphere Arm durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA und Grössen-

ausschlußchromatographie aufgereinigt. Aus 800 g Hyphen wurden auf diesem Weg 3.5 mg des peripheren Arms in wasserlöslicher Form erhalten.

Für eine Kristallisation scheint somit die Präparation des peripheren Arms mit der Affinitätsmarkierung erfolgversprechender.

2. Einleitung

2.1 Das System der oxidativen Phosphorylierung

Eukaryote, heterotrophe Organismen gewinnen den größten Teil ihrer Energie durch das in der inneren Mitochondrienmembran gelegene System der oxidativen Phosphorylierung (Abbildung 1). Dieses besteht im Wesentlichen aus den drei protonenpumpenden Atmungskettenkomplexen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), Ubichinol:Cytochrom c Oxidoreduktase (Komplex III) und Cytochrom c Oxidase (Komplex IV) sowie der ATP-Synthase (Komplex V). Durch die Atmungskettenkomplexe werden Elektronen von NADH auf Sauerstoff übertragen und die dadurch freiwerdende Redoxenergie dazu verwendet, Protonen aus der mitochondrialen Matrix zu pumpen. Das damit erzeugte transmembrane elektrochemische Protonenpotential wird von der ATP-Synthase zur Synthese von ATP aus ADP verwendet (Mitchell, 1961). Diese Enzymkomplexe des Systems der oxidativen Phosphorylierung sind dualen genetischen Charakters, sie enthalten sowohl kernkodierte als auch mitochondrial kodierte Untereinheiten. Zur Biogenese dieser Enzyme ist ein Zusammenspiel der genetischen Systeme von Zellkern und Mitochondrien nötig (Attardi und Schatz, 1988).

Durch Röntgenstrukturanalyse ist es gelungen, die molekularen Strukturen der Komplexe III (Yu *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1997; Lange und Hunte, 2002) und IV (Iwata *et al.*, 1995; Tsukihara *et al.*, 1996) sowie des peripheren F₁-Teils (Abraham *et al.*, 1994) und des membranintegrierten F₀-Teils (Meier *et al.*, 2005) der ATP-Synthase zu bestimmen und die Mechanismen des Elektronen- und Protonentransfers zu verstehen. Die Kristallisation Komplex I erwies sich als schwierig. Aussagen über die dreidimensionale Struktur von Komplex I beruhen bisher auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Komplex I-Lösungen.

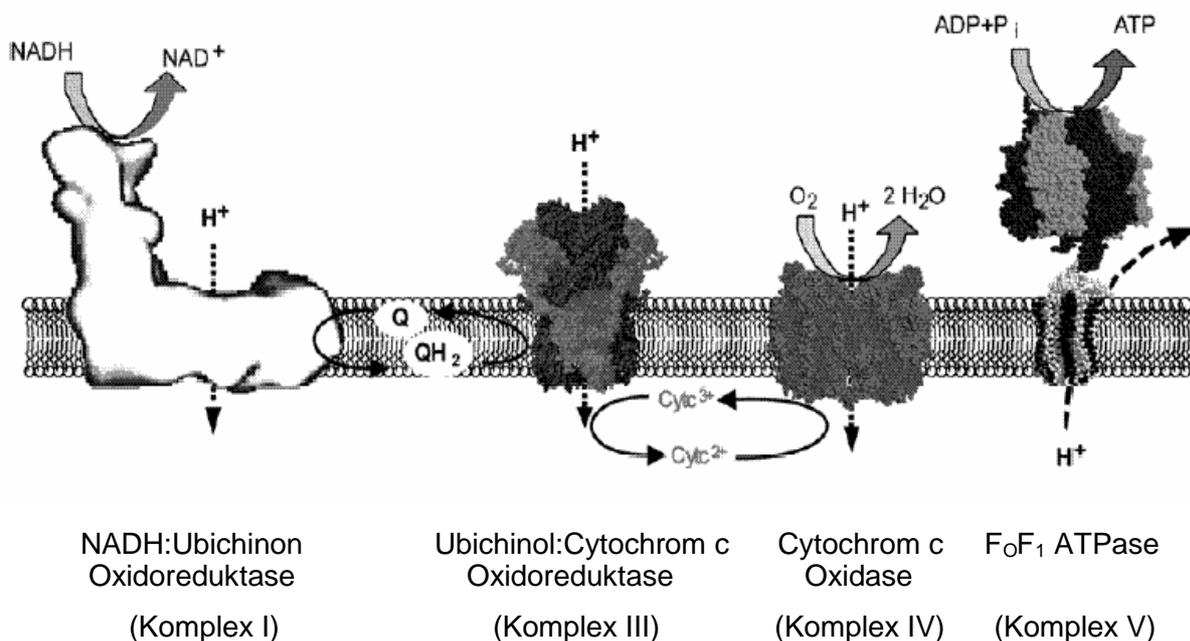


Abbildung 1: Schematische Darstellung des mitochondrialen Systems der oxidativen Phosphorylierung: Die Struktur von Komplex I wurde durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestimmt. Die Komplexe III, IV und V sind entsprechend ihrer Kristallstrukturen als Kugelmodelle dargestellt. Mit Q und QH₂ und Cyt³⁺ und Cyt²⁺ sind die oxidierten und reduzierten Formen der Elektronenüberträger Ubichinon und Cytochrom c abgekürzt.

Die Mitochondrien von Pilzen und Pflanzen verfügen zusätzlich zu den protonenpumpenden Atmungsketten-Komplexen noch über alternative, nicht protonenpumpende Atmungsketten-Komplexe. Es handelt sich dabei um alternative NAD(P)H:Ubichinon Oxidoreduktasen und um eine alternative Ubichinol Oxidase (Douce und Neuberger, 1989; de Vries und Grivell, 1988; Marres *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996; Luttik *et al.*, 1998; Small und McAllister, 1998, Duarte *et al.*, 2003). Die Affinität dieser Enzyme zu den Substraten NADH bzw. Ubichinol ist geringer als die der elektronenpumpenden Komplexe. Sie dienen als Überlaufventile für überschüssige Reduktionsäquivalente (Siedow, 1990). Weil diese Enzyme die Redoxaktivität der protonenpumpenden Komplexe ersetzen, können einzelne Atmungskettenkomplexe in Pilzen und Pflanzen gentechnisch inaktiviert werden.

2.2 Die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase

Die protonenpumpende NADH:Ubichinon Oxidoreduktase wird als erstes Enzym der Atmungskette Komplex I genannt. Sie koppelt die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon (Q) mit der Translokation von vier Protonen über die Membran gemäß der unten stehenden Gleichung in der die Indices n und p Protonen auf der negativ geladenen Inneren bzw. positiv geladenen Außenseite der Membran bezeichnen:



Verwandte Formen des Komplex I kommen in der inneren Mitochondrienmembran der meisten Eukaryoten, der Cytoplasmamembran vieler Eubakterien und der Thylakoidmembran von Chloroplasten vieler Pflanzen vor (Friedrich und Scheide, 2000). Desweiteren enthalten Hydrogenosomen das NADH-Dehydrogenase Modul des mitochondrialen Komplex I (Hirdy *et al.*, 2004). Gut untersucht ist bisher der mitochondriale Komplex I aus *Bos taurus* (Fearnley *et al.*, 2001) und aus *Neurospora crassa* (Schulte und Weiss, 1997), sowie der bakterielle Komplex I aus *Escherichia coli* (Friedrich *et al.*, 1995), *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1998) und *Aquifex aeolicus* (Peng *et al.*, 2003).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Komplex I aus *E. coli* und *N. crassa* zeigen eine L-förmige Struktur, mit einem peripheren Arm, der in das Cytosol bzw in die mitochondriale Matrix ragt, und einem etwa senkrecht dazu angeordneten Arm, der in der Membran angeordnet ist (Guénebaut *et al.*, 1998; Abbildung 2). Der bakterielle Komplex I besteht aus 14 Untereinheiten und hat eine molekulare Masse von 550 kDa. Er stellt eine Minimalform des eukaryotischen Enzyms dar. Membranarm und peripherer Arm bestehen aus jeweils 7 Untereinheiten. Der eukaryotische Komplex I hat eine molekulare Masse von 1 MDa und enthält zusätzlich zu den Homologen der 14 bakteriellen Untereinheiten noch bis zu 32 akzessorische Untereinheiten (Carroll *et al.*, 2003). Diese zusätzlichen Untereinheiten sind um das katalytische Grundgerüst aus den zum bakteriellen Komplex I homologen Untereinheiten angeordnet und stabilisieren es vermutlich (Abbildung 2). Der eukaryotische Komplex I ist dualen

genetischen Ursprungs. Die Homologen zu den sieben im Membranarm liegenden Untereinheiten des bakteriellen Komplex I werden von dem mitochondrialen Genom kodiert. Alle anderen Untereinheiten sind kernkodiert.

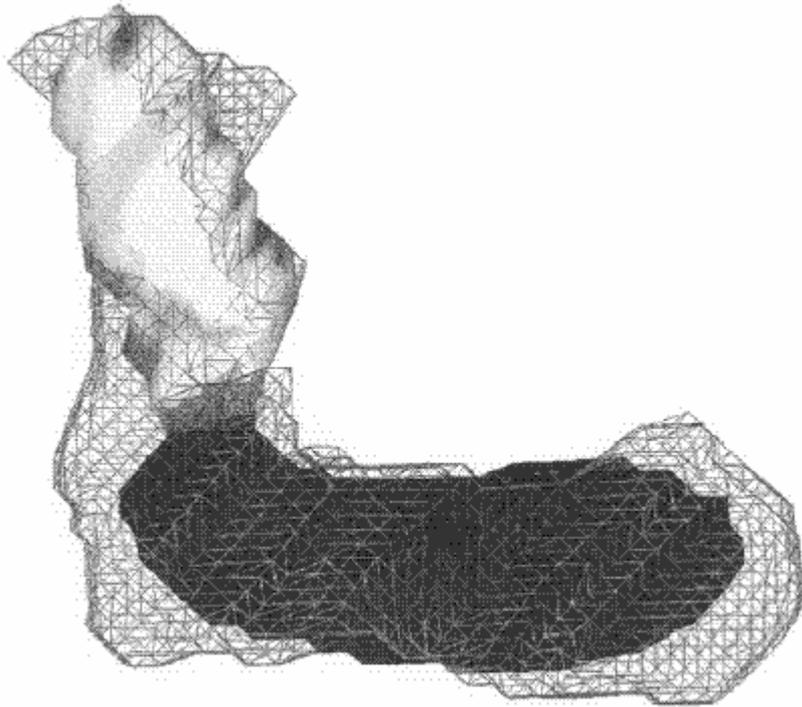


Abbildung 2: Überlagerung der aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen erhaltenen Modelle von Komplex I aus *E. coli* (ausgefüllt) und *N. crassa* (Drahtmodell). Der Membranarm ist dunkel, der periphere Arm ist hell dargestellt (nach Guénebaut *et al.*, 1998).

Die NADH-Bindestelle und alle bekannten prosthetischen Gruppen des Komplex I sind im peripheren Arm lokalisiert. Bei den prosthetischen Gruppen handelt es sich um ein Flavinmononukleotid (FMN) und acht bis neun Eisenschwefelzentren. In *N. crassa* wurden mittels ESR-Spektroskopie die FeS-Zentren N-1, N-2, N-3 und N-4 (Wang *et al.*, 1991) und durch UV-VIS-Spektroskopie die FeS-Zentren N-6a und N-6b nachgewiesen (Rasmussen *et al.*, 2001). Letztere befinden sich auf einer Untereinheit mit einem hochkonservierten Sequenzbindemotiv vom Typ eines 8 Fe-Ferredoxins. Während in *N. crassa* bisher nur ein zweikerniges Eisenschwefelzentrum (N-1)

gefunden wurde, enthält der Komplex I aus *B. taurus* und *E. coli* zwei zweikernige FeS-Zentren (N-1a und N-1b; Ohnishi, 1979; Uhlmann und Friedrich, 2005). Desweiteren wurden durch ESR-Spektroskopie in *B. taurus* und *Y. lipolytica* das vierkernige FeS-Zentrum N-5 (Djafarzadeh *et al.*, 2000) und in *E. coli* das vierkernige FeS-Zentrum N-7 charakterisiert (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2005). Im mitochondrialen Komplex I wurde bisher kein FeS-Cluster N-7 identifiziert. Dem Membranarm konnte bis auf die Ubichinon-Bindung (Friedrich *et al.*, 1990) keine eindeutige Funktion zugeordnet werden. UV-VIS-, FT-IR- und Laser-Raman-spektroskopische Aufnahmen weisen auf das Vorhandensein einer strukturell noch unbestimmten chinoiden Redoxgruppe X mit hohem Redoxpotential im Membranarm hin (Schulte *et al.*, 1998; Abelmann 2000; Friedrich *et al.*, 2000; Karschnia, 2002).

Während vom Membranarm bis auf elektronenmikroskopische Aufnahmen keine Strukturdaten vorhanden sind und der Mechanismus der redoxgetriebenen Protonentranslokation somit unbestimmt ist, konnte die Struktur des peripheren Arms durch Röntgenstrukturanalyse bis auf 4 Å aufgelöst werden (Hinchliffe und Sazanov, 2005). Der periphere Arm zeigt eine Y-förmige Struktur auf der Kanäle identifiziert wurden, die vermutlich den Substraten NADH und Ubichinon als Zugang zu den Eisenschwefelzentren N-3 und N-2 dienen (Abbildung 3 A). Der Elektronentransfer von NADH zum Ubichinon erfolgt der Reihe nach über die Eisenschwefelzentren N-3, N-1b, N-5, N-6a, N-6b und N-2 (Abbildung 3 B). Die Elektronentransportkette ist 84 Å lang und endet mit dem 15 Å vom Membranarm entfernt liegenden Eisenschwefelzentrum N-2. Die FeS-Zentren N-1a und N-7 sind nicht direkt an dem Elektronentransfer beteiligt. Die Aufgabe von N-7 scheint in der Stabilisierung des Proteins zu liegen, während N-1a durch Wechselwirkung mit dem FMN die Entstehung von Radikalen zu verringern scheint.

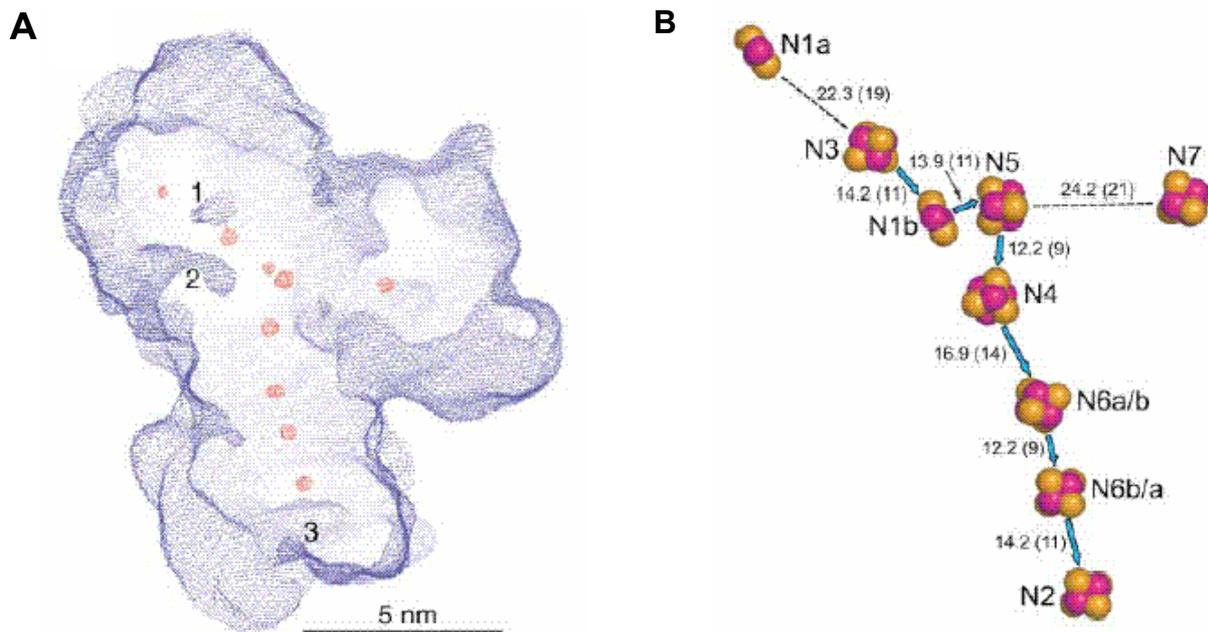


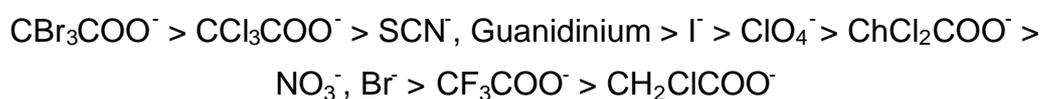
Abbildung 3: Röntgenkristallstruktur des peripheren Arms von Komplex I aus *T. thermophilus*. In (A) ist die Elektronendichte der FeS-Zentren innerhalb des Oberflächenreliefs des peripheren Arms dargestellt. Die FeS-Zentren sind rot gekennzeichnet. 1 und 2 indizieren mögliche Kanäle zum FeS-Zentrum N-3, welche bis auf 10 Å bzw. 15 Å an dieses heranreichen. 3 bezeichnet einen Kanal, der es dem Ubichinon erlauben würde das FeS-Zentrum N-2 zu erreichen. In (B) ist die Anordnung der FeS-Zentren im Komplex I gezeigt. Die Orientierung der FeS-Zentren zueinander entspricht jener in Abbildung (A). Die Abstände der FeS-Zentren sind in Å angegeben und der Elektronenweg durch Pfeile dargestellt (Hinchliffe und Sazanov, 2005).

Einige Untereinheiten des eukaryotischen Komplex I weisen Besonderheiten auf. So wurde eine 9,6 kDa schwere Untereinheit als Acylcarrier-Protein (ACP) mit einer Phosphopantetheingruppe als Kofaktor identifiziert. Die Untereinheit scheint bei der Biogenese des Komplex I eine Rolle zu spielen. In der *N. crassa*-Mutante *nuo9.6*, bei der das Gen für das ACP in ausgeschaltet wurde, wird weder der Membranarm noch der periphere Arm korrekt zusammengebaut (Schneider *et al.*, 1995). Es wird diskutiert, ob das ACP des Komplex I auch an der mitochondrialen Fettsäuresynthese beteiligt ist (Mikolajczyk *et al.*, 1990; Yagi *et al.*, 2003). Desweiteren

zeigt eine 40 kDa große periphere Untereinheit Verwandtschaft zu Reduktase-Isomerasen und besitzt ein festgebundenes NADPH (Fearnley und Walker, 1992; Zensen *et al.*, 1999). In *B. taurus* sind insgesamt dreizehn Untereinheiten N-terminal acetyliert, die Untereinheit B12 trägt am N-Terminus einen Myristatrest und besitzt bis zu drei methylierte Histidine (Carroll *et al.*, 2005). Ferner werden die 18 kDa Untereinheit ESSS und die 10 kDa-Untereinheit MWFE in *B. taurus* in einer Proteinkinase A-abhängigen Reaktion phosphoryliert (Chen *et al.*, 2004). Ob diese Phosphorylierung die enzymatische Aktivität des Komplex I reguliert, ist unklar.

2.3 Spaltung des Komplex I

Wegen der Größe und Komplexität wurde Komplex I in Teile zerlegt, um diese dann getrennt zu untersuchen. Eine Möglichkeit zur Fragmentierung von Proteinkomplexen besteht in der Verwendung von chaotropen Salzen, die den Zusammenhalt von Untereinheiten durch hydrophobe Wechselwirkungen mindern. Chaotrope Salze erniedrigen die Ordnung von Wasser und verringern somit die thermodynamische Barriere zur Überführung einer hydrophoben Gruppe in die weniger geordneten Bereiche des Wassers (Hatefi *et al.*, 1969). Im Allgemeinen sind Ionen mit einer geringen Ladungsdichte (großer Radius, kleine Ladung) chaotrop, wohingegen Ionen mit einer hohen Ladungsdichte einen gegenteiligen Effekt haben. Einige Ionen sind in der folgenden Reihe entsprechend ihrer chaotropen Potenz geordnet:



Der Komplex I aus Rinderherz kann durch das chaotrope Salz Kaliumperchlorat in die beiden wasserlöslichen Fragmente Flavo-Protein und Eisen-Schwefel-Protein und das nicht wasserlösliche Hydrophobe Fragment gespalten werden (Hatefi, 1985; Ragan, 1987; Singer und Ramsey, 1992). Dem aus drei Untereinheiten bestehenden Flavo-Protein wurde das FMN und die NADH-Bindestelle zugeordnet. Behandelt man den Komplex I aus *N. crassa* in hohen Konzentrationen mit den chaotropen Salzen NaBr, NaI und KSCN zerfällt der periphere Arm, während der Membranarm erhalten bleibt (Hofhaus *et al.*, 1991; Zensen *et al.*, 1992; Hennemann, 2000).

Neben der Verwendung von chaotropen Salzen ist eine Spaltung des Komplex I auch durch Detergentien oder durch Variation des pH-Wertes möglich. Der Rinderherz Komplex I lässt sich durch Behandlung mit N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid (LDAO) in ein wasserlösliches Fragment I α und in ein wasserunlösliches Fragment I β zerlegen (Finel *et al.*, 1992). Ersteres entspricht weitgehend dem peripheren Arm mit allen ESR-spektroskopisch nachweisbaren FeS-Zentren, letzteres entspricht weitgehend dem Membranarm. Von dem wasserlöslichen Fragment I α wurden mit dem Detergenz Laurylsarcosin weitere Untereinheiten abgespalten (Finel *et al.*, 1994). Der Komplex I aus *E. coli* wurde durch Erhöhung des pH-Wertes auf 9 in ein wasserlösliches NADH-Dehydrogenase-Fragment aus drei Untereinheiten mit der NADH-Bindestelle, dem FMN und den FeS-Zentren N-1, N-3 und N-4 und ein hydrophobes Ubichinon-Reduktase-Fragment aus 10 Untereinheiten mit den FeS-Zentren N-6a, N-6b und N-2 sowie der Ubichinon-Bindestelle gespalten (Böttcher *et al.*, 2002; Hesterberg, 2002). Desweiteren konnte das NADH-Dehydrogenase-Fragment auch durch Überexpression und anschließende affinitätschromatographische Aufreinigung erhalten werden (Braun *et al.*, 1998; Bungert *et al.*, 1999).

2.4 Biogenese des Komplex I

Die Assemblierung des Komplex I aus seinen Untereinheiten erfolgt in mehreren Stufen. Membranarm und peripherer Arm werden zunächst unabhängig voneinander assembliert und dann zum Komplex I zusammengefügt. Die Bildung des Membranarms erfolgt seinerseits aus zwei komplementären Subkomplexen, der

kleinen Vorstufe und der großen Vorstufe (Tuschen *et al.*, 1990; Nehls *et al.*, 1992; Schulte *et al.*, 2001; Abbildung 4). Dieses Bild der Assemblierung des Komplex I ergab sich aus der Untersuchung von *N. crassa*-Mutanten, in denen Gene von Untereinheiten des peripheren Arms oder des Membranarms ausgeschaltet wurden.

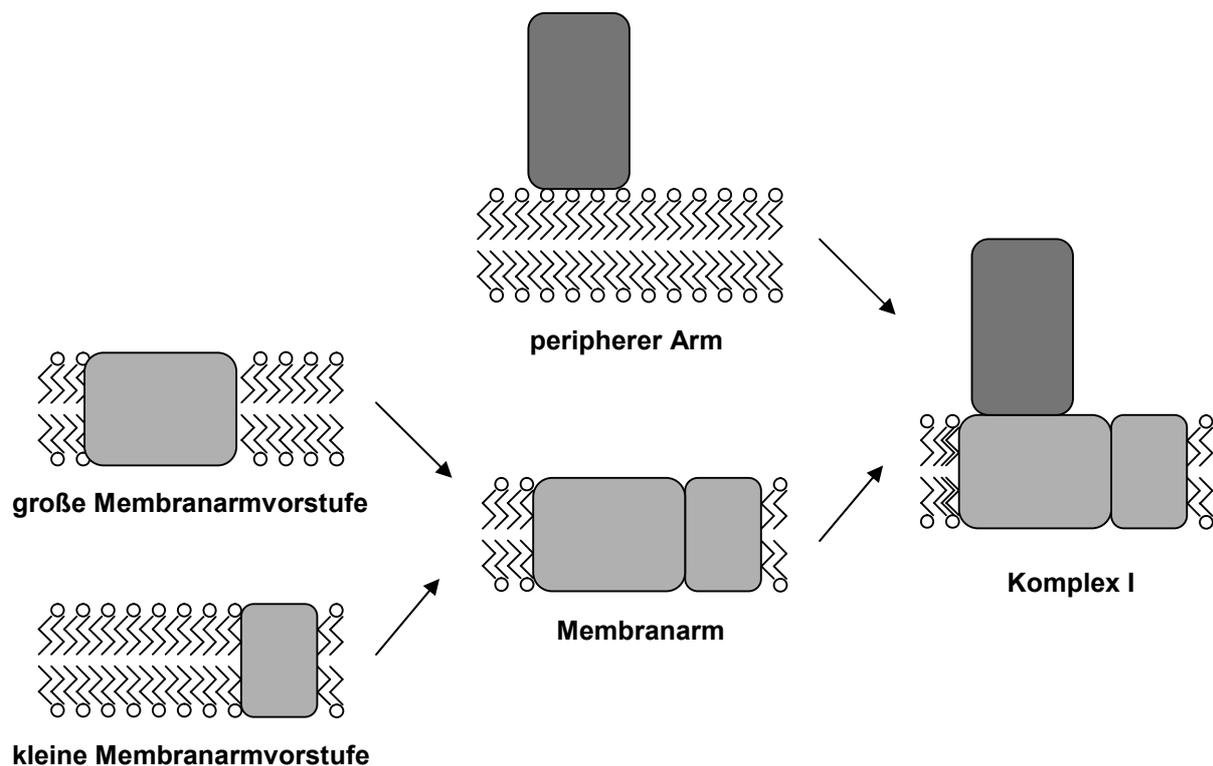


Abbildung 4: Assemblierungsschema des Komplex I aus *N. crassa*.

Fehlen Gene von Untereinheiten des peripheren Arms, führt dies zu Mutanten, in denen die Assemblierung des Membranarms noch erfolgt, die des peripheren Arms aber gestört ist. Die gestörte Biogenese des peripheren Arms kann vom Fehlen einzelner Untereinheiten bis zum Verlust des gesamten peripheren Arms reichen. Eine Ausnahme von diesem Muster stellten die ACP- und die 9,8 kDa-Untereinheit des Membranarms dar, bei deren Inaktivierung auch die Assemblierung des Membranarms gestört wird (Schneider *et al.*, 1996; Marques *et al.*, 2003). Das Ausschalten von

Genen von Komplex I-Untereinheiten des Membranarms führt häufig zu Mutanten, in denen der periphere Arm vollständig gebildet wird, der Membranarm aber nicht oder unvollständig assembliert wird. So reichert die Mutante *nuo20.9* den peripheren Arm und die kleine Membranarmvorstufe an. Eine Übersicht über die verschiedenen Komplex I-Mutanten mit den jeweils gebildeten Assemblierungsintermediaten gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Mutanten von *N. crassa* mit ausgeschalteten Genen von Untereinheiten des Komplex I.

Mutante	Lokalisation der betroffenen Untereinheit	Gebildeter Teil von Komplex I	Literatur
<i>nuo78</i>	Peripherer Arm	Membranarm, Teiles des peripheren Arms	Harkness <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo51</i>	Peripherer Arm	Komplex I ohne 51 kDa Untereinheit	Fecke <i>et al.</i> , 1994
<i>nuo49</i>	Peripherer Arm	Membranarm	Cernus, 1994
<i>nuo40</i>	Peripherer Arm	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>nuo21.3a</i>	Kleine Membranarmvorstufe	Peripherer Arm, große Membranarmvorstufe, kleine Membranarmvorstufe	Nehls <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo21.3b</i>	Peripherer Arm	Komplex I ohne 21,3 kDa Untereinheit	Alves und Videira, 1994
<i>nuo21.3c</i>	Peripherer Arm	Membranarm	Duarte und Videira, 2000
<i>nuo21</i>	Peripherer Arm	Komplex I ohne 21 kDa Untereinheit	Ferreirinha <i>et al.</i> , 1999
<i>nuo20.9</i>	Große Membranarmvorstufe	Peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Krüll, 1995
<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>nuo14</i>	Membranarm	Peripherer Arm	Marques <i>et al.</i> , 2005
<i>nuo12.3</i>	Membranarm	Peripherer Arm, Membranarm ohne die 12.3 kDa Untereinheit	Duarte <i>et al.</i> , 1995
<i>nuo11.5</i>	Membranarm	Peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Marques <i>et al.</i> , 2005
<i>nuo10.4</i>	Membranarm	Peripherer Arm, kleine Membranarmvorstufe	Krüll, 1995
<i>nuo9.8</i>	Membranarm	Weder periphere Arm noch Membranarm	Marques <i>et al.</i> , 2003

2.5 Affinitätschromatographie mit Peptid-Tags

Zur Kristallisation sollte das Protein mit möglichst wenigen Reinigungsschritten isoliert werden, um das Protein in einheitlicher Konformation zu erhalten. Die Affinitätschromatographie ist eine Methode, um ein Protein schonend mit hoher Ausbeute und hoher Spezifität zu reinigen. Dabei werden spezifische, reversible Komplexe zwischen der zu reinigenden Substanz und einem an einer Matrix gebundenen Liganden ausgebildet. Häufig verwendete Bindungspartner sind Antigen und Antikörper, Enzym und Coenzym oder Glycoprotein und Lecitin. Ist für ein Protein ein solcher Ligand nicht bekannt, ist die Anbringung eines Affinitäts-Tags möglich. Dabei handelt es sich um gentechnisch an das zu reinigende Protein angebrachte kleine Peptide. Zwei häufig verwendete Systeme sind das Histidin-Tag- und das Strep-Tag-System.

Der His-Tag besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidinen, die am C- oder am N-Terminus des Proteins angebracht werden können (Hochuli *et al.*, 1988). Als immobilierter Ligand wird die mit dem Ni^{2+} -Ion beladene metallchelatierende Gruppe Nitrilotriessigsäure (engl. Nitrilotriacetic acid; NTA) verwendet. Nitrilotriessigsäure besetzt vier der sechs Koordinationsstellen des Nickels. An die verbleibenden zwei Koordinationsstellen können die Histidine des Tags koordinativ binden. Das Protein kann durch Zugabe von Imidazol eluiert werden, das mit den Histidinen des Tags um die Koordinationsstellen des Nickels konkurriert. Das Strep-Tag-System nutzt die hohe Affinität von Avidin und Strep-Avidin zu Biotin (Voss und Skerra, 1997). Das zum antibakteriellen System des Hühnereis gehörende Avidin wirkt als Antibiotikum, indem es seiner Umgebung Biotin entzieht. Avidin kann bis zu vier Moleküle Biotin mit hoher Affinität binden ($K_D=10^{-5}$ M). In dem Strep-Tag II-System stellt das StepTactin als trägergebundener Ligand ein molekulares Abbild des Avidins dar, während eine kurze Peptidsequenz aus 8 Aminosäuren die molekularen Eigenschaften des Biotins trägt (Schmidt *et al.*, 1996). Zur Elution des gebundenen Proteins wird Desthiobiotin verwendet.

2.6 Thema der Arbeit

Unser Arbeitskreis bemüht sich um die Strukturaufklärung des mitochondrialen Komplex I aus dem Pilz *N. crassa* als Grundlage für das Verständnis des Mechanismus dieser redoxgetriebenen Protonenpumpe. Versuche dieses Membranprotein als Ganzes zu kristallisieren schlugen bislang fehl. Es wird deshalb versucht, den Membranarm und den peripheren Arm des Komplex I getrennt zu kristallisieren. Vermutlich sind diese einfacher zu kristallisieren, da sie jeweils nur die Hälfte der Masse des gesamten Komplex I haben. Der periphere Arm wurde bisher für die Kristallisation in unserem Institut aus der Mutante *nuo20.9* gewonnen, bei der nach Ausschalten der membranständigen 20.9 kDa-Untereinheit nur der periphere Arm gebildet wird. Der periphere Arm der Mutante wurde in einer aufwändigen Präparation über die Schritte Zuckergradientenzentrifugation, Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Größenausschlusschromatographie gereinigt, der sich aber in Bezug auf Ausbeute und proteolytische Empfindlichkeit als für die Kristallisation wenig geeignet erwies (Kintscher, 2002). In Rahmen dieser Arbeit sollte für eine spätere Kristallisation ein alternatives Aufreinigungsverfahren des peripheren Arms entwickelt werden, um diesen schneller und mit höherer Ausbeute zu erhalten. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt:

Zum einen sollte der periphere Arm aus der Mutante *nuo20.9* mit einem His-Tag versehen und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die zum peripheren Arm gehörenden 78 kDa-, 51 kDa-, 49 kDa- und 40 kDa-Untereinheiten erwiesen als nicht geeignet für die Affinitätsmarkierung, da der His-Tag wahrscheinlich im Innern des Protein verborgen lag (Ailyati, Frank Fischer, Gerd Heimlich, Shabnam Shalapour, Diplomarbeiten; Andreas Drexler, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die 30.4 kDa-Untereinheit für eine Affinitätsmarkierung geeignet ist. Diese Untereinheit war bereits erfolgreich für die Affinitätsmarkierung von Komplex I in *Yarrowia lipolytica* verwendet worden (Kashani-Poor *et al.*, 2001). Zum andern sollte der periphere Arm durch Spaltung des Komplex I mit dem chaotropen Salz Kaliumrhodanid für eine spätere Kristallisation gewonnen werden. Ein durch Rhodanid-Spaltung erzeugter Membranarm wird bereits in unserem Institut für die

Kristallisation eingesetzt.

3. Material und Methoden

3.1 Lösungen, Puffer und Medien

DNA-Probenpuffer 5x :
50 % (v/v) Glycerin
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
445 mM Tris-Borat, pH 8,3

Protein-Probenpuffer 5x:
1 M Saccharose
0,2 M TrisAcetat pH 8,8
5 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
7 mM Dithioerytriol (DTE)
5 (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)
0,1 % (w/v) Bromphenolblau

Vogelsmedium:
(Vogel, 1956)
3 g/l Natriumcitrat
5 g/l KH_2PO_4
2 g/l NH_4NO_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 $\mu\text{g/l}$ Biotin
0,1 ml Spurenelementlösung
20 g/l Saccharose
optional 16 g/l Agar
optional 200 mg/l Hygromycin
optional 1,2 g/l Basta

Sorbosemedium:
Vogels Minimalmedium
20 g/l Sorbose
16 g/l Agar

Spurenelementlösung:	50 g/l Citronensäure 50 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4) \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l H_3BO_3 0,5 g/l MnSO_4
Kreuzungsmedium:	1 g/l KNO_3 0,7 g/l KH_2PO_4 0,5 g/l KH_2PO_4 0,5 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/l CaCl_2 0,1 g/l NaCl 5 $\mu\text{g/l}$ Biotin 0,1 ml/l Spurenelementlösung 15 g/l Saccharose 16 g/l Agar
Luria-Broth (LB):	10 g/l Casein-Hydrolysat 5 g/l NaCl 5 g/l Hefe-Extrakt optional 16 g/l Agar
Elektrophoresepuffer:	50 mM Tris 0,4 M Glycin 0,1 % (w/v) SDS
PBS:	130 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM K_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4
PBST:	PBS mit 0,1 % Tween

Topagarose: 0,7 % (w/v) Low Meltung Agarose
20 ml/l 50x Vogelsmedium
1 M Sorbit
20 g/l L-Sorbose
20 g/l Saccharose

Transformationsplatten: 20 ml/l Vogelsmedium
1 M Sorbit
20 g/l L-Sorbose
20 g/l Saccharose
16 g/l Agar
1,2 g/l Basta

Westernblot-Puffer: 0,25 M Tris pH 8,3
250 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS
20 % Methanol

Resuspensionspuffer: 50 mM TrisCl pH 8.0
10 mM EDTA
100 µg/ml Rnase A

Lysispuffer: 200 mM NaOH
1 % SDS (w/v)

Neutralisationspuffer: 3.0 M Kaliumacetat pH 5.5

3.2 Mikroorganismen, Vektoren und Oligonukleotide

Mikroorganismen

<i>E. coli</i>	DH5 α (Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i>	BNN 132 (Elledge <i>et al.</i> , 1991)
<i>N. crassa</i>	Wildtyp SL 74 OR23 1A (FGSC 987)
<i>N. crassa</i>	Mutante <i>nuo20.9</i> (Krüll, 1995)
<i>N. crassa</i>	Mutante <i>nuo30.4</i> (Videira <i>et al.</i> , 1990c)

Vektoren

p19EBF (zur Verfügung gestellt von A. Drexler, 2002)

pN20.9H (zur Verfügung gestellt von C. Krüll, 1995)

Oligonukleotide

Die fett gedruckten Basen zeigen die *Not* I-Schnittstelle, die kursiv gekennzeichneten Basen zeigen die *Eco*RI-Schnittstelle Die den His-Tag codierenden Basen sind mit einem Unterstrich markiert.

P30.4/1 : 5' - aag**cggccg**catggccagcaagctctgcagaa - 3'

P30.4/2 : 5' – aaga**att**cttaatggtggtggtggtggcttcttctcctccggcttcgctccgg - 3'

3.3 Anzucht von Mikroorganismen

E. coli: Zur Anzucht von *E. coli* wurden 4 ml LB- bzw LB/Amp- Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Diese Übernachtskulturen wurden zum Animpfen größerer Kulturen, zur analytischen Plasmidisolierung oder zum Anlegen von Stammkulturen verwendet. Stammkulturen wurden in 50 % (v/v) Glycerin bei -71 °C gelagert.

N. crassa: Zur Gewinnung von *N. crassa*-Makrokonidien wurden 3 ml Schrägagarröhrchen oder 300 ml-Erlenmeyerkolben mit Vogelsmedium und 1,6 % Agar mit Makrokonidien oder Hyphen angeimpft. Die Kulturen wurden 2-8 Tage unter Belichtung bei 28 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert. Die Anzucht der Hyphen erfolgte über einen Zeitraum von 20 - 40 h bei 28 °C in mit Pressluft belüfteten 8 l-Batchkulturen oder in 100 ml-Schüttelkulturen mit Vogelsmedium (Vogel, 1956; Davies und de Serres, 1970). Die Hyphen wurden jeweils über einen Büchnertrichter abfiltriert, mit Wasser gewaschen und bei -71 °C gelagert. Zur Erzeugung der Doppelmutante *nuo20.9/30.4* wurden Agaroseplatten mit Kreuzungsmedium auf gegenüberliegenden Seiten mit Makrokonidien der Mutanten *nuo20.9* und *nuo30.4* angeimpft und 14 Tage im Dunkeln bei 25 °C und anschließend für 10 Tage bei 28 °C unter Belichtung auf dem Deckel liegend inkubiert. Die in den Deckel der Petrischale gefallenen Ascosporen wurden in 1 ml sterilen Wasser aufgenommen, durch Ausstreichen auf Sorboseplatten vereinzelt und 2-4 h bei 60 °C aktiviert. Nachdem die Kulturen 2 - 4 Tage bei 28 °C inkubiert worden waren, wurden die einzelnen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher auf Schrägagarröhrchen mit Hygromycin überführt. Zur Erzeugung von Mikrokonidien wurden mit Cellophanfolie (Modell 224 Gel Slab Dryer) abgedeckte Iodacetat-Platten verwendet. Die Iodacetat-Platten wurden durch Durchstechen der Cellophanfolie mit einer Impföse angeimpft und anschließend 7 Tage im Dunkeln bei 24 °C inkubiert. Nach Abziehen der Folie wurden die Platten 24 h bei 24 °C inkubiert und die Makro- und Mikrokonidien durch Abspülen der Platten mit 2 ml Bidest aufgenommen. Die Makrokonidien wurden durch einen Filter mit 5 µm-Porengröße (Minisart, 5.00 µm, Fa. Sartorius) von dem Mikrokonidien getrennt. Jeweils 300 Mikrokonidien wurden auf Sorboseplatten ausgestrichen.

3.4 Analytische Mitochondrienpräparation

Die Mitochondrienpräparation erfolgte bei 4 °C. 2–3 g Hyphen aus einer 100 ml-Flüssigkultur wurden mit 5 ml Isolationspuffer (15 % (w/v) Saccharose, 50 mM TrisCl pH 7,5, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF) im Mörser zerrieben. Das Homogenisat wurde in ein 70 ml-Kügelmühlengefäß mit 15 ml Glasperlen gegeben, mit

Isolationspuffer auf 50 ml aufgefüllt und 10 s in der Kugelmühle aufgeschlossen. Um Zellreste abzutrennen wurde der Aufschluß 5 min bei 2500 g (5.000 rpm, Rotor 8.24, Kühlzentrifuge Centricon H-401 Fa. Kontron) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation für 20 min bei 17.000 g (13.000 rpm, Rotor 8.24, Kühlzentrifuge Centricon H-401 Fa. Kontron) sedimentiert. Das Sediment wurde in 500 µl Isolationspuffer aufgenommen und für die Western-Blot-Analyse eingesetzt.

3.5 Präparation der Mitochondrienmembran aus *N. crassa*

Die Präparation der Mitochondrienmembran erfolgte nach Weiss *et al.* (1970). Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. 800 g tiefgefrorene Hyphen wurden mit einem Hammer grob zerkleinert und mit 5 l Isolationspuffer in einem Küchenmixer (Fa. Braun) homogenisiert. Das Aufschließen der Hyphen erfolgte durch Mahlen in einer Korundmühle. Zur Hemmung von Proteasen wurde in der Suspension eine Endkonzentration von 0.1 mM des Proteasehemmers Phenylmethylsulfonylchlorid (PMSF) eingestellt. Zellkerne und Hyphenwände wurden durch eine 10 min Zentrifugation bei 6000 g (4500 rpm, Rotor H6000A, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Fa. Sorvall) sedimentiert. Die Mitochondrien wurden 100 min bei 12.000 g (7.500 rpm, 4 °C, Rotor SLC-6000, Kühlzentrifuge Evolution RC, Fa. Kendro Sorvall) sedimentiert. Das Mitochondriensediment wurde mit Puffer aus 0,3 M NaCl und 50 mM TrisCl pH 8,0 auf 500 ml aufgefüllt, in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator resuspendiert und in einer French Press (Fa. SLM, Amincon) bei 1100 psi aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Kühlzentrifuge Centricon H-401, Fa. Kontron) abgetrennt. Durch eine 2 h-Zentrifugation bei 175.000 g (50.000 rpm, Rotor 60 Ti, Ultrazentrifuge Discovery 90SE, Fa. Sorvall) wurden die Mitochondrienmembranen von der Matrix getrennt. Das Sediment, 15 – 20 g Feuchtmasse, wurde bei - 71 °C gelagert.

3.6 Isolierung des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit KSCN

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine wurden in einem Teflon-in-Glas Homogenisator 15 g Membranediment von *N. crassa* Wildtyp mit 30 ml 7,5 % Octyl- β -D-Glucopyranosid (Octylglycosid, Fa. Calbiochem) in 50 mM Tris/HCl pH 8.0 homogenisiert und nicht-solubilisiertes Protein mit einer 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor 8.24, Kühlzentrifuge Centricon H-401 Fa. Kontron) abgetrennt. Der Überstand wurde auf sechs 36 ml Zuckergradienten aus 15 – 30 % Saccharose, 0,7 – 0,05 % n-Dodecyl- β -D-maltosid (Dodecylmaltosid, Fa. Glycon), 50 mM TrisCl pH 8,0 verteilt und 22 h bei 150.000 g (30.000 g, Rotor 630Ti, Ultrazentrifuge Discocery 90SE, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Auspumpen unter gleichzeitiger Messung der Absorption bei 280 nm mit einem Durchfluß-Diodenarray-Spektrometer (Fa. J & M Analysetechnik Aalen) in 1-ml Fraktionen portioniert und diese auf NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität untersucht. Alle Fraktionen bis herab zur halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration über einer Diaflo-Membran XM-300 (d=7,6 cm) in einer Amicon-Kammer (Vol= 50 ml) bei 4 bar auf 18 ml eingengt. Der Zucker wurde durch Zugabe von zweimal 20 ml 0,05 % Dodecylmaltosid, 50 mM TrisCl pH 8,0 und nachfolgende Ultrafiltration weitgehend entfernt. Die konzentrierte Komplex I-Lösung wurde durch Zugabe von festem KSCN auf 0,2 M KSCN eingestellt und auf sechs 36 ml-Zuckergradienten aus 15 – 30 % Saccharose, 0,1 % Lubrol, 0,2 M KSCN, 50 mM TrisCl pH 8,0 verteilt und 22 h bei 150.000 g (30.000 g, Rotor 630Ti, Ultrazentrifuge Discocery 90SE, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Auspumpen unter gleichzeitiger Messung der Absorption bei 280 nm in 1 ml-Fraktionen portioniert. Nach Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität wurden die Fraktionen mit peripherem Arm in einer Druckfiltrationskammer konzentriert, dreimal mit 0,1 M NaCl, 0,1 % Lubrol, 50 mM TrisCl pH 8,0 aufgefüllt und anschließend auf eine 10 ml-Source 15Q-Säule (Fa. Pharmacia Biotech) gepumpt. Die Säule war mit 0,1 M NaCl, 0,1 % Lubrol, 50 mM TrisCl pH 8,0 äquilibriert worden. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 20 ml 0,1 M NaCl, 0,1 % Lubrol, 50 mM TrisCl pH 8,0 gewaschen und das Protein mit 100 ml 0,1 – 0,4 NaCl, 0,1 % Lubrol, 50 mM TrisCl pH 8,0 eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml-

Fraktionen gesammelt und die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität der einzelnen Fraktionen bestimmt.

3. 7 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der *N. crassa*-Mutante *nuo20.9*

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. In einem Teflon-in-Glas Homogenisator wurden zur Solubilisierung der membranassoziierten Proteine 15 g Membransediment der Mutante *nuo20.9* mit 25 ml 8 % Lubrol (w/v) (ein Alkylethylenglycoether C₁₆E_{ca.9}; Fa. ICN Biochemicals Inc) homogenisiert und 30 min unter Rühren inkubiert. Nicht solubilisiertes Protein wurde durch eine 30 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centricon Kühlzentrifuge H-401, Kontron) abgetrennt. Der Überstand wurde auf 36 ml-Zuckergradienten aus 10–30 % Saccharose, 50 mM TrisCl pH 7,5 verteilt und 22 h bei 150.000 g (30.000 g, Rotor 630Ti, Ultrazentrifuge Discovery 90SE, Fa. Sorvall) zentrifugiert. Die Gradienten wurden durch Auspumpen unter gleichzeitiger Messung der Absorption bei 280 nm in 2 ml-Fraktionen portioniert und diese auf NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität untersucht. Alle Fraktionen bis herab zur halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt und auf eine 10 ml-Source 15Q-Säule (Fa. Pharmacia Biotech) Säule aufgetragen, welche mit 50 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 äquilibriert worden war. Nach dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 20 ml 50 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 gewaschen und das Protein mit 100 ml 50-350 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 eluiert. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen portioniert und auf NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität untersucht. Alle Fraktionen bis herab zur halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt und schrittweise mit Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 40 % gebracht. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C wurden die ausgefallenen Proteine 15 min bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor 8.24, Kühlzentrifuge Centricon H-401, Fa. Kontron) sedimentiert. Das sedimentierte Protein wurde in 3 ml 50 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 gelöst und die 40 % Ammoniumsulfatfällung wiederholt. Das Sediment wurde in 0,8 ml 50 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 aufgenommen. Es folgte eine Grössenausschußchromatographie über eine Sephacryl S300-Säule (d= 1 cm; h= 48 cm; V= 38 ml) die zuvor mit 50 mM NaCl, 50 mM TrisCl pH 8,0 äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/h und das Eluat wurde in 0,5 ml Fraktionen

gesammelt. Von den Fraktionen wurde die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt und bis herab zur halbmaximalen Aktivität vereinigt.

3.8 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der *N. crassa*-Mutante *nuo20.9/30.4his*

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur Solubilisierung der Membranproteine wurden 15 g Membransuspension der Mutante *nuo20.9/30.4his* mit 21 ml 8 % (w/v) Lubrol (ein Alkylethylenglycolether C₁₆E_{ca.9}; Fa. ICN Biochemicals) in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator vermischt und 30 min unter Rühren inkubiert. Lipide und membranintegrale Proteine wurden durch 60 min Zentrifugation bei 50.000 g (20.000 rpm, Rotor A 8.24, Centricon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) abgetrennt. Der Überstand wurde mit dem fünffachen Volumen 250 mM NaCl, 30 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄ pH 8.0 versetzt. Der verdünnte Extrakt wurde mit 15 ml Ni-NTA-Superflow (Fa. Quiagen) versetzt, welches zuvor mit 250 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 äquilibriert worden war, und 16 h auf dem Rollenschüttler inkubiert. Das Ni-NTA-Superflow-Material wurde in eine Säule gepackt, und mit 150 ml 250 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 gewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 25 mM-250 mM Imidazol in 250 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄ pH 8.0 mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.8 ml/min. Das Eluat wurde in 0.8 ml Fraktionen gesammelt und auf NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität untersucht. Die Fraktionen mit mehr als der halbmaximalen Aktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration über einer Diaflo XM-300 Membran (d=4.5 cm) in einer Amicon-Kammer (Vol= 50 ml) bei 4 bar auf 1 ml eingeeengt. Die konzentrierte Lösung wurde durch eine Sephacryl Säule S 300 (d= 1 cm, h= 47 cm, 37 ml) gefiltert, die vorher mit 20 mM NaH₂PO₄ pH 8,0 äquilibriert wurde. Die Elution erfolgte mit einer Flussgeschwindigkeit von 5 ml/h. Das Eluat wurde in 0.5 ml Fraktionen gesammelt, die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität bestimmt und die Fraktionen mit größer als der halbmaximalen Aktivität vereinigt.

3.9 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden

Plasmidpräparation: Die analytische Plasmidisolierung erfolgte nach dem Verfahren der alkalischen Lyse. 3 ml LB/Amp-Medium wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden 1 min bei 10.000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 250 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Dann wurden 250 µl Lysepuffer zugegeben, die Suspension vermischt und 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Neutralisationspuffer wurde die Suspension erneut durchmischt, 5 min inkubiert, 5 min bei 6.000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde mit 750 µl eines Gemischs von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:25:1) versetzt, geschüttelt und 5 min bei 15.000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) zentrifugiert. Nach wiederholter Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die wässrige, das Plasmid enthaltene Phase mit 75 µl 5 M NaCl versetzt und die Plasmid-DNA mit 1,5 ml Ethanol gefällt. Der Ansatz wurde geschüttelt und 10 min inkubiert. Dann wurde die Plasmid-DNA durch 10 min Zentrifugation 15.000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) sedimentiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

Vermehrung der cDNA-Bank λ AD5: Die exprimierende *N. crassa* cDNA-Genbibliothek λ AD5 wurde zur Infektion des cre-Rekombinase produzierenden *E. coli* Stammes BNN 132 verwendet. Nach Anzucht der Kultur über Nacht in 100 ml LB, 10 mM MgSO₄, 0,2 % Maltose unter Schütteln bei 30 °C, wurden die Bakterien bei 6.000 g (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) sedimentiert und zu einer OD₆₀₀ von 1,0 in 10 mM MgSO₄ resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde mit 10⁸ Pagen bei 30 °C 30 min infiziert und dann nach Zugabe von 2 ml LB bei 30 °C 1 h geschüttelt. Zur Bestimmung der Infektionseffizienz wurde ein Aliquot der Suspension auf einer LB-Platte mit der halben üblichen Ampicilinkonzentration angezogen. Die anschließende Plasmidisolation wurde mit dem Qiagen Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Agarosegelelektrophorese: Abhängig von der DNA-Fragmentgröße wurden bei analytischen Gelen 0,5-1 % Agarosegele (w/v) in 0.5 TBE und 500 µg/l Ethidiumbromid bei einer Spannung von 2 – 8 V/cm verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die

DNA-Fragmente wurden durch UV-Fluoreszenz des Ethidiumbromid-Komplexes bei 254 nm sichtbar gemacht. Bei präparativen Gelen wurden nach elektrophoretischer Trennung von 5–20 µg DNA die Gelbereiche der zu isolierenden Fragmente mit einem Skalpell herausgeschnitten und die DNA mit dem Qiagen Kit II (Fa. Qiagen) nach Herstellervorschrift isoliert.

Restriktion und Ligation: Restriktionsverdau von 0,2–2 µg Plasmid-DNA wurden in 20 µl Gesamtvolumen mit 5 – 10 U Restriktionsenzym für 1–4 h gespalten. Größere Mengen DNA wurden in 100 µl Gesamtvolumen mit 5– 10 U Restriktionsenzym pro µg DNA für 1–4 h verdaut. Zur Ligation wurden linearisierte DNA-Fragmente in einem Verhältnis 3:1 Insert zu Vektor eingesetzt. Die Ligation erfolgte in 10–20 µl Ligationspuffer und 1 U T4-DNA. Die Ligation wurde 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur durchgeführt.

Phosphorylierung: Zur Phosphorylierung wurde das DNA-Fragment in der entsprechenden Menge Polynukleotidkinase-Puffer aufgenommen, mit 1 U T4 Polynukleotidkinase (PNK, Pharmacia) pro 50 pmol 5'-Enden bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt (Sambrook *et al.*, 1989).

Transformation von *E. coli*: Zur Herstellung kompetenter Zellen. wurden die Bakterien in 80 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Zellen wurden 15 min auf Eis inkubiert, anschließend 5 min bei 2500 g (5.000 rpm, Rotor A 8.24, Centricon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Konton) abzentrifugiert, dreimal mit kaltem, sterilem bidestilliertem Wasser gewaschen und in dem 1,5 fachen Eigenvolumen aufgenommen. 60 µl der Bakteriensuspension wurden mit 10-30 ng Plasmid-DNA versetzt und 5 ms mit 1700 V behandelt. Unmittelbar nach dem Stromstoß wurden die Zellen in 450 µl LB-Medium aufgenommen und 60 min bei 37 °C inkubiert. Die transformierten Zellen wurden kurz abzentrifugiert, in 200 µl sterilen Wasser resuspendiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation von *N. crassa*: Makrokonidien wurden für die Transformation in 300-ml Erlenmeyerkolben auf 50 ml Agarboden 5 Tage im Dunkeln und 3 Tage unter

Belichtung bei 28 – 30 °C angezogen. Makrokonidien von zwei Agarböden wurden mit je 10 ml 1 M Sorbit suspendiert und über Glaswolle abfiltriert. Die Konidien wurden durch 5 min Zentrifugation bei 2000 g (5.000 rpm, Rotor A 8.24, Centricon Kühlzentrifuge H-401, Fa. Kontron) sedimentiert und in 1 M Sorbit aufgenommen, so dass die Konzentration der Konidien $6 \cdot 10^8$ pro ml betrug. Die Zellwände wurden mit 20 mg/ml Lysing Enzymes über 2 h bei 28 °C unter leichten 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 auf $2 \cdot 10^8$ pro ml eingestellt. Je 400 µl dieser Protoplastensuspension wurden mit 4 µg DNA für 20 min auf Eis inkubiert und dreimal im Abstand von je 1 min elektroporiert (750 V, $\tau = 250 \mu\text{s}$, Eppendorf Multiporator). Nach 20 min Inkubation auf Eis wurde 1 ml Vogels-Medium mit 1 M Sorbit zugegeben und mindestens 1 h bei 28 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Transformationsansätze mit 10 ml Topagarose gemischt und auf Transformationsplatten mit 1,2 g/l Basta ausplattiert. Nachdem die Platten über 3–7 Tage bei 28 °C inkubiert worden waren, wurden die Transformanten mit einem sterilen Zahnstocher auf Schrägagarrröhrchen mit BASTA übertragen.

Polymerasekettenreaktion: Die zur Mutagenese notwendigen Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech geliefert und durch T4 Polynukleotidkinase (PNK, Fa. Pharmacia) nach Herstellerangaben phosphoryliert. Das ExSite™ PCR-Based Site-Directed Mutagenesis Kit (Statagene) wurde zur Mutagenese eingesetzt. Die PCR-Reaktion wurde mit einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin-Elmer) in einem Gesamtvolumen von 50 µl in dünnwandigen Reaktionsgefäßen durchgeführt. Nachdem je 100 pmol Oligonukleotid-Primer, 100 – 200 ng DNA als Matrize, 0,2 mM dNPT`s und PCR-Puffer vermischt worden waren, wurde 1 µl Polymerase (Böhringer Polymerase Mix) zugegeben und der Ansatz bei 95 °C denaturiert. Es wurden 30 Zyklen mit 10 Sekunden für die DNA-Denaturierung und 30 Sekunden bei 65 °C für die Primerhybridisierung durchgeführt. In den ersten 10 Zyklen betrug die Elongationszeit 60 Sekunden bei 60 °C. Bei den folgenden Schritten wurde die Elongationsdauer um 20 Sekunden erhöht. Zum Abschluß der DNA-Synthese folgten 5 Minuten Inkubation bei 68 °C. Die amplifizierte DNA wurde bei präparativen Ansätzen aus einem 0,8 % Agarosegel mit dem PCR-Purification Kit (Fa. Quiagen, Hilden) isoliert.

3.10 Verschiedene analytische Methoden

Proteinbestimmung: Die Proteinbestimmung erfolgte mit der Biuret-Methode (Beisenherz *et al.*, 1953). Zur Herstellung einer Eichgeraden wurde eine Stammlösung von 10 mg/ml Rinderserumalbumin verwendet. Nachdem die Probe 10-30 Minuten mit 1 ml 6%iger Trichloressigsäure auf Eis inkubiert worden war, wurde das ausgefallene Protein mit einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Zugabe von 1 ml Biuret-Reagent aus 0,5 % K-Na-Tartrat, 0,3 % $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, 0,5 % KJ und 0,2 N NaOH wurde 30 min geschüttelt und erneut zentrifugiert. Die Extinktion der Probe wurde bei 546 nm bestimmt. Nach Zerstörung des Farbkomplexes durch einige Körnchen Kaliumcyanid wurde erneut die Extinktion bei 546 nm gemessen und vom ersten Wert abgezogen. Bei geringen Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) angewandt. Mit 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin-Stammlösung wurde eine Eichgerade erstellt. Die Probe wurde mit Wasser auf 100 μl aufgefüllt und 1 ml Kupfer-Reagenz zugegeben. Nach 10 min Schütteln wurden 50 μl Folin-Reagenz (Fa. Merck) hinzugegeben und nach mindestens 30 und spätestens 60 Minuten die Extinktion bei 750 nm gemessen.

Bestimmung der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität: Die enzymatische Aktivität von Komplex I wurde mit der NADH/Ferricyanid-Methode bestimmt. Die Reduktion von Ferricyanid in 1 ml einer Lösung aus 50 mM TrisCl pH 7,5, 0,1 % Triton X-100, 1 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 0,1 mM NADH durch 2-10 μl Probenlösung wurde durch Messung der Extinktionsänderung bei 410 nm bestimmt. Zur Auswertung wurde der molare Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet (Friedrich *et al.*, 1989).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Die Proben wurden mit 1/4 ihres Volumens mit Probenpuffer versetzt und auf ein 16 %iges diskontinuierliches Polyacrylamidgel aufgetragen (Lämmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte 16-18 h bei einer Spannung von 180 V mit einem Elektrophoesebuffer aus 0,4 M Glycin, 0,05 % TrisAcetat pH 8,3, 0,1 % SDS. Nach vier Stunden einfärben der Proteinbanden mit 0,1 % (w/v) Coomassie-Blue R-250 in 25 % Isopropanol und 10 % Essigsäure wurden die Gele in 12,5 % Isopropanol und 10 % Essigsäure entfärbt.

Western-Blot-Analyse: 400 µg Mitochondrienprotein wurden durch SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt und in einer Tank-Blot-Apparatur in Blotpuffer auf Cellulosenitratmembranen bei 4 °C und 1 mA cm² für 3 h transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Die Membran wurde 1 h in PBS mit 3 % (w/v) Magermilchpulver geschwenkt, 5 min mit PBST gewaschen und dann 2–4 h mit einem polyklonalen Antiserum gegen die 30,4 kDa-Untereinheit in einer Verdünnung von 1:1000 in PBST mit 3 % (w/v) Rinderserum inkubiert. Dann wurde die Membran viermal 5 min mit PBST gewaschen und anschließend 1-2 h mit 0,5 µg/ml verdünntem Protein A-Meerrettichperoxidase-Konjugat (Zymed) in Kontakt gebracht. Nach jeweils zweimal 5 min waschen mit PBS und Natriumphosphatpuffer pH 7,4 wurden die Proteinbanden mit 0,05 % (w/v) 3,3'-Diaminobenzidin, 0,03 % (w/v) NiSO₄, 0,03 % (w/v) CoSO₄, 0,1 % (v/v) H₂O₂ gefärbt (De Blas *et al.*, 1983).

3.11 Massenspektrometrie und Sequenzanalyse

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden nach tryptischen Verdau der zu untersuchenden Proteine an einem MALDI-TOF Massenspektrometer (Voyager DE-Pro, Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Das Protein wurde mittels des Programms MASCOT in den Genbank/NCBI Datenbanken identifiziert (www.ncbi.nlm.nih.gov). Die Sekundärstruktur von Proteinen wurde nach Rost *et al.*, 1995 unter <http://npsa-pbil.ibcp.fr> auf Transmembranhelices untersucht.

4. Ergebnisse

4.1 Isolierung des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit KSCN

Zunächst wurde Komplex I aus *N. crassa* durch Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine mit Octylglycosid und Zuckergradientenzentrifugation in Decylmaltosid-haltigem Puffer isoliert (Abbildung 5). Anschließend wurde der Komplex I mit Kaliumrhodanid (KSCN) gespalten und der periphere Arm durch erneute Zuckergradientenzentrifugation in Anwesenheit von KSCN und Lubrol durch Anionenaustauschchromatographie in Lubrol-haltigen Puffern gewonnen. In Abbildung 6 ist das Sedimentationsprofil der Zuckergradientenzentrifugation in KSCN und in Abbildung 7 das Elutionsprofil der abschließenden Chromatographie dargestellt. Ausgehend von 800 g Hyphen wurden 2 mg des peripheren Arms erhalten. Die Reinheit des peripheren Arms wurde auf der Grundlage des SDS-PAGE-Musters auf etwa 95 % geschätzt.

Bei der Spaltung des Komplex I durch KSCN und der anschließenden Zuckergradientenzentrifugation wurde eine KSCN-Konzentration von 180 mM eingestellt. Diese Konzentration ist ein Kompromiss zwischen möglichst vollständiger Spaltung des Komplex I und möglichst geringem Zerfall des peripheren Arms. Die Spaltprodukte Membranarm und peripherer Arm wurden durch Zuckergradientenzentrifugation von ungespaltenen Komplex I getrennt. Dabei sedimentierte der Komplex I schneller als der Membranarm und der periphere Arm, was an den beiden Proteingipfeln und Aktivitäten im mittleren Bereich des Sedimentationsprofils erkennbar ist. Die Polypeptidzusammensetzung der beiden Gipfel unterscheidet sich nicht, da Membranarm und peripherer Arm zusammen das Polypeptidmuster des Komplex I ergeben.

Membranarm und peripherer Arm wurden anschließend durch Anionenaustauschchromatographie getrennt. Der Membranarm eluierte bei 100 mM NaCl, der periphere Arm bei 180 mM. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte.

Tabelle 2: Isolation des peripheren Arms durch Spaltung des Wildtyp Komplex I mit KSCN. Die Präparation wurde mit 800 g Hyphen (Feuchtmasse) durchgeführt.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität		
			gesamt [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	spezifisch [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$]	Ausbeute [%]
Octylglycosidextrakt	36	n.d.	3800	n.d	100
Zuckergradienten- zentrifugation	51	60	2200	36	57
Zuckergradientenzen- trifugation mit KSCN	18	14	250	18	6
Ionenaustausch- chromatographie	3	2	120	60	2

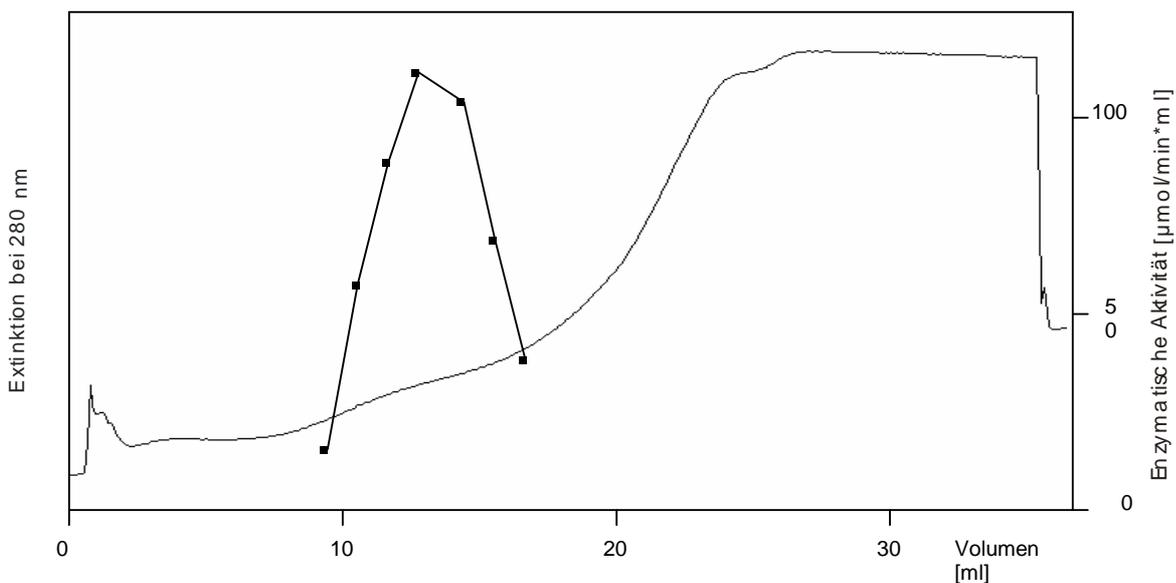


Abbildung 5: Zuckergradientenzentrifugation der mit Octylglycosid solubilisierten mitochondrialen Membranproteine. Extinktion bei 280 nm (—), die NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität (■—■). Das Volumen 0 ml entspricht dem unteren Ende des Gradienten und das von 36 ml dem Oberen. Der Komplex I sedimentiert bei 12 ml.

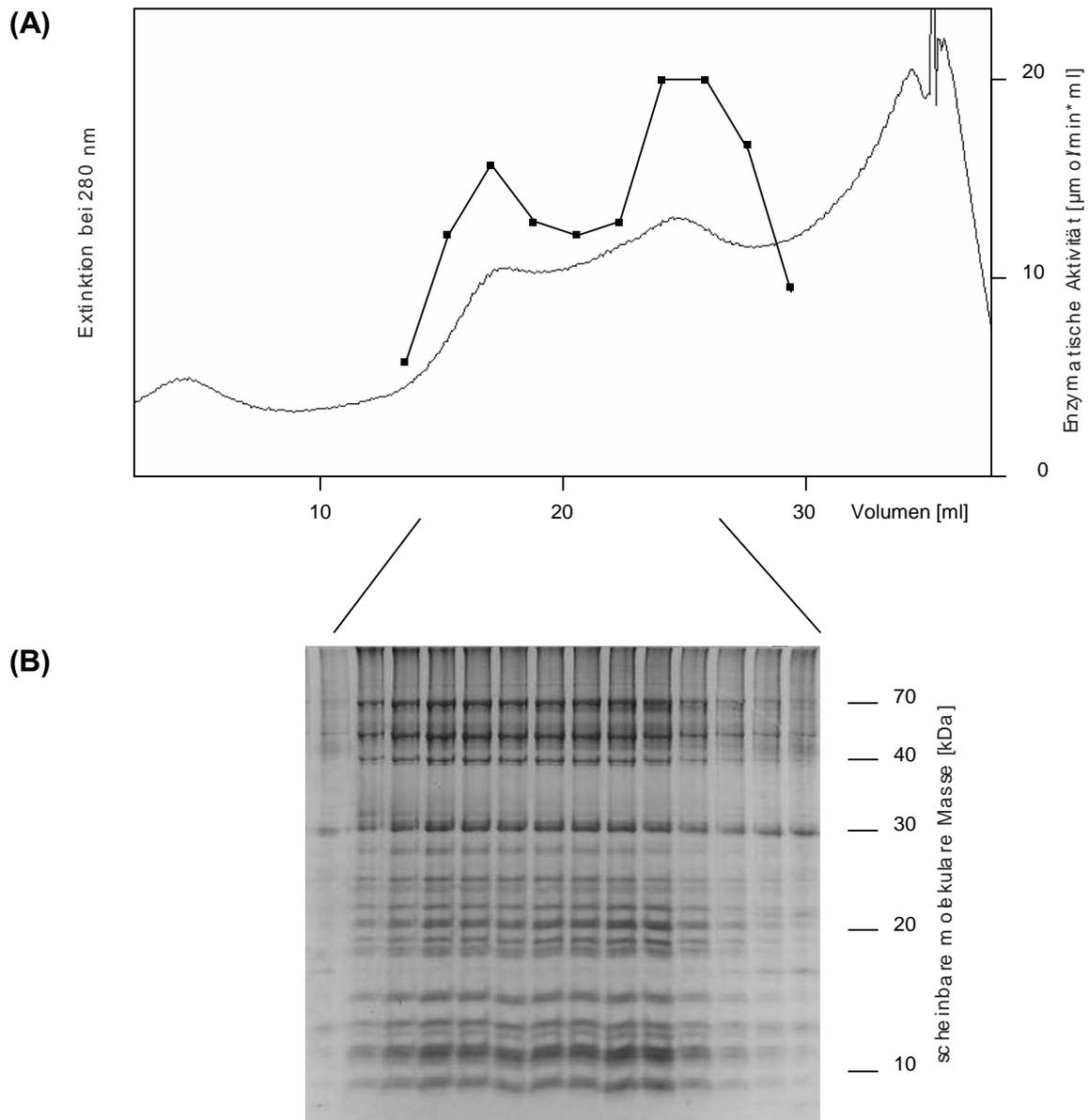


Abbildung 6: Sedimentationsprofil der Zuckergradientenzentrifugation nach Spaltung des Komplex I mit KSCN. (A) Extinktion bei 280 nm (—), NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität (■—■). Das Volumen 0 ml entspricht dem unteren Ende des Gradienten und das von 36 ml dem Oberen. Ungespaltener Komplex I sedimentiert bei 18 ml, Membranarm und peripherer Arm sedimentieren bei 26 ml. (B) Polypeptidzusammensetzung der entsprechenden Fraktionen des Zuckergradienten nach SDS-PAGE.

Das Polypeptidmuster des peripheren Arms war nicht einheitlich. So fehlte in einigen Präparationen die 18.4 kDa-Untereinheit. Einen Vergleich des Peptidmusters verschiedener Präparationen zeigt Abbildung 8.

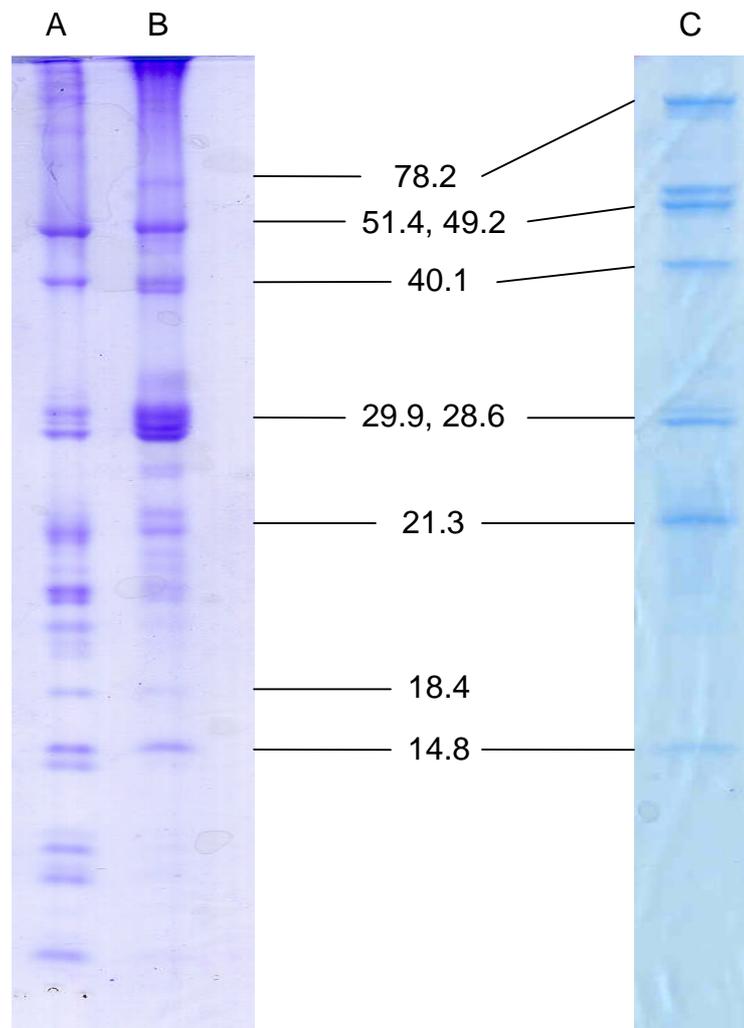


Abbildung 8: SDS-PAGE von Komplex I (A) und des durch Spaltung mit Rhodanid erzeugten peripheren Arms aus verschiedenen Präparationen (B) und (C). Die Zahlen geben die Molmassen in kDa an

4.1.1 Massenspektrometrische Bestimmung der Untereinheitenzusammensetzung des durch Rhodanid-Spaltung erzeugten peripheren Arms

Der durch KSCN-Spaltung von Komplex I erhaltene periphere Arm war im Gegensatz zu dem peripherem Arm aus der Mutante *nuo20.9* nur in Anwesenheit von Detergenz löslich. Wurde die Ionenaustauschchromatographie ohne Detergenz durchgeführt eluierte kein peripherer Arm. Untereinheiten des peripheren Arms mit Molmassen weniger als 40 kDa wurden massenspektrometrisch untersucht, um sie mit dem Programm MASCOT bekannten Genen in genomischen Datenbanken von *N. crassa* zuzuordnen und auf das Vorhandensein von Transmembranhelices zu untersuchen. Die massenspektrometrische Untersuchung erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Fischer am Institut für Biochemie der Pflanzen der Ruhruniversität Bochum. Eine Analyse der Sekundärstrukturen der nachgewiesenen Untereinheiten mit den Molekulargewichten 29.9 kDa, 28.6 kDa, 21.3 kDa, 18.4 kDa und 14.8 kDa nach Rost *et al.*, 1995 ergab jedoch keine Hinweise auf das Vorhandensein von Transmembranhelices.

4.2 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus Mutante *nuo20.9*

Zur Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der Mutante *nuo20.9* wurde der membranassoziierte periphere Arm mit dem milden Detergenz Lubrol, einem Alkylpolyethylenglycolether der Zusammensetzung C₁₆E_{ca.9}, extrahiert und die nicht gelösten membranintegralen Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Der periphere Arm wurde dann durch die Schritte Zuckergradientenzentrifugation, Ionenaustauschchromatographie, Ammoniumsulfatfällung und Grössenausschlusschromatographie in Lubrol-freien Puffern aufgereinigt (Kintscher, 2000). Das Elutionsprofil der abschließenden Grössenausschlusschromatographie ist in Abbildung 9 dargestellt. Ausgehend von 800 g Hyphen wurden 3 mg Protein erhalten. Eine Übersicht über die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte gibt Tabelle 3. Auf der Grundlage des SDS-PAGE-Musters wurde die Reinheit des peripheren Arms in den Gipfelfractionen der Grössenausschlusschromatographie auf 90 % geschätzt.

Tabelle 3: Reinigung des peripheren Arms von Komplex I aus der *N. crassa*-Mutante *nuo20.9*. Die Präparation wurde mit 800 g Hyphen (Feuchtmasse) durchgeführt.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität		
			gesamt [μmol/min]	spezifisch [μmol/min*mg]	Ausbeute [%]
Lubrolextrakt	30	2700	2400	1,5	100
Zuckergradienten- zentrifugation	45	150	1500	10	55
Ionenaustausch- chromatographie	8	18	480	15	20
Ammoniumsulfat- fällung	0,8	n.b.	340	n.b	14
Grössenausschluss- chromatographie	3	3	190	63	8

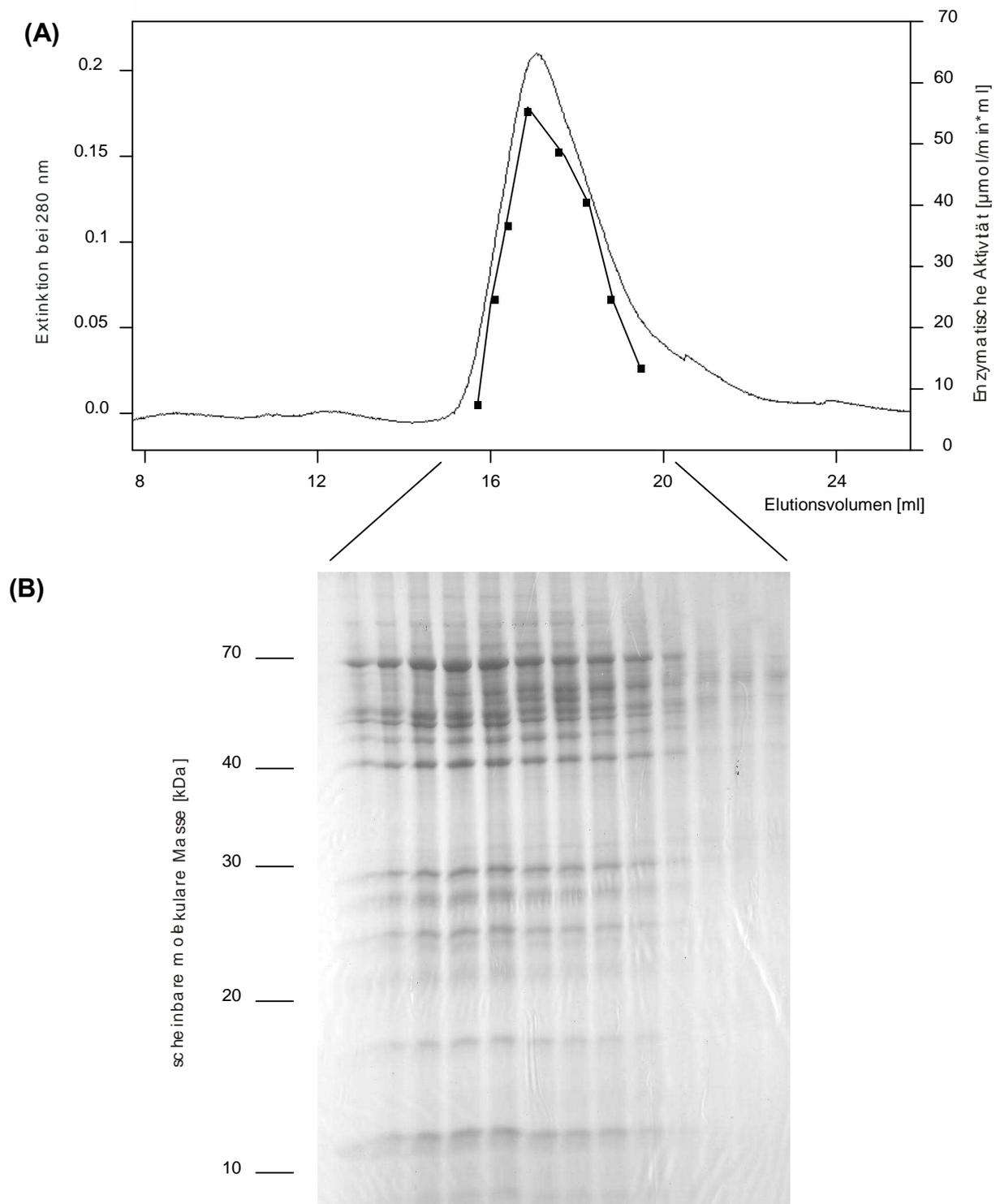


Abbildung 9: Reinigung des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9* durch Grössenausschlußchromatographie. (A) Elutionsprofil bei 280 nm (—), NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität (■—■). (B) Polypeptidzusammensetzung der gekennzeichneten Gipfeltraktionen.

4.3 Erzeugung der Mutante *nuo20.9/30.4his* und Isolierung des affinitätsmarkierten peripheren Arms

4.3.1 Strategie zur Erzeugung der Mutante *nuo20.9/30.4his*

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein peripherer Arm erzeugt werden, dessen 30.4 kDa-Untereinheit mit einer Affinitätsmarkierung versehen ist. Dazu wurde zunächst durch Kreuzung der Einfachmutanten *nuo20.9* (Küffner *et al.*, 1998) und *nuo30.4* (Videira *et al.*, 1990c) die Doppelmutante *nuo20.9/30.4* hergestellt. Da dieser Doppelmutante fehlte sowohl ein Gen einer Untereinheit des Membranarms als auch ein Gen des peripheren Arms fehlt, kommt es weder zur Assemblierung des Membranarms noch des peripheren Arms. Ein Komplementationsvektor aus Promotor, kodierender Sequenz der 30.4 kDa-Untereinheit mit einer His-Tag kodierenden Sequenz am 3'-Ende und einem Selektionsmarker wurde hergestellt und durch heterologe Integration in das Genom dieser Doppelmutante eingebracht. Aus den erhaltenen Transformanten wurde ein Klon, der die 30.4 kDa-Untereinheit exprimiert, ausgewählt.

4.3.2 Erzeugung der Doppelmutante *nuo20.9/30.4*

Die Doppelmutante *nuo20.9/30.4*, wurde durch Kreuzung der beiden Einfachmutanten *nuo20.9* (Küffner *et al.*, 1998) und *nuo30.4* (Videira *et al.*, 1990c) erzeugt. Die erhaltenen Ascosporen wurden auf Sorboseplatten ausplattiert und zu einzelnen Kolonien angezogen. 20 Kolonien wurden auf Schrägagarröhrchen mit dem Antibiotikum Hygromycin überführt, von denen 8 als hygromycinresistent waren. Dies wies auf das Fehlen der 20.9 kDa-Untereinheit hin, da die Deletion des Gens *nuo20.9* mit dem Vorhandensein des *hph*-Gens für die Hygromycinresistenz gekoppelt ist. Das Fehlen der 30.4 kDa-Untereinheit wurde immunochemisch nachgewiesen. Da die Inaktivierung des Gens *nuo30.4* nicht mit einem Selektionsmarker gekoppelt war, wurde das Fehlen der 30.4 kDa-Untereinheit immunochemisch nachgewiesen. Mitochondrien wurden isoliert, ihre Proteine durch ein SDS-PAGE aufgetrennt und

mit Hilfe eines Elektroblobs auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die 30.4 kDa-Untereinheit wurde durch einen Antikörper gegen 30.4 kDa-Untereinheit nachgewiesen. Abbildung 10 zeigt kein Signal mit den Kreuzungsmutanten 2 und 4.

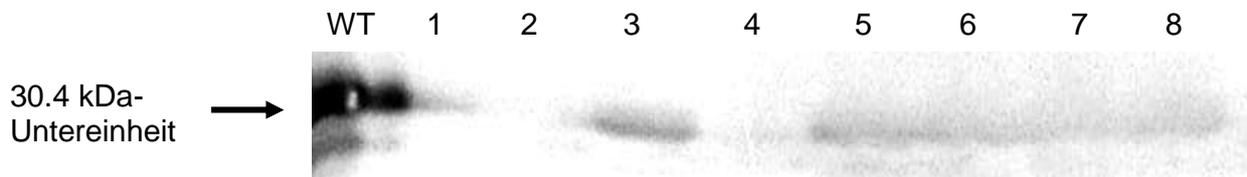


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von Kreuzungsstämmen *nuo20.9xnuo30.4*. Die 30.4 kDa-Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I wurde nach Transfer auf die Nitrocellulose-Membran durch Antikörper markiert. Untersucht wurden die Kreuzungsstämme 1-8, die linke Spur zeigt zum Vergleich die Immundetektion der 30.4 kDa-Untereinheit aus Wildtyp.

4.3.3 Erzeugung des His-Tag Affinitätsvektors zur Komplementation der Mutante *nuo20.9/30.4his*

Die Konstruktion eines Komplementationsvektors, der zur Bildung der 30.4 kDa-Untereinheit von Komplex I mit einem Affinitätstag führt, erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Fischer (Diplomarbeit). Als Quelle für die kodierende Sequenz der Untereinheit wurde die cDNA-Genbank λ AD5 von *N. crassa* verwendet. Der Bakterienstamm BNN 132 wurde mit der Phagenbibliothek infiziert und die DNA als Template für eine PCR verwendet (Brunelli *et al*, 1993). Die Primer P30.4/1 und P30.4/2 ermöglichten die Amplifikation der cDNA der 30.4 kDa-Untereinheit mit einer NotI-Schnittstelle vor dem ATG-Stopcodon, einer den His-Tag kodierenden Sequenz unmittelbar vor dem Stopcodon und einer EcoRI-Schnittstelle hinter dem Stopcodon in einem Schritt. Einen Überblick über die Mutagenesestrategie der 30.4 kDa-Untereinheit gibt Abbildung 11.

Für die Expression wurde die mutierte 30.4 kDa-cDNA in einen Vektor mit einem Promotor der in *N. crassa* erkannt wird und einem Selektionsmarker eingesetzt. In unserem Institut wurde der Expressionsvektor pNGAN2, der die Promotorsequenz des mtACP-Gens aus dem Pilz *Aspergillus niger* und das Gen für die Resistenz des Herbizids Basta enthielt, erfolgreich für die Transformation in *N. crassa* verwendet. Zur besseren Handhabung wurde aus dem 7,2 kBp Plasmid pNGAN2 ein 1,2 kBp EcoRI/BamHI-Fragment in den pUC-19 Vektor überführt, und so das Plasmid p19EBF erzeugt (Drexler, 2002). Das mutierte *nuo30.4* Gen wurde aus zwei Gründen in Zusammenarbeit zunächst mit Frank Fischer (Diplomarbeit, 2002) in den Vektor p19EBF eingesetzt. Erstens enthielt der Vektor Bindestellen für Standard-Sequenzprimer, die das inserierte Gen flankieren, so dass das durch PCR-Mutagenese gewonnene, mutierte *nuo30.4*-Gen einfacher sequenziert werden konnte. Zweitens ist die Klonierung eines kleinen Plasmids leichter durchzuführen. Nach einem Restriktionsschnitt mit den Endonukleasen EcoRI und NotI und der Abtrennung der kleinen Restriktionsfragmente wurde die durch PCR mutierte cDNA der 30.4 kDa-Untereinheit in das Plasmid p19EBF eingesetzt, wobei das Plasmid p19EBF-30.4his entstand.

Aus p19EBF-30.4his wurde dann das EcoRI-BamHI-Fragment ausgeschnitten und gegen das entsprechende EcoRI-BamHI-Fragment in pNGAN2 ausgetauscht. Der so konstruierte Vektor pN30.4his enthielt die vollständige Promotorsequenz, die cDNA der 30.4-kDa Untereinheit und die Sequenz für den His-Tag. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Restriktion mit den Enzymen EcoRV und PstI überprüft (Abbildung 12).

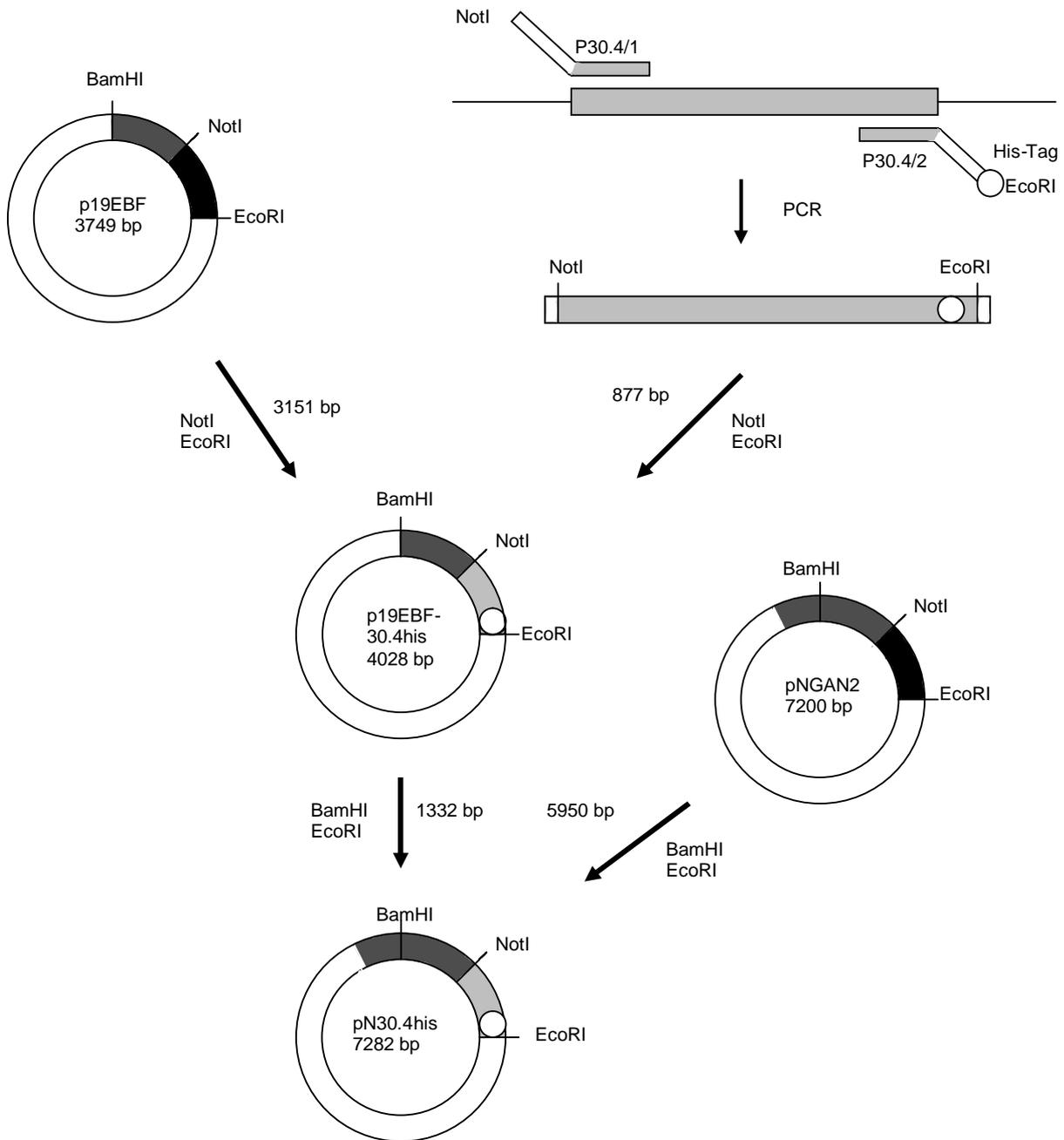


Abbildung 11: Übersicht zur Klonierungs-Strategie der cDNA der 30.4 kDa-Untereinheit und Insertion eines His-Tags. Als Template diente die cDNA der 30.4 kDa-Untereinheit aus der cDNA-Genbank λ AD5. Die Primer P30.4/1 und P30.4/2 ermöglichten die Amplifikation der cDNA mit den NotI- und EcoRI-Schnittstellen und einer His-Tag kodierenden Sequenz. Bei der grau unterlegten Fläche in pNGAN2 handelt es sich um die Promotorsequenz des mtACP-Gens aus *Aspergillus niger*, bei der schwarz unterlegten Fläche in pNGAN2 und p19EBF um die cDNA der 20.9 kDa-Untereinheit. Der Vektor p19EBF enthält das BamHI/EcoRI-Fragment von pNGAN2.

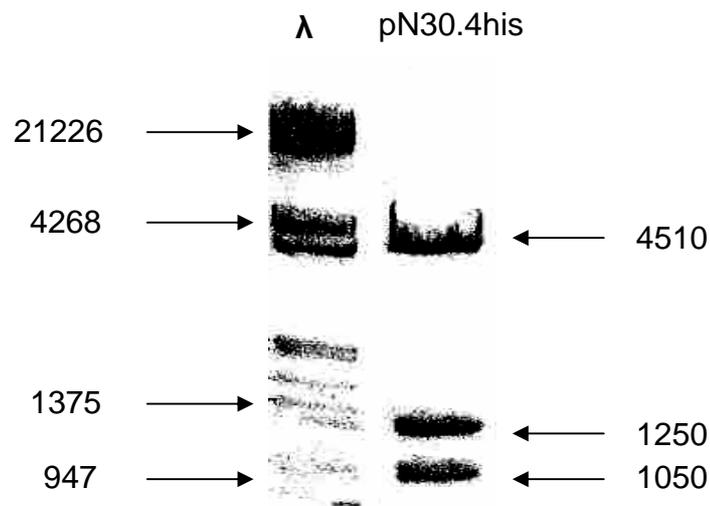


Abbildung 12: Restriktionsanalyse des Expressionsvektors pN30.4his. Spur 1 zeigt den Standard λ -DNA/EcoRI+HindIII. Spur 2 zeigt den von EcoRI und PstI geschnittenen Expressionsvektor.

4.3.4 Transformation der Mutante *nuo20.9/30.4* mit pN30.4his

Um den assemblierten peripheren Arm von Komplex I mit der affinitätsmarkierten 30.4 kDa-Untereinheit zu erhalten, wurde die Doppelmutante *nuo20.9/30.4his* mit dem Plasmid pN30.4his durch Elektroporation transformiert. Transformationsraten von 15-20 pro μg Vektor DNA wurden erreicht. Die transformierten Zellen wurden auf Basta-haltigen Platten angezogen und 30 Kolonien auf Basta-haltige Schrägagarröhrchen überführt. Der Nachweis der Expression der 30.4-kDa Untereinheit erfolgte nach Anzucht der Transformanten in 100 ml Vogelsmedium mit BASTA durch Westernblot. Dazu wurden Mitochondrien isoliert, die mitochondrialen Proteine durch SDS-PAGE getrennt und mit Hilfe eines Elektrolots auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Nachweis der 30.4 kDa-Untereinheit erfolgte durch einen Antikörper, der spezifisch an die 30.4 kDa-Untereinheit bindet. Bei einem der 24 untersuchten Transformanten zeigte sich ein Signal für die 30.4 kDa-Untereinheit (Abbildung 13 A). Von dieser Kultur wurden Mikrokonidien gezüchtet, um einen homokaryoten Stamm zu erhalten, und die 30.4 kDa-Untereinheit wiederum durch Western-Blot nachgewiesen. Von den vier untersuchten Kulturen zeigten sämtliche ein Signal für die

30.4 kDa-Untereinheit (Abbildung 13 B). Kultur 3 wurde zur weiteren Verwendung ausgewählt und als Mutante *nuo20.9/30.4his* bezeichnet

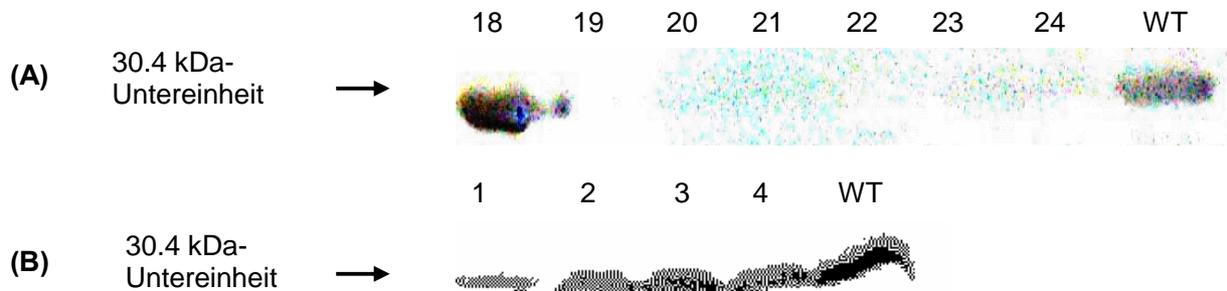


Abbildung 13: Western-Blot des Mitochondrienproteins von transformierten Mutanten *nuo20.9/30.4* (A) und von *nuo20.9/30.4his* nach Bildung von Mikrokonidien (B). Die 30.4 kDa-Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I wurde markiert. Beide Blots zeigen zum Vergleich auf der rechten Spur die 30.4 kDa-Untereinheit aus *N. crassa*-Wildtyp. In (A) zeigt Spur 18 ein Signal für die 30.4 kDa-Untereinheit, in (B) liegt in allen Spuren ein Signal vor.

4.3.5 Affinität des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* für Ni-NTA

Die Affinität des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* für Ni-NTA-Material wurde untersucht. Dazu wurden Mitochondrien isoliert, das mitochondriale Protein durch Lubrol extrahiert und durch Zuckergradienten-Zentrifugation fraktioniert. 1.9 ml des Zuckergradienten mit einer NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität von 60 U wurden in Anwesenheit von 25 mM Imidazol mit 1 ml Ni-NTA-Material inkubiert. Im Eluat wurden 21 U gefunden. In Abbildung 14 ist Polypeptidzusammensetzung des isolierten peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* und des Komplex I aus *N. crassa*-Wildtyp gegenübergestellt.

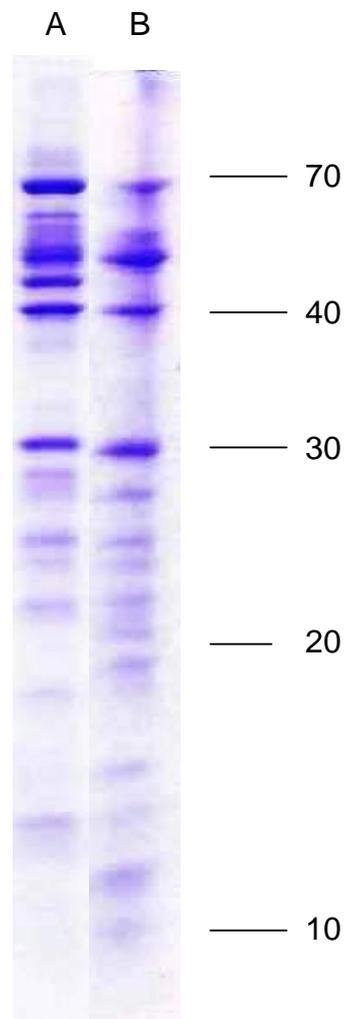


Abbildung 14: SDS-PAGE des isolierten peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* (A) und des Komplex I aus *N. crassa*-Wildtyp (B). Die Zahlen geben die apparenten Molekularmassen in kDa an.

4.3.6 Isolierung des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* durch His- Tag-Affinitätschromatographie

Zur Isolierung des peripheren Arms wurde das membranassoziierte Protein mit Lubrol solubilisiert und die nicht gelösten Proteine durch anschließende Zentrifugation abgetrennt. Durch Ni-NTA-Chromatographie und Gelfiltration in Lubrol-freien Puffern wurde erst das Deterenz entfernt und dann der periphere Arm isoliert. In den Abbildungen 15 und 16 sind die Elutionsprofile der chromatographischen Schritte und die Polypeptidzusammensetzung des isolierten peripheren Arms dargestellt.

Die Bindung an das Ni-NTA-Material erfolgte über Nacht auf einem Rollenschüttler im Batch-Verfahren. Unspezifische Bindung wurde durch 25 mM Imidazol unterdrückt. Das Material wurde in eine Säule gepackt und das Protein mit einem linearen Imidazolgradienten von 30–250 mM Imidazol von der Säule eluiert. Der periphere Arm eluierte bei 120 mM Imidazol.

Bei der abschließenden Gelfiltrationschromatographie eluierte der periphere Arm als einheitlicher Gipfel. Wie am Polypeptidmuster erkennbar ist, liegt der periphere Arm in der Mutante *nuo20.9/30.4his* komplett assembliert vor. Ausgehend von 800 g Hyphen wurden 3.5 mg Protein erhalten. Die Reinheit des peripheren Arms in den Gipfelfraktionen der Größenausschlußchromatographie wurde auf der Grundlage des SDS-PAGE Musters auf 90 % geschätzt. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsschritte.

Tabelle 4: Reinigung des peripheren Arms mit His-Tag von Komplex I aus der *N. crassa*-Mutante *nuo20.9/30.4his*. Es wurde von 800 g Hyphen (Feuchtmasse) ausgegangen.

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Protein [mg]	NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität		
			gesamt [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	spezifisch [$\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}$]	Ausbeute [%]
Lubroextraktion	27	2836	2850	1	100
Ni-NTA- Chromatographie	17	26	490	19	17
Grössenausschluß- chromatographie	2.1	3.5	350	100	8

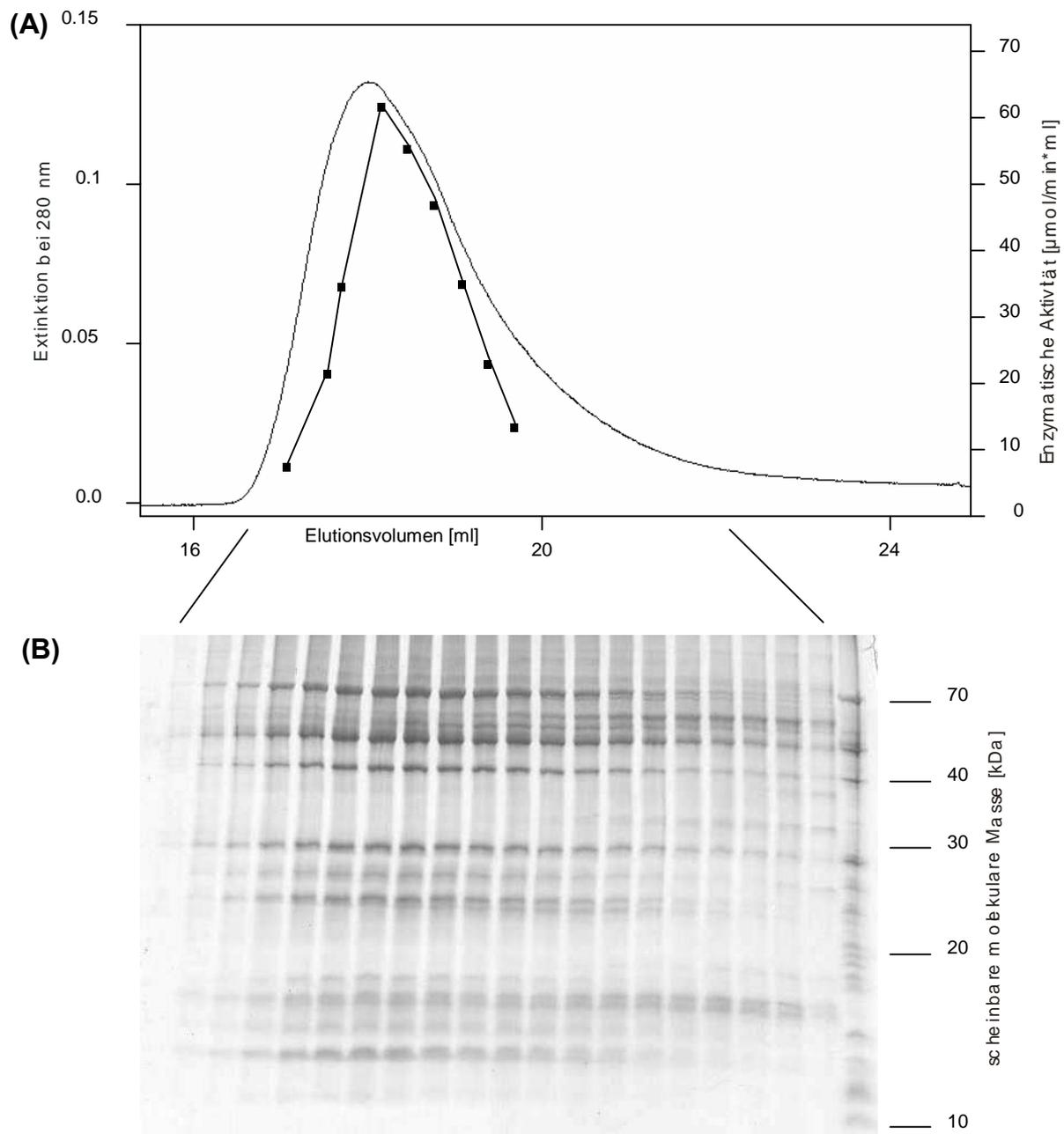


Abbildung 16: Reinigung des peripheren Arms mit His-Tag aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* durch Größenausschlußchromatographie. (A) zeigt das Elutionsprofil bei 280 nm (—) und (■—■) den Verlauf der NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität. In (B) ist die Polypeptidzusammensetzung der gekennzeichneten Gipfelfractionen und Komplex I-Standard in der Spur ganz rechts dargestellt. Das Säulenvolumen betrug 37 ml.

Die Polypeptidzusammensetzung des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* (A), des Komplex I aus *N. crassa* Wildtyp (B) und des Membranarms (C) wurden verglichen (Abbildung 17). Der Membranarm wurde von Katharina Lecher durch Rhodanid-Spaltung des Komplex I aus *N. crassa* Wildtyp hergestellt. Die Banden des Membranarms aus der Spaltung und des peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* ergänzen sich zum Peptidmuster des gesamten Komplex I. Dies weist darauf hin, daß der periphere Arm in der Mutante komplett assembliert wird.

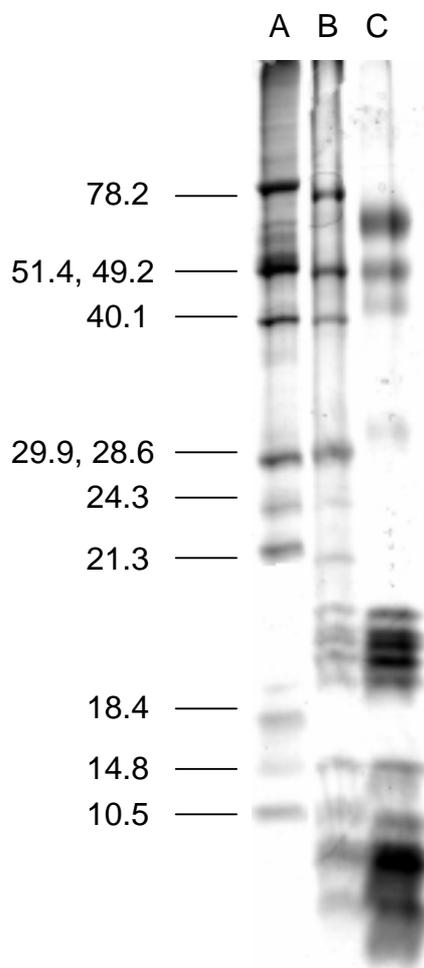


Abbildung 17: SDS-PAGE des isolierten Membranarms von Komplex I nach Rhodanid-Spaltung (A), des isolierten Komplex I (B) und peripheren Arms aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* (C). Die Zahlen geben die apparenten Molekulargewichte in kDa an.

5. Diskussion

5.1 Der periphere Arm als Subkomplex des Komplex I

Während bei den anderen Enzymen des Systems der oxidativen Phosphorylierung der Mechanismus der redoxgetriebenen Protonentranslokation und der ATP-Synthese weitgehend aufgeklärt ist (Yu *et al.*, 1996; Iwata *et al.*, 1995; Abraham *et al.*, 1994; Meier *et al.*, 2005), gibt es in Bezug auf den Mechanismus von Komplex I nur Mutmaßungen. Im Gegensatz zu den übrigen Enzymen des Systems der oxidativen Phosphorylierung liegt von dem größten Enzym dieses Stoffwechselweges, dem Komplex I, keine Röntgenstruktur in atomarer Auflösung vor. Alle Bemühungen den Komplex I als Ganzes zu kristallisieren und die Kristallstruktur zu bestimmen führten bislang nicht zum Erfolg. Dies liegt zum einen an der prinzipiellen Schwierigkeit, von einem Membranprotein Kristalle zu züchten. Zum andern kommt beim Komplex I neben seiner hohen Masse von 1 MDa hinzu, dass dieser nicht in einer konformativ einheitlichen Form vorliegt, da der Winkel zwischen dem Membranarm und dem peripheren Arm flexibel ist (Böttcher *et al.*, 2002).

Eine Alternative zur Kristallisation des Komplex I als Ganzes stellt die getrennte Kristallisation des peripheren Arms und des Membranarms dar. Ein entsprechender Ansatz wurde bereits erfolgreich zur Kristallisation des peripheren Arms aus *Thermus thermophilus* angewandt, dessen Struktur durch Röntgendiffraktion mit einer Auflösung von 4 Å bestimmt wurde (Hinchliffe und Sazanov, 2005). Auch in unserem Institut wurden bereits Kristalle des peripheren Arms und des Membranarms erhalten, die aber entweder wegen mangelnder Größe oder aufgrund ihrer Form für die Röntgenstrukturanalyse nicht geeignet waren (Drexler, 2002; Kintscher, 2000). Ein Nachteil aller bisherigen Präparationen in unserem Institut liegt in den zeitlich aufwändigen, über viele Reinigungsschritte verlaufenden und das Protein stark beanspruchenden Präparationen. So wurde der periphere Arm bisher aus der Mutante *nuo20.9*, welche nur den peripheren Arm von Komplex I bildet, in einer über vier Reinigungsschritte verlaufenden Präparation mit einer geringen Ausbeute von 3 mg isoliert. Die Präparation verlief über drei Tage und lieferte einen zum Teil proteolytisch

abgebauten peripheren Arm. Ziel war es deshalb, eine Präparationsmethode zu entwickeln, die es erlaubt den peripheren Arm schneller und mit weniger Schritten zu isolieren, um die Beanspruchung des Proteins so gering wie möglich zu halten. Dazu wurden zwei Ansätze gewählt. Zum einen wurde der Komplex I zunächst durch Zuckergradientenzentrifugation vorgereinigt, und dann durch das chaotrope Salz Kaliumrhodanid gespalten. Die Erzeugung des peripheren Arms erst im zweiten Schritt ermöglichte den Einsatz des für Komplex I aufgrund seiner Größe besonders effektiven Reinigungsschritts Zuckergradientenzentrifugation im ersten Schritt. Zum andern wurde an die 30.4 kDa-Untereinheit des peripheren Arms der Mutante *nuo20.9* ein His-Tag angehängt. Die zur 30.4 kDa-Untereinheit homologe Untereinheit aus dem Pilz *Yarrowia lipolytica* wurde bereits mit einem His-Tag versehen und so der gesamte Komplex I aufgereinigt (Kashani-Poor *et al*, 2000).

5.2 Isolation des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I mit Kaliumrhodanid

Die Isolierung des peripheren Arms aus *N. crassa*-Wildtyp erfolgte durch Extraktion mit dem Detergenz Octylglycosid und den 1. Reinigungsschritten Zuckergradientenzentrifugation in Dodecylmaltosid zur Herstellung des Komplex I, Spaltung von Komplex I mit Kaliumrhodanid und 2. Zuckergradientenzentrifugation in KSCN und Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung des peripheren Arms. und Ionenaustauschchromatographie. Innerhalb von 48 h wurde aus 800 g Hyphen 2 mg peripherer Arm isoliert.

Der periphere Arm hatte eine proteinchemische Reinheit von mehr als 95 %. Ein Grund für das Erreichen dieser hohen proteinchemischen Reinheit lag in der Verwendung des Detergenz Octylglycosid. Dieses hat eine hohe CMC und denaturiert viele Membranproteine, während Komplex I stabil bleibt. Desweiteren wurde im ersten Reinigungsschritt Zuckergradientenzentrifugation die enorme Größe des Komplex I zur Abtrennung der meisten Fremdproteine verwendet, und im zweiten Reinigungsschritt erst der periphere Arm erzeugt. Ein Nachteil dieser Präparation war, dass der periphere Arm sich bei der Rhodanid-Spaltung im Vergleich zum Membranarm als

außerordentlich empfindlich erwies. Hohe Rhodanid-Konzentrationen führten zum Zerfall des peripheren Arms, niedrige Rhodanid-Konzentrationen führten zu einer unzureichenden Spaltung des Komplex I. Als Optimum stellte sich eine Rhodanid Konzentration von 0.18 M heraus. Ausgehend von 60 mg Komplex I wurden 14 mg peripherer Arm und Membranarm erhalten, wobei der Membranarm einen größeren Anteil an den Spaltprodukten hat, da der periphere Arm bei 0.18 M KSCN schon teilweise zerfallen ist. Desweiteren erwies sich der periphere Arm als wasserunlöslich, obwohl keine seiner Untereinheiten eine hydrophobe Transmembranhelix aufwies. Ein Grund für die Wasserunlöslichkeit kann darin liegen, dass die Rhodanid-Spaltung sonst im Innern liegende hydrophobe Bereiche freilegt. Da der periphere Arm zur Löslichkeit Detergenz benötigt wird die Kristallisation erschwert, weil die Detergenz-Mizelle des Proteins die Wechselwirkung zwischen den Proteinen erschwert.

5.3 Isolierung des peripheren Arms von Komplex I aus der Mutante *nuo20.9/30.4his*

Durch Anbringung eines His-Tags an die 30.4 kDa-Untereinheit zeigte der periphere Arm aus der Mutante *nuo20.9* Affinität zu Ni-NTA-Material. Der Peptid-Tag an der 30.4 kDa-Untereinheit liegt somit frei an der Oberfläche und ist sowohl in *N. crassa* als auch *Y. lipolytica* der bisher einzige His-Tag an einer Untereinheit in *N. crassa* überhaupt, der im assemblierten Komplex Affinität zu Ni-NTA zeigt. Sämtliche His-Tags wurden C-terminal angefügt, da ein N-terminal angebrachter His-Tags durch das proteolytische System des Mitochondriums abgespalten wird (Glick *et al.*, 1992). Im Durchschnitt banden 20 %-30 % der im Rohextrakt gemessenen NADH/Ferricyanid-Reduktaseaktivität an das Ni-NTA-Material und eluierten bei 120 mM Imidazol. Die Bindungseigenschaften an die Ni-NTA konnte durch Verringerung der Imidazol-Konzentration im Bindungsansatz verbessert werden, allerdings kam es dann zu einer Abnahme der proteinchemischen Reinheit.

Im Anschluß an die Affinitätschromatographie wurde der periphere Arm durch Grössenausschlußchromatographie abschließend gereinigt. Der periphere Arm wurde

in wasserlöslicher, Detergenz-freier Form erhalten vor. Die Präparation Arm erwies sich allerdings als temperaturempfindlich, da er bei Temperaturen von mehr als 4 °C zur Aggregation neigte. Ausgehend von 800 g Hyphen wurden innerhalb von 24 Stunden mit zwei Reinigungsschritten 3.5 mg Protein mit einer geschätzten proteinchemischen Reinheit von 90 % erhalten. Zusätzliche Reinigungsschritte wie Ammoniumsulfatfällung und Ionenaustauschchromatographie brachten keine deutliche Verbesserung der Reinheit. Möglicherweise ist eine Steigerung der Reinheit durch Verwendung eines Größenausschlußchromatographie-Systems mit einer größeren Auflösung zu erreichen.

5. 4 Vergleich der Präparationen des peripheren Arms

Ebenso wie die Standardpräparation des peripheren Arms von Komplex I aus der Mutante *nuo20.9* zeigen die beiden in dieser Arbeit ausgearbeiteten alternativen Isolationsverfahren geringe Ausbeuten. Bei der Isolation des peripheren Arms durch Spaltung des Komplex I kommt es zu starken Verlusten, da dieser gegenüber Rhodanid empfindlich ist. Bei der Mutanten *nuo20.9* und *nuo20.9/30.4his* ist dagegen die Ausgangsmenge an peripherem Arm geringer. Ein Vorteil des peripheren Arms aus den Mutanten ist aber, dass dieser im Gegensatz zu dem peripheren Arm aus der Rhodanid-Spaltung wasserlöslich ist. Desweiteren wird der periphere Arm aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* mit nur zwei Reinigungsschritten isoliert, was mit einer Verringerung der proteolytischen Beanspruchung des Proteins einhergeht. Insgesamt scheint der periphere Arm aus der Mutante *nuo20.9/30.4his* wegen seiner Wasserlöslichkeit und seiner schonenden Isolation für eine spätere Kristallisation geeignet zu sein.

6. Literatur

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R. und Walker J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria.

Nature **370**, 621-628

Alves, P.C. und 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

Attardi, G. und Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria.

Ann. Rev. Cel. Biol. **4**, 289-333

Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, T., Czok, R., Garbade, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfeleoderer, G. (1953) Diphosphofruktose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.

Z. Naturforsch. **8b**, 555-557

Braun, M., Bungert, S. und Friedrich, T. (1998) Characterisation of the overproduced NADH Dehydrogenase Fragment of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*.

Biochemistry **37**, 1861-1867

Bottcher, 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

Brunelli, J.P. und Pal, M.L. (1993) A series of Yeast/*Escherichia coli* λ expressionvectors designed for directional cloning of cDNA and *cre/lox*-mediated plasmid excision.

Yeast **9**, 1309-1313

Bungert, S. (1999) Isolierung und Kristallisation des NADH-Dehydrogenase Fragments der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase und des Ferritins aus *Escherichia coli*.

Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Runswick, M. J., Shannon, R. J., Hirst, J., and Walker, J. E. (2005) The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria.

Mol. Cell Proteomics **4**, 693-699

Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y., and Walker, J. E. (2004) The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria.

J. Biol. Chem. **279**, 26036-26045

Cernus, K. (1994) Charakterisierung der Mutante *nuo49* der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase von *Neurospora crassa*.

Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Chen R., Fearnley IM, Peak-Chew S, Walker JE (2004) The Phosphorylation of Subunits of Complex I from Bovine Heart Mitochondria.

J. Biol. Chem. **279**, 26036-26045

Da Silva, M.V., Alves, P.C., Duarte, M., Mota., N., Lobo-da-Cunha, A., Harkness, T.A.A., Nargang, F.E., und 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

Davies R.H. und de Serres F.J. (1970) Genetic and Microbiological Research Techniques for *Neurospora crassa*.

Meth. Enzymol. **17A**, 79-143

De Vries, S. und Grievell, L.A. (1988) Purification and characterisation of a rotenone-insensitive NADH-Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*.

Eur. J. Biochem. **176**, 377-384

Drexler, A. (2002) Der Membranarm des Atmungskettenkomplex I von *Neurospora crassa*: Versuche zur Kristallisation und Isolation mit Hilfe von Peptid-Tags.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Douce, R. und Neuburger, M. (1989) The uniqueness of plant mitochondria.

Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **40**, 371-414

Duarte, M. Und 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., Sousa, R und Videira A. (1995) Inactivation of genes encoding subunits of the peripheral and the membrane parts of *Neurospora crassa* mitochondrial complex I and effects on enzyme assembly.

Genetics **139**, 1211-1221

Duarte, M., Pópulo, H., Videira, A., Friedrich, T und Schulte, U. (2002) Disruption of iron-sulfur cluster N-2 from NADH:ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis.

Biochem. J. **364**, 833-839

Duarte, M., Peter, M., Schulte, U., und Videira, A. (2003) The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria.

Biochem. J. **271**, 1-7

Fearnley I.M. und 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

Fearnley, I.M., Carroll, J., Shannon, R.J., Runswick, J.M., Walker, J.E. und Hirst J. (2001) GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

J. Biol. Chem. **276** (42), 38345-38348

Fecke, W., Sied, V.D., Ohnishi, T. und Weiss, H. (1994) Disruption of the Gene encoding the NADH-binding subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron sulfur cluster N-3.

Eur. J. Biochem. **229**, 551-558

Fecke, W. (1993) Inaktivierung von Genen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*: Isolierung und Charakterisierung des teilassemblierten Enzymkomplexes.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ferreirinha, F. Duarte, M., Melo, A.M. und Videira A. (1999) Effects of disrupting the 21 kDa Subunit of complex I from *Neurospora crassa*.

Biochem. J. **342**, 551-554

Finel, M., Skehel, S.P., Albracht, S.P.J., Fearnley, I.M. und Walker J.E. (1992) Resolution of NADH:Ubiquinone Oxidoreductase from Bovine Heart Mitochondria in two Subcomplexes, One of Which Contains the Redox Centers of the Enzyme.

Biochemistry **31**, 11425-11435

Finel, M., Majander, A.S., Tynnela, J., De Jong, M.P., Albracht, S.P.J. und Wikström, M. (1994) Isolation and characterisation of subcomplexes of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Eur. J. Biochem. **226**, 237-242

Frank Fischer (2002) Affinitätsmarkierung peripherer Untereinheiten des Komplex I aus *Neurospora crassa*.

Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B. und 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., Steinmüller, K. und Weiss, H. (1995) The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts.

FEBS Letters **367**, 107-111

Friedrich, T. und Scheide, D. (2000) The respiratory complex I of bacteria, archaea and eucaryotes and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases.

FEBS Lett. **479**, 1-5

Friedrich, T., Brors, B., Hellwig, P., Kintscher, L., Rassmussen, T., Scheide, D., Schulte, U., Mäntele, W., und Weiss, H. (2000) Characterisation of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Biochim. Biophys. Acta **1459**, 305-309

Glick, B.S., Beasley, E.M., Schatz G. (1992) Protein Sorting in Mitochondria.

Trends Biochem. Sci. **17**, 453-459

Guénebaut, V., Vincentelli, R., Milles, D., Weiss, H., Leonard, K. (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction.

J. Mol. Biol. **276**, 409-418

Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K. und Friedrich T. (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

J. Mol. Biol. **276**, 105-112

Harkness, T.A.A., Rothery, R.A., Weiner, J.H., Werner, S., Azevedo, J.E., Videira, A. und Nargang F.E. (1995) Disruption of the gene encoding the 78-kDa subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation (RIP).

Curr. Genet. **27**, 339-350

Hatefi, T. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system.

Ann. Rev. Biochem. **54**, 1015-1069

Hatefi, Y., Hanstein W.G. (1974) Destabilisation of Membranes with chaotropic Ions.

Meth. Enz. **31**, 770-790

Hennemann, J (2000) Vorkommen und Bedeutung mehrerer Isoformen des mitochondrialen Acyl Carrier Proteins.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Hesterberg, M. (2002) Charakterisierung einer unbekanntenen Redoxgruppe sowie der Konformation der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) aus *Escherichia coli*.

Dissertation, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Hinchlippe, P., Sazanov, L.A. Organisation of Iron-Sulfur Clusters in Respiratory Complex I.

Science **309**, 771-774

Hirdy, I., Hirt, R.P., Dolezal, P., Bardonova, L., Foster, P.G., Tachezy J. und Embly, T.M. (2004) *Trichomonas* hydrogenosomes contain NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I.

Nature **432**, 618-622

Hochuli, E., Bannawarth, W., Döbli, H., und Stüber, G. (1988) Genetic approach to facilitate Purification of recombinant protein with a novel metal chelate absorbent.

Biotechnology **1321**, 1-5

Hofhaus, G., Weiss H., und Leonard, K. (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and the membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase.

J. Mol. Biol. **221**, 1027-1043

Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswaamy, S., und Jap, B.K. (1995) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex I.

Science **281**, 64-71

Karschnia, S. (2002) Kristallisation und Resonanz-Raman-Spektroskopie des Membranarms von Komplex I.

Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Kintscher, L. (2000) Charakterisierung und Kristallisation des peripheren Arms von Komplex I aus der *Neurospora crassa*-Mutante *nuo20.9*.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Krüll, C (1995) Spezifische Mutagenese der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase in *Neurospora crassa*.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**, 680-685

Lange, C. und Hunte, C. (2002) Crystall structure of the yeasts cytochrome bc_1 complex with its bound substrate cytochrome c.

Proc. Natl. Acad. Sci. **99**, (5) 2800-2805

Li, Q., Ritzel, R.G., McLean, L.L., McIntosh, L., Ko, T., Bertrant, H., und Nargang, F.E. (1996) Cloning and analysis of the alternative oxidase gene of *Neurospora crassa*.

Genetics **142**, 129-140

Luttic, M.A., Overcamp, K.M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. und Pronk, J.T. (1998) The *Sacchomyces cerevisiae* NDE1 und NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalysing the oxidation of cytosolic NADH.

J. Biol. Chem. **273**, 24529-24534

Marques, I., Duarte, M. und Arnaldo Videira (2003) The 9,8 kDa Subunit of Complex I, Related to Bacterial Na⁺-translocating NADH Dehydrogenases, is required for Enzyme Assembly and function in *Neurospora crassa*.

J. Mol. Biol. **329** (2), 283-90

Marques, I., Duarte, M., Assuncao, J., Ushakova, A.V. und Videira A. (2005) Composition of complex I from and disruption of two "accessory" subunits.

Biochim. Biophys. Acta **1707** (2-3): 211-20

Marres, C.A., de Vries, S. und Grivell, L.A. (1991) Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH:ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochem. **195**, 857-862

Meier, T., Polzer, P., Dietrichs, K., Welte, W., Dimroth, P. (2005) Structure of the Rotor Ring of Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*.

Science **308**, 659-662

Mikolajczyk, S., Brody, S. (1990) De novo fatty acid synthesis mediated by acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria.

Eur. J. Biochem. **185** (2), 431-7

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.

Nature **191**, 144-148

Nakamaru-Ogiso, E., Takahiro, Y., Yagi, T. und Ohnishi, T. Characterisation of the Iron-Sulfur Cluster N-/ (N-1c) in the Subunit NuoG of the Proton-translocating NADH-quinone Oxidoreductase from *Escherichia coli*.

J. Biol. Chem. **280**, 301-307

Nehls, U., Friedrich, T., Schmiede, A., Ohnishi, T., und Weiss H. (1992) Characterisation of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora crassa* mitochondria by gene disruption.

J. Mol. Biol. **227**, 1032-1042

Ohnishi, T. (1979) Mitochondrial iron-sulfur flavodehydrogenases.

In „Membrane Proteins in Energy Transduction“ (Calpaldi, R.A., Ed.) 1-87, Dekker, New York

Peng, G., Fritsch, G., Zickermann, V., Schägger, H., Mentele, R., Lottspeich, F., Bostina, M., Radermacher, M., Huber, R., Stetter, K.O. und Michel, H. (2003) Isolation, Characterisation and Electron Microscopy Single Particle Analysis of the NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) from Hyperthermophilic Eubacterium *Aquifex aeolicus*.

Biochemistry **42**, 3032-303

Ragan, C.I. (1987) Structure of NADH-Ubiquinone Reductase (Complex I).

Curr. Topics Bioenerget. **15**, 1-36

Rasmussen, T., Scheide, D., Brors, B., Kintscher, L., Weiss, H., und Friedrich T. (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Biochemistry **40**, 6124-6131

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual.

Cold Spring Harbour, New York Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2. Aufl.

Schmidt, T.G.M, Koepke, J., Frank, R. und Skerra, A. (1996) Molecular interaction between the *Step*-tag peptide and its cognate target strepavidin.

J. Mol. Biol. **255**, 753-766

Schneider, R., Massow, M., Lisowsky, T und Weiss H. (1995) Different respiratory defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein.

Curr. Genet. **29**, 10-17

Schulte, U. und Weiss, H. (1997) Structure, function and biogenesis of respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)

In „Frontiers of cellular bioenergetics. Molecular Biology, Biochemistry and Physiopathology“, Plenum Press, London

Schulte, U., Abelmann, A., Amling, N., Brors, B., Friedrich, T., Kintscher, L., Rasmussen, T. und Weiss, H. (1998) Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy.

BioFactors **8**, 177-186

Schulte U, Haupt, V., Abelmann, A., Brors, B., Rasmussen, T., Friedrich, T. und Weiss, H. (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involvent in the biogenesis of the complex I.

J. Mol. Biol. **292**, 569-580

Schulte, U. (2001) Biogenesis of Respiratory complex I.

Journal of Bioenergetics and Biomembranes, Vol. 33, No. 3, 205-212

Shalpour, Shabnam (2002) Isolierung des peripheren Arms aus *Neurospora crassa* durch Affinitätschromatographie.

Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Siedow, J.N. (1990) Perspectives in biochemical and genetic regulation of photosynthesis,

In Zelitch, I. (Ed.) Plant Biology 10, Wiley-Liss, New York

Singer, T.P. und Ramsey, R.R. (1992) NADH-ubiquinone oxidoreductase.

In „Molecular Mechanisms in Bioenergetics“ (ed. L. Ernster). Amsterdam: Elsevier

Small, W.C. und McAllister-Henn, L. (1998) Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*.

J. Bacteriol. **180**, 4051-4055

Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 4350-4353

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa, K., Nakashima, R., Yaono, R., und Yohikawa S. (1996) The whole structure of the 13-Subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å.

Science **269**, 1069-1074

Tuschen, G., Sackmann, U., Nehls, U., Haiker, H., Buse, G. und Weiss H. (1990) Assembly of NADH:Ubiquinone Reductase (Complex I) in *Neurospora* Mitochondria.

J. Mol. Biol. **213**, 249-255

Uhlmann, M. und Friedrich, T. EPR Signals Assigned to Fe/S Cluster N1c of the *Escherichia coli* NADH:Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) Derive from Cluster N-1a.

Biochemistry **44**, 1653-1658

Wobschall, U. (1997) Gezielte Mutagenese von Eisen-Schwefel-Zentren in der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase aus *Neurospora crassa*.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vogel, H.J. (1956) A convenient growth media of *Neurospora crassa*.

Microbiol. Genet. Bull. **13**, 157-179

Voss, S. und Skerra, A. (1997) Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Step-tag II peptide and improves performance in recombinant protein purification.

Protein Eng. **25**, 377-384

Wang, D.C., Meinhardt, S.W., Sackmann, U., Weiss, H. und Ohnishi T. (1991) The iron-sulfur clusters in the two related forms of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*.

Eur. J. Biochem. **197**, 253-324

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 bc₁ complex from bovine heart mitochondria.

Science **277**, 60-66

Yagi, T., Matsuno-Yagi, A. (2003) The Transducing-Quinone Oxidoreductase in the Respiratory Chain: The Secret Unlocked.

Biochemistry **42**, 2266-227

Yagi, T. (1993) The bacterial energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase.

Biochim. Biophys. Acta **1141**, 1-17

Yu, C.A., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Yu, L., Xia, D., Kim, H.H. und Deisenhofer, J. (1996) Crystallisation and preliminary structure of beef heart mitochondrial cytochrome bc₁ complex.

Biochim. Biophys. Acta **1275**, 47-53

Zensen, R., Husmann, H., Schneider, R., Peine, T. und Weiss, H. (1992) De novo synthesis and desaturation of fatty acids, at the mitochondrial acyl-carrier protein, a subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*.

FEBS Lett. **310**, 179-181

Danksagung

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

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Hanns Weiß für die interessante Fragestellung und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. Lutz Schmitt.

Herrn PD Dr. Ulrich Schulte möchte ich für seine ständige Diskussionsbereitschaft danken. Herrn Dr. Hans-Georg Hennemann danke ich für die Einarbeitung ins Thema.

Herrn Sven Karschnia möchte ich für die kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre in Büro und Labor danken. Den Damen Martina Wesemann, Yasmin Golestani, Dr. Vassiliki Tsalastra und Katharina Lecher sei für nette Gesprächsrunden in Sitzecke und Cafeteria gedankt. Frau Saber Rasid danke ich für viele aufmunternde Gespräche und die gute Hyphen-Grundversorgung.

Gedankt sei auch meinen Onkel Dr. Rolf Körber, der mich in schwierigen Momenten des Studiums durch Rat unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Stephan, sowie Daniele für deren Hilfe und Geduld.

