

Selektion und Charakterisierung  
ungezielt erzeugter Mutanten des Hyphenpilzes  
*Neurospora crassa* mit Defekten in der  
NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Yasmin Golestani-Asl

aus Duisburg

Dezember 2007

Aus dem Institut für Biochemie  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: PD Dr. Ulrich Schulte

Koreferent: Prof. Dr. Hanns Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2008

## A Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Das System der oxidativen Phosphorylierung .....	5
2.2	Biogenese der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe .....	8
2.3	Superkomplexe.....	10
2.4	Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase .....	12
2.5	Assemblierung von Komplex I.....	17
2.6	Identifizierte Hilfsproteine für die Komplex I-Assemblierung.....	21
2.7	Der Modellorganismus <i>Neurospora crassa</i> .....	21
2.8	Ungezielte Mutagenese durch Insertion eines Resistenzgens.....	24
2.8.1	Ungezielte Mutagenese.....	25
2.8.2	Selektion von Komplex I-Mutanten .....	26
2.8.3	Charakterisierung der Insertionsstelle.....	29
2.9	Ziel der Arbeit .....	31
3	Material und Methoden.....	33
3.1	Mikroorganismen und Plasmide.....	33
3.2	Oligonukleotide .....	33
3.3	Medien und Lösungen .....	34
3.4	Erzeugung von Komplex I-Mutanten .....	40
3.4.1	Plasmidisolierung.....	40
3.4.2	Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse .....	40
3.4.3	Präparation des <i>bar</i> -Gens zur Transformation .....	41
3.4.4	Kreuzung von <i>N. crassa</i> -Stämmen .....	42
3.4.5	Kultivierung von Makrokonidien aus <i>cuco5</i> .....	43
3.4.6	Kultivierung von Mikrokonidien aus <i>cuco5/7089</i> .....	43
3.4.7	Alternative Erzeugung von Mikrokonidien.....	44
3.4.8	Transformation .....	44
3.5	Selektion von Komplex I-Mutanten .....	46
3.5.1	Selektionsverfahren.....	46
3.5.2	Mitochondrienpräparation aus <i>Neurospora crassa</i> .....	46

---

3.5.3	Biuret-Methode .....	47
3.5.4	NADH/Ferricyanid-Redoxaktivitätstest .....	47
3.6	Charakterisierung von Komplex I-Mutanten .....	48
3.6.1	Große Mitochondrienpräparation aus <i>N. crassa</i> .....	48
3.6.2	Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese .....	49
3.6.3	Western-Blot Analyse .....	49
3.6.4	Cytochrombestimmung .....	50
3.7	Identifizierung der Insertionsstellen des <i>bar</i> -Gens .....	51
3.7.1	Isolierung der genomischen DNA aus <i>N. crassa</i> .....	51
3.7.2	Vektorette-PCR .....	51
3.7.3	Splinkerette-PCR .....	54
3.7.4	PCR auf genomischer DNA .....	56
4	Ergebnisse .....	57
4.1	Entwicklung des Selektionverfahrens .....	57
4.2	Erzeugung von Komplex I-Mutanten durch Transformation .....	60
4.2.1	Transformation und Selektion von <i>cuco5</i> .....	61
4.2.2	Enzymatischer Test der Mutanten aus Makrokonidien .....	63
4.2.3	Erzeugung homokaryonter Klone .....	65
4.2.4	Erzeugung des Mikrokonidienstammes <i>cuco5/7089</i> .....	67
4.2.5	Transformation in Mikrokonidien .....	68
4.3	Charakterisierung der Komplex I-Klone .....	73
4.3.1	Überprüfung der erzeugten Komplex I-Mutanten .....	73
4.3.2	Charakterisierung durch Western Blot-Analyse .....	75
4.3.3	Charakterisierung durch Cytochrom-Bestimmung .....	79
4.4	Identifizierung der Insertionsstellen durch PCR .....	83
4.4.1	Gene für Untereinheiten von Komplex I .....	85
4.4.2	Bevorzugte Insertionsstellen .....	88
4.4.3	Einfach auftretende Insertionsstellen .....	91
4.5	Untersuchung von Knockout-Mutanten .....	95
5	Diskussion .....	97
5.1	Erzeugung von Komplex I-Mutanten .....	97
5.2	Selektion der Komplex I-Mutanten .....	99

5.2.1	Transformation der Makrokonidien <i>cuco5</i> .....	100
5.2.2	Erzeugung des Mikrokonidienstamms <i>cuco5/7089</i> .....	101
5.2.3	Transformation der Mikrokonidien <i>cuco5/7089</i> .....	102
5.3	Charakterisierung der Komplex I-Mutanten .....	103
5.3.1	Charakterisierung der Assemblierungsintermediate .....	103
5.3.2	Überprüfung der Komplex I-Spezifität .....	104
5.4	Identifizierung der betroffenen Gene .....	104
5.5	Statistische Betrachtung .....	107
5.6	Ausblick .....	109
6	Literaturverzeichnis .....	111

## B Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Darstellung des Systems der oxidativen Phosphorylierung. ....	5
Abbildung 2:	Darstellung der verzweigten Atmungskette von Pilzen. ....	7
Abbildung 3:	Strukturmodell des I+III <sub>2</sub> Superkomplex in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	10
Abbildung 4:	Dreidimensionale Darstellung von Komplex I .....	12
Abbildung 5:	Kristallstruktur und Elektronenweg von Komplex I. ....	15
Abbildung 6:	Assemblierungsschema von Komplex I in <i>N. crassa</i> .....	18
Abbildung 7:	Darstellung der humanen Komplex I-Assemblierung nach Vogel.....	19
Abbildung 8:	Darstellung der humanen Komplex I-Assemblierung nach Lazarou....	20
Abbildung 9:	Lebenszyklus von <i>N. crassa</i> .....	22
Abbildung 10:	Vegetativer Lebenszyklus von <i>N. crassa</i> .....	23
Abbildung 11:	Schematische Darstellung des pKSbar2-Plasmids .....	25
Abbildung 12:	Wachstumsvergleich der Mutanten <i>cuco5</i> und <i>nuo20.9/cuco5</i> .....	28
Abbildung 13:	Schematische Darstellung der Vektorette-PCR.....	29
Abbildung 14:	Schematische Darstellung der Splinkerette-PCR.....	30
Abbildung 15:	Schematische Darstellung des Zuckergradienten. ....	47
Abbildung 16:	Schematische Darstellung des Selektionsverfahrens .....	57
Abbildung 17:	Enzymatischer Test zur Überprüfung des Selektionsverfahrens.....	59
Abbildung 18:	Überprüfung der Restriktion von pKSbar2 mit BamHI.....	61
Abbildung 19:	Überprüfung der Restriktion von pKSbar2 mit BamHI und BssHII ....	62

---

Abbildung 20: Doppelter enzymatischer Test der <i>cuco5</i> -Transformanden .....	64
Abbildung 21: Enzymatischer Test der vier homokaryonten Klone von T8-207.....	65
Abbildung 22: Flüssigkulturen der Referenzstämme und der Kreuzungsmutante ...	67
Abbildung 23: Doppelter enzymatischer Test der <i>cuco5/7089</i> -Transformanden ....	69
Abbildung 24: Amplifizierung des <i>bar</i> -Gens durch PCR.....	70
Abbildung 25: Enzymatische Aktivität der Klone aus Mikrokonidien. ....	71
Abbildung 26: Enzymatische Aktivität des Klons Y28-55/7 .....	72
Abbildung 27: Elutionsprofil der Referenzstämme <i>cuco5</i> und <i>nuo20.9/cuco5</i> .....	73
Abbildung 28: Elutionsprofile der Transformanden aus Makrokonidien.....	74
Abbildung 29: Elutionsprofile der Transformanden aus Mikrokonidien .....	74
Abbildung 30: Elutionsprofile der weiteren Transformanden aus Mikrokonidien....	75
Abbildung 31: Western Blot-Analyse der Stämme <i>cuco5</i> , P2-204/1 und T19-26/6..	76
Abbildung 32: Western Blot-Analyse von M3-515/1 und G1-99/1 .....	76
Abbildung 33: Western Blot-Analyse von T8-207/2 und Y23-278//1. ....	77
Abbildung 34: Western Blot-Analyse von Y23-241/20, Y28-55/7 und Y28-136/3....	77
Abbildung 35: Western Blot-Analyse von T32-21/11, M9-227/1 und Y23-57/11.....	78
Abbildung 36: Differenzspektren der Referenzstämme <i>cuco5</i> und <i>cuco5/7089</i> . ....	80
Abbildung 37: Differenzspektren der Mutanten aus Makrokonidien. ....	81
Abbildung 38: Differenzspektren der Mutanten aus Mikrokonidien.....	82
Abbildung 39: <i>bar</i> -Gen für die Vektorette-PCR.....	83
Abbildung 40: <i>bar</i> -Gen für die Splinkerette-PCR.....	84
Abbildung 41: Insertionsstelle in Mutante Y28-136/3.....	86
Abbildung 42: 1. Insertionsstelle in Mutante Y23-57/11. ....	87
Abbildung 43: 1. Insertionsstelle in Mutante T8-207/2.....	87
Abbildung 44: Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in b8g12_390 .....	88
Abbildung 45: Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in b10c3_130 .....	90
Abbildung 46: 2. Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in T8-207/2.....	91
Abbildung 47: 2. Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in T32-21/11. ....	92
Abbildung 48: 2. Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in Y23-57/11. ....	93
Abbildung 49: Insertionsstelle des <i>bar</i> -Gens in P2-204/1 .....	93
Abbildung 50: Insertion des <i>bar</i> -Gens in G1-99/1 .....	94
Abbildung 51: Insertion des <i>bar</i> -Gens in Y28-55/7. ....	94
Abbildung 52: Elutionsprofile der Knockout-Mutanten. ....	96

## C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide für die Vektorette-Einheit .....	33
Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für die Splinkerette-Einheit.....	33
Tabelle 3: Übersicht der eingesetzten Primer .....	33
Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Primer (Fortsetzung).....	34
Tabelle 5: PCR-Programm unter Verwendung der Taq-Polymerase .....	42
Tabelle 6: Differenz-Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der Cytochrome ...	50
Tabelle 7: Primerkombinationen für den ersten Durchgang der Vektorette-PCR...	53
Tabelle 8: PCR-Programm für die Vektorette-PCR .....	53
Tabelle 9: PCR-Ansätze für den zweiten Durchgang mit Sequenzierungsprimern ..	54
Tabelle 10: Primer für den ersten Durchgang der Splinkerette-PCR.....	55
Tabelle 11: PCR-Programm für Splinkerette-PCR .....	55
Tabelle 12: PCR-Ansätze für den zweiten Durchgang mit Sequenzierungsprimern .	56
Tabelle 13: PCR-Programm für die direkte PCR .....	56
Tabelle 14: Überprüfung der Anwendbarkeit des Selektionsverfahrens.....	59
Tabelle 15: Selektionsbilanz für die Restriktion mit BamHI in Makrokonidien. ....	61
Tabelle 16: Bilanz für die Restriktion mit BamHI und BssHII in Makrokonidien.....	63
Tabelle 17: Untersuchung der isolierten, homokaryonten Kolonien von T8-207 ....	66
Tabelle 18: Selektion der Kreuzungsmutanten .....	67
Tabelle 19: Konidienbildung in Flüssigkulturen.....	68
Tabelle 20: Bilanz für Restriktion mit BamHI und BssHII in Mikrokonidien.....	68
Tabelle 21: Selektionsbilanz für Transformationen mit pUC5/Bar3-PCR-Produkt ..	71
Tabelle 22: Selektionsbilanz für PCR mit degen. pUC5 und degen. Bar3.....	72
Tabelle 23: Ermittelter Cytochromgehalt der untersuchten Stämme.....	80
Tabelle 24: Übersicht für die Insertion in Gene für bekannte Untereinheiten .....	85
Tabelle 25: Übersicht für die Insertion in das Gen b8g12_390.....	88
Tabelle 26: Übersicht für die Insertion in das Gen b10c3_130.....	89
Tabelle 27: Charakterisierung der Insertionsstelle in b10c3_130.....	90
Tabelle 28: Übersicht für die einmalig erfolgten Insertionen.....	91
Tabelle 29: Direkte PCR auf das Gen b11e5_140.....	92
Tabelle 30: Übersicht der Insertionsstellen .....	95
Tabelle 31: Zusammenfassung der Transformationen .....	103

## D Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
bidest.	bidestilatus
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Da	Dalton (Masseneinheit)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
degen.	degeneriert
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
KCN	Kaliumcyanid
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QA	Chinasäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>T. thermophilus</i>	<i>Thermus thermophilus</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethoxy)-aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute

# 1 Zusammenfassung

Die Forschung an dem größten und kompliziertesten Enzym der Atmungskette, der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), hat auf Grund seiner prominenten Stellung als Ursache für eine Vielzahl von mitochondrialen Krankheiten und degenerativen Prozessen in den letzten Jahren signifikant zugenommen. Allerdings liegen nur wenige Kenntnisse über die Biogenese und Assemblierung von Komplex I vor. Bislang wurden fünf spezifische Assemblierungsproteine charakterisiert. Da für den weit einfacher strukturierten Komplex IV das Verhältnis von Untereinheiten zu Hilfsproteinen bei etwa 1:1 liegt, ist die Existenz weiterer Assemblierungsproteine von Komplex I anzunehmen. Eine Vielzahl von Hilfsproteinen für die Atmungskettenkomplexe III und IV wurden durch ungezielte Mutagenese in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert.

In dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur Erzeugung, Selektion und Charakterisierung von Komplex I-Mutanten mit dem Ziel der weiteren Aufklärung des Assemblierungsmechanismus entwickelt und angewandt. Als Modelorganismus wurde der Hyphenpilz *Neurospora crassa* gewählt, der im Gegensatz zur fakultativ anaeroben Hefe *S. cerevisiae* einen Komplex I aufweist. Auf Grund seiner verzweigten Atmungskette können in diesem apathogenen Organismus genetische Manipulationen an Komplex I ohne letale Konsequenzen durchgeführt werden.

Zur Erzeugung der Mutanten wurde das Verfahren der ungezielten Insertionsmutagenese eingesetzt. Dazu wurde das *bar*-Gen, welches eine Resistenz gegen das Herbizid Basta vermittelt, in das Genom von *N. crassa* inseriert. Statistisch wäre für jede 400. Mutante ein Komplex I-Defekt zu erwarten. Da die Überprüfung der enzymatischen Aktivität tausender Mutanten mit einem inakzeptablen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden wäre, besteht die Notwendigkeit für ein vorgelagertes Selektionsverfahren.

Eine solche Methode wurde in dieser Arbeit auf der Basis des Wachstumsverhaltens entwickelt. Dazu wurde auf die chinäsäureregulierbare Komplex III-Mutante *cuco5* zurückgegriffen. Die Erzeugung von Komplex I-Defekten führt in *cuco5* zu einer

auffälligen Abhängigkeit des Wachstums von Chinasäure. Ein dreistufiges Selektionsverfahren führte zu einer effektiven Reduktion der insgesamt 20.160 untersuchten Transformanten auf 351 chinasäureabhängige Mutanten. Unter diesen wiesen zwölf Mutanten einen spezifischen Komplex I-Defekt auf.

In den identifizierten Komplex I-Mutanten wurden insgesamt 15 Insertionsstellen für das *bar*-Gen durch PCR amplifiziert und sequenziert. Überwiegend liegen die Insertionsstellen in kodierenden Abschnitten. Lediglich in drei Fällen fand die Insertion zwischen zwei Genen statt. Drei der betroffenen Gene kodieren bekannte Untereinheiten von Komplex I. Somit ist die Funktionalität und Effektivität des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens gezeigt, da aus der Fülle von Transformanten die gewünschten Mutanten selektiert wurden. Neben den drei betroffenen Genen für Komplex I-Untereinheiten sind in den identifizierten Komplex I-Mutanten insgesamt 14 Gene durch die erfolgte Insertion des *bar*-Gens entweder direkt betroffen oder liegen benachbart zur Insertionsstelle. Das beobachtete Phänomen der Mehrfachinsertion lässt eine zweifelsfreie Zuordnung der Defekte zu den identifizierten Genen nicht zu, da weitere, unentdeckte Insertionsstellen möglich sind. Durch gezieltes Ausschalten der identifizierten Gene muss daher noch Gewissheit über ihre Rolle bei der Komplex I-Assemblierung gewonnen werden.

## Summary

Research on the biggest and most complicated enzyme of the respiratory chain, the NADH:Ubichinon Oxidoreductase (complex I), has increased significantly over the past years due to its prominent position as cause of a multiple number of mitochondrial diseases and degenerative processes. However, only little is known about the biogenesis and assembly of complex I. So far five specific assembly chaperones have been characterised. As a 1:1 relation of subunits to chaperones has been found in the much simpler constructed complex IV the necessity of more such proteins for the assembly of complex I can be assumed. Multiple chaperones were already identified for the respiratory chain complexes III and IV via undirected mutagenesis in the yeast *S. cerevisiae*.

For a better understanding of the assembly mechanism a method for the generation, selection and characterisation of complex I-mutants has been developed and applied in this thesis. The fungus *Neurospora crassa* was used as model organism as it forms a complex I in contrast to *S. cerevisiae*. Due to its branched respiratory chain genetic manipulations of complex I can be performed in *N. crassa* without lethal consequences.

The generation of mutants was achieved through undirected insertation mutagenesis. The basta-resistance conferring *bar*-gene was inserted into the genome of *N. crassa*. Statistically a defect in complex I was expected for every 400<sup>th</sup> mutant. As the determination of the enzymatic activity of thousands of mutants would require unacceptable time and effort a preceding selection is needed.

Such a method has been developed on the basis of the growth behaviour. For this purpose the quinic acid regulated complex III mutant *cuco5* was used. The generation of complex I defects in these mutants leads to a significant growth dependence on quinic acid. An effective reduction of the 20.160 examined transformants to 351 quinic acid dependent mutants was achieved through a three-step screening procedure. Twelf of these mutants showed a specific complex I defect.

In the identified complex I mutants 15 insertion sites of the *bar*-gene have been amplified via PCR and sequenced. The insertion sites are mainly located in encoding domains. Only in three cases the insertion occurred between two genes. Three of the effected genes are encoding known subunits of complex I. Therefore the functionality and effectivity of the developed procedure have been proven as the desired mutants were selected out of the high number of transformands. Apart from the three effected genes for complex I subunits another 14 genes are either directly affected or adjacent to the insertion of the *bar*-gene. The observed phenomenon of multiple insertations doesn't allow a clear assignment of defects to the identified genes as further unidentified insertations are possible. To achieve certainty about the role in the assembly of complex I the direct knock-out of the identified genes is necessary.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das System der oxidativen Phosphorylierung

Eukaryotische, heterotrophe Organismen gewinnen den Großteil ihrer Energie durch das System der oxidativen Phosphorylierung. Hierbei wird die Oxidation von NADH und Ubichinol durch Sauerstoff zum Antrieb der ATP-Synthese verwendet. Die Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung sind bei Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Dabei handelt es sich um die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I), die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III), die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) und die ATP-Synthase (Komplex V) (Abbildung 1).

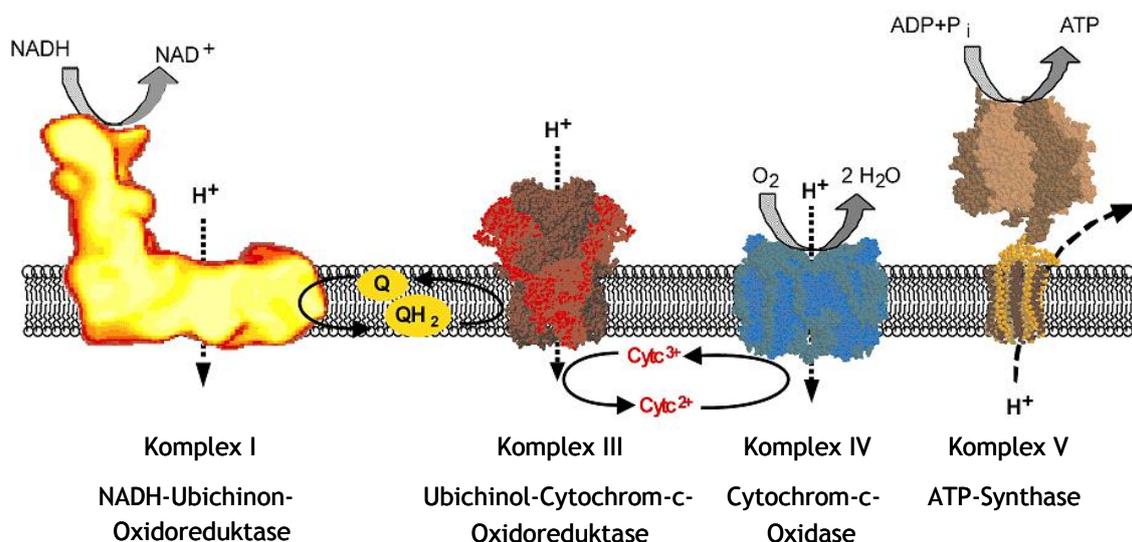


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Systems der oxidativen Phosphorylierung. Die dargestellten Strukturen der Komplexe III, IV und V stammen aus Röntgenbeugungsdaten und die Komplex I-Struktur wurde von elektronenmikroskopischen Analysen abgeleitet. Q steht für Ubichinon, QH<sub>2</sub> für Ubichinol und Cyt c für Cytochrom c (Brors, unveröffentlicht).

Die Atmungskettenkomplexe koppeln den exergonen Elektronentransport von NADH bzw. Ubichinol auf molekularen Sauerstoff mit der endergonen Protonentranslokation über die innere Mitochondrienmembran. Dabei erfolgt der Elektroneneintritt über Komplex I durch die Übertragung von jeweils zwei Elektronen von NADH ( $E^0 = -320 \text{ mV}$ ) auf das hydrophobe Ubichinon ( $E^0 = +100 \text{ mV}$ ). Ubichinon wird auch durch die Succinat-Ubichinon-Reduktase (Komplex II) als Teil des Citratzyklus und die Acyl-CoA-Dehydrogenase im Zuge der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren reduziert.

Diese Enzyme sind an der Protonentranslokation nicht beteiligt und spielen für das System der oxidativen Phosphorylierung daher keine Rolle. Das durch Reduktion entstandene Ubichinol diffundiert innerhalb der Mitochondrienmembran zu Komplex III, der die Elektronen einzeln auf lösliches Cytochrom c ( $E^0 = +220 \text{ mV}$ ) überträgt. Anschließend katalysiert Komplex IV die Elektronenübertragung von reduziertem Cytochrom c auf molekularen Sauerstoff ( $E^0 = +820 \text{ mV}$ ), der zu Wasser reduziert wird. Gleichzeitig werden vier Protonen pro Enzymkomplex aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Die resultierende ungleiche Verteilung der Protonen führt zu einem pH-Gradienten und einem elektrochemischen Transmembranpotential. Die dadurch erzeugte protonenmotorische Kraft ermöglicht die Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat durch die ATP-Synthase (Komplex V) bei gleichzeitigem Protonenrückfluss in den Matrixraum (Mitchell, 1961; Hatefi, 1985). Für die Synthese von drei Mol ATP ist dabei der Rückfluss von zehn Protonen erforderlich (Boyer, 2001).

Die Aufklärung der Kristallstrukturen von Komplex III (Xia et al., 1997; Iwata et al., 1998; Zhang et al., 1998; Hunte et al., 2000), Komplex IV (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996) und Komplex V (Abrahams et al., 1994; Meier et al., 2005) hat maßgeblich zum Verständnis der molekularen Mechanismen dieser Enzymkomplexe beigetragen. Von Komplex I ist bisher nur ein Fragment röntgenographisch mit einer Auflösung von  $3,3 \text{ \AA}$  aufgeklärt worden (Sazanov et al., 2006). Die Struktur des kompletten Komplex I wurde bislang nur grob durch Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen berechnet (Hofhaus et al., 1991; Guenebaut et al., 1997; Guenebaut et al., 1998). Insbesondere der Mechanismus der Kopplung von Elektronen- und Protonentransfer in Komplex I ist unverstanden.

Neben den Atmungskettenkomplexen I, III und IV enthalten die Mitochondrien von höheren Pflanzen und Pilzen eine Vielzahl alternativer, nicht protonenpumpender Atmungskettenenzyme (Douce et al., 1989). Dabei unterscheidet man zwischen alternativen NADH-Ubichinon-Oxidoreduktasen (NADH-Dehydrogenasen), welche die Oxidation von NADH unter Umgehung von Komplex I katalysieren, und alternativen Ubichinol-Oxidasen, welche die Elektronen von Ubichinol direkt auf Sauerstoff übertragen und dabei Komplex III und IV umgehen (Schwitzer et al., 1982;

Møller, 2001) Alle bekannten alternativen NADH-Dehydrogenasen sind kernkodiert und bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von etwa 43 - 65 kDa. Die Anzahl und Ausprägung der alternativen Dehydrogenasen variiert stark in verschiedenen Organismen (Kerscher, 2000). So wurde in dem Pilz *Yarrowia lipolytica* lediglich ein Komplex gefunden, während in Pflanzen bis zu sieben bekannt sind (Kerscher et al., 1999; Michalecka et al., 2003). *N. crassa* besitzt drei externe und eine interne NADH-Dehydrogenase (Abbildung 2).

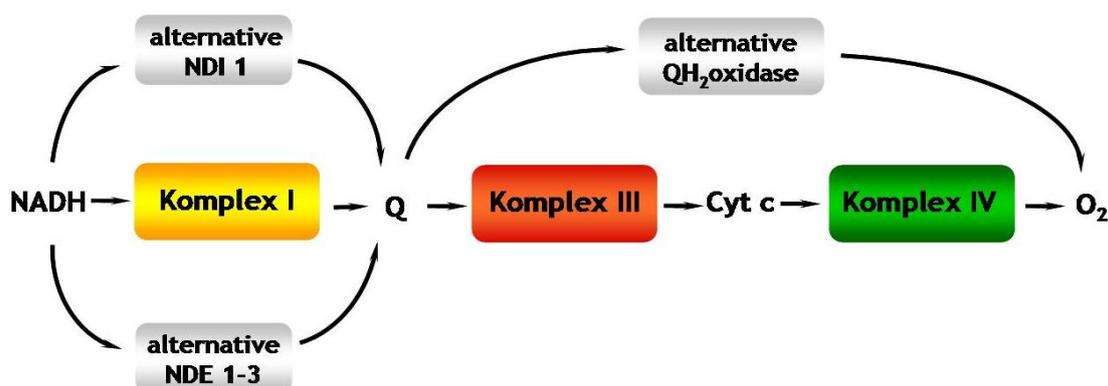


Abbildung 2: Schematische Darstellung der verzweigten, mitochondrialen Atmungskette von Pilzen. Die protonenpumpenden Komplexe sind hierbei farbig und die alternativen, nicht energiekonservierenden Komplexe grau unterlegt. Q steht für Ubichinon, NDI 1 für die interne NADH-Dehydrogenase, NDE 1-3 für die externen NADH-Dehydrogenasen, QH<sub>2</sub> für Ubichinol und Cyt c für Cytochrom c (Tsaladra, 2004).

Die interne NADH-Dehydrogenase NDI1 oxidiert NADH aus der mitochondrialen Matrix (Melo et al., 1999; Duarte et al., 2003), während die drei externen NADH-Dehydrogenasen NDE1-NDE3 das NADH aus dem Cytosol umsetzen (Melo et al., 2001; Carneiro et al., 2004; Carneiro et al., 2007). Die alternativen Enzyme weisen im Vergleich zu den protonenpumpenden Enzymkomplexen lediglich ein Zehntel von deren Substrataffinität auf, was die Funktion als Überlaufventile für überschüssige Reduktionsäquivalente nahe legt (Raghavendra et al., 2003). Weitere Annahmen zur Funktion der alternativen Atmungswege sind die Prävention der Bildung von Sauerstoffradikalen (Møller, 2001; Fernie et al., 2004) und die Anpassung an variable Umwelteinflüsse (Finnegan et al., 1997; Simons et al., 1999; Svensson et al., 2001; Michalecka et al., 2003; Escobar et al., 2004). Einige Organismen, wie z.B. die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, besitzen ausschließlich

alternative Dehydrogenasen zur Oxidation von NADH (de Vries et al., 1988; Melo et al., 2004).

Aufgrund der Existenz alternativer Enzyme sind die Atmungskettenkomplexe für Pilze und Pflanzen nicht essentiell und genetische Manipulationen dieser Enzymkomplexe möglich (Nehls et al., 1992). Das Fehlen alternativer NADH-Dehydrogenasen führt bei Menschen mit Komplex I-Defekten zu schwerwiegenden mitochondrialen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. einige Formen der Parkinsonschen Krankheit, Alzheimer, Leigh-Syndrom, Lebersche Optikusatrophie, Enzephalomyopathie und Kardiomyopathie (Schapira, 1999; Triepels et al., 2001; Thorburn et al., 2004; Balaban et al., 2005; Wallace, 2005; Schapira, 2006). Durch Verwendung von heterologen NADH-Dehydrogenasen wurden bereits Komplex I-Defekte in Säugerzellen erfolgreich komplementiert (Yagi et al., 2001; Park et al., 2007). Erste Schritte hinsichtlich einer funktionsfähigen Gentherapie sind bei Arbeiten mit lebenden, an Parkinson erkrankten Mäusen unter Verwendung der alternativen Dehydrogenase NDI1 aus *S. cerevisiae* zu verzeichnen (Seo et al., 2006). Die erfolgreiche Expression von NDI1 in Komplex I-defekten Fadenwürmern *Caenorhabditis elegans* bestärkt die weiteren Bemühungen, alternative Dehydrogenasen zur Verwendung in der Gentherapie zu untersuchen (DeCorby et al., 2007).

## 2.2 Biogenese der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe

Die eukaryotischen Atmungskettenkomplexe sind dualgenetischen Ursprungs mit mindestens 75 kernkodierten und 13 membranständigen Untereinheiten (Vogel et al., 2007). Die im Kerngenom kodierten Untereinheiten werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien importiert, während einige besonders hydrophobe membranständigen Untereinheiten durch das mitochondriale Genom kodiert werden. Um die Bildung der Komplexe zu ermöglichen, ist eine Vielzahl von Hilfsproteinen notwendig. Sie werden in drei Aufgabenbereiche unterteilt: den Transport der kernkodierten Proteine in die innere Mitochondrienmembran, die Transkription und Translation der mitochon-

drialen Gene und die Assemblierung der Komplexe mit den Cofaktoren zu funktionalen Enzymen (Grivell et al., 1999).

Die Analyse der Biogenese und Assemblierung der Atmungskettenkomplexe III, IV und V wurde erfolgreich an der fakultativ anaeroben Hefe *S. cerevisiae* durchgeführt. Bei Anwesenheit von fermentierbaren Kohlenstoffquellen ist die Hefe nicht auf eine intakte Atmungskette angewiesen. Durch die Analyse ungerichtet erzeugter Mutanten mit Beeinträchtigungen in der Synthese oder Funktion der Atmungskettenkomponenten, wurden verschiedene Hilfsproteine für die Biogenese der genannten Atmungskettenkomplexe identifiziert (Suzuki et al., 1997; Grivell et al., 1999; Chacinska et al., 2000). Von den 340 bekannten mitochondrialen Proteinen in *S. cerevisiae* sind 127 für die Synthese, Erhaltung und Expression der mitochondrialen DNA verantwortlich (Grivell et al., 1999). Defekte in diesen Proteinen betreffen in der Regel keinen spezifischen Atmungskettenkomplex, da sie grundsätzliche Funktionen ausführen. Hilfsproteine, die erst in einer späteren Phase der Biogenese auftreten, haben dagegen meist einen spezifischen Einfluss auf einen einzelnen Atmungskettenkomplex.

Allein für die Cytochrom-c-Oxidase, die aus 13 Untereinheiten besteht, wurden bereits mehr als 20 Assemblierungsproteine identifiziert (Fontanesi et al., 2006; Stiburek et al., 2006) von denen mindestens 14 spezifisch für die Komplex III-Assemblierung sind (Forsha et al., 2001; Zee et al., 2006). So sind z.B. die Proteine Cox10p (Tzagoloff et al., 1993) und Cox15p (Barros et al., 2001) in der Biosynthese der Häme Typ-a involviert. Das Carrierprotein Cox17p (Glerum et al., 1996) liefert vermutlich Kupfer aus dem Cytosol und überträgt es auf die beiden Proteine Cox11p (Carr et al., 2005) und Sco1p (Dickinson et al., 2000), die das Kupfer endgültig in die mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheiten I und III überführen. Zur Regulierung der mitochondrialen Translation dienen die Proteine Mss51p und Cox14p (Perez-Martinez et al., 2003; Barrientos et al., 2004; Zambrano et al., 2007). Die Hilfsproteine Shy1p und Pet100p sind für die Biosynthese der Intermediate notwendig (Mashkevich et al., 1997; Forsha et al., 2001; Church et al., 2005). Die große Zahl essentieller Hilfsproteine unterstreicht deren Relevanz für die Funktionalität des Komplexes eindrucksvoll.

## 2.3 Superkomplexe

Enzymkomplexe der oxidativen Phosphorylierung zeigen nach ihrer Isolierung immer noch Aktivität, was zur Postulierung des „Liquid-state“-Modells führte (Rich, 1984). Dabei wird von freien Komplexen ausgegangen, die sich unabhängig voneinander in der Membran bewegen. Durch kinetische Untersuchungen wurde gezeigt, dass die Konzentration an freibeweglichen Komponenten in der inneren Mitochondrienmembran und die zwischen ihnen auftretenden Kollisionen ausreichen, um die beobachtete Atmungsaktivität zu erhalten (Hackenbrock et al., 1986; Chazotte et al., 1988). Spätere Untersuchungen deuten jedoch auf ein, dazu im Widerspruch stehendes, „Solid-state“-Modell hin, bei dem von permanent assoziierten Komplexen ausgegangen wird. Diese Superkomplexe wurden in *S. cerevisiae* (Arnold et al., 1998; Cruciat et al., 2000), in *B. taurus* (Schagger et al., 2000) und in Pflanzen (Eubel et al., 2004; Krause et al., 2004) nachgewiesen. Abbildung 3 zeigt das Strukturmodell eines Superkomplexes aus Komplex I und dimerem Komplex III im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 auf der Basis von elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei 18 Å (Dudkina et al., 2005).

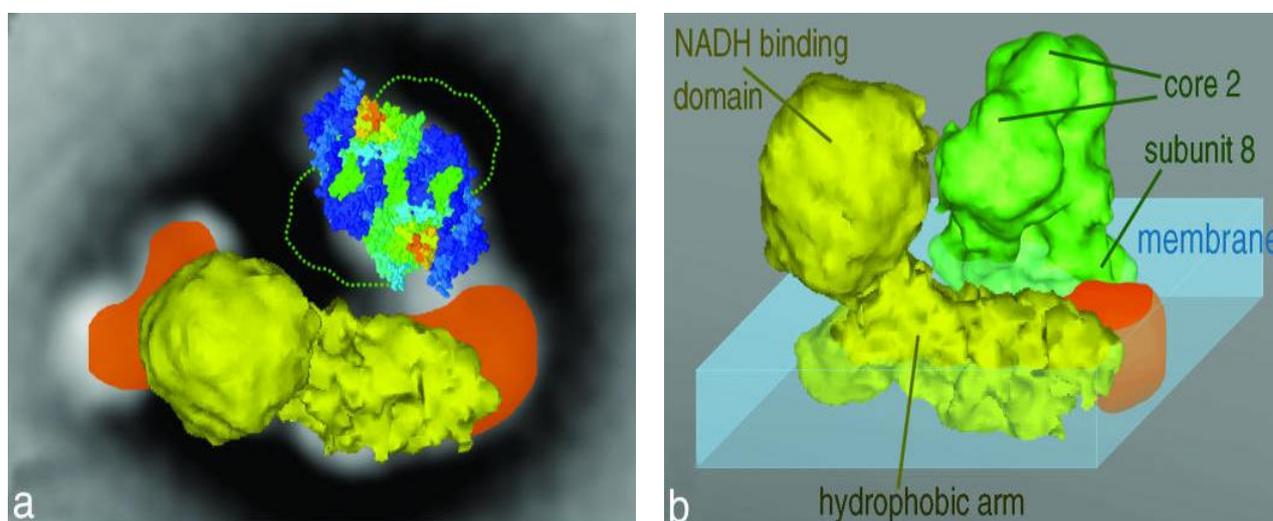


Abbildung 3: Strukturmodell des I+III<sub>2</sub> Superkomplex in der Pflanze *Arabidopsis thaliana* auf der Basis von Röntgenaufnahmen und elektronenmikroskopischen Daten bei 18 Å. In (a) ist die Aufsicht aus dem Matrixraum dargestellt. Komplex I (gelb) liegt im Superkomplex vergrößert vor (orange) und verbindet sich mit der unteren membranständigen Hälfte von Komplex III (farbige Struktur). Der hydrophile Bereich von Komplex III im Matrixraum ist durch die gestrichelte grüne Linie dargestellt. In (b) ist dieselbe Struktur in einem 45° Winkel zur Membranebene zu sehen (Dudkina et al., 2005).

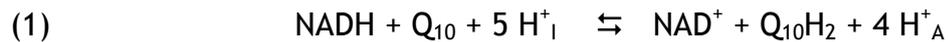
Vergleichbare Komplexe sind bereits seit längerem in Bakterien bekannt, wobei Stroh et al. den ersten bakteriellen Superkomplex mit Komplex I isolierten (Berry et al., 1985; Sone et al., 1987; Niebisch et al., 2003; Stroh et al., 2004). In *N. crassa* wurden kürzlich neben einem Komplex I-Dimer auch Komplex I-III-IV bzw. III-IV Superkomplexe in den Deletionsmutanten *nuo29.9*, *nuo21* und *nuo51* gefunden (Marques et al., 2007).

Es werden verschiedene Funktionen für die gebildeten Respirasomen postuliert: eine effizientere Leitung der mobilen Elektronentransporter unter Vermeidung von Konkurrenzreaktionen (Substratchanneling) (Genova et al., 2003), die Sequestration von reaktiven Intermediaten (Smeitink et al., 2001), die Stabilisierung der beteiligten Komplexe (Acin-Perez et al., 2004), eine Kapazitätssteigerung der inneren Mitochondrienmembran für die Proteininsertion (Arnold et al., 1998) sowie die Ausbildung der spezifischen Mitochondrienmorphologie (Paumard et al., 2002).

Für Komplex I scheint die Bildung von Superkomplexen eine besondere Bedeutung zu haben, da eine Mutation in Genen, die Untereinheiten von Komplex III oder IV kodieren, die Assemblierung stark beeinträchtigen (Acin-Perez et al., 2004; Schagger et al., 2004; Diaz et al., 2006; McKenzie et al., 2006). Einen weiteren Hinweis auf die Rolle der Respirasomen bei der Assemblierung und Stabilisierung von Komplex I bietet die Integration eines inaktiven Komplex I in einen I-III-IV Superkomplex (Marques et al., 2007). In Maus- und Humanzelllinien wurden bei Inaktivierung von Untereinheiten von Komplex IV eine normale bis überregulierte Komplex III-Aktivität bei gleichzeitig stark reduzierter Komplex I-Assemblierung beobachtet (Li et al., 2007). Während der Einfluss von Komplex III auf Komplex I durch die räumliche Nähe nicht weiter überrascht, deutet die Relevanz des weiter entfernten Komplex IV auf die Bildung von Superkomplexen hin.

## 2.4 Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase

Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) koppelt den Transfer von zwei Elektronen von NADH auf Ubichinon mit der Translokation von vier Protonen über die Cytoplasma- bzw. Mitochondrienmembran nach folgender Gleichung (Weiss et al., 1991):



I = negativ geladene Innenseite der Membran

A = positiv geladene Außenseite der Membran

$\text{Q}_{10}$  = Ubichinon-10

$\text{Q}_{10}\text{H}_2$  = Ubichinol-10

Komplex I stellt, mit einer molekularen Masse von ca. 1 MDa bei Eukaryoten und ca. 550 kDa bei Prokaryoten, das größte Enzym der Atmungskette dar. Durch Einzelpartikelanalyse elektronenmikroskopischer Aufnahmen von Komplex I aus *N. crassa* und *E. coli* wurde die in Abbildung 4 dargestellte dreidimensionale Struktur bestimmt.

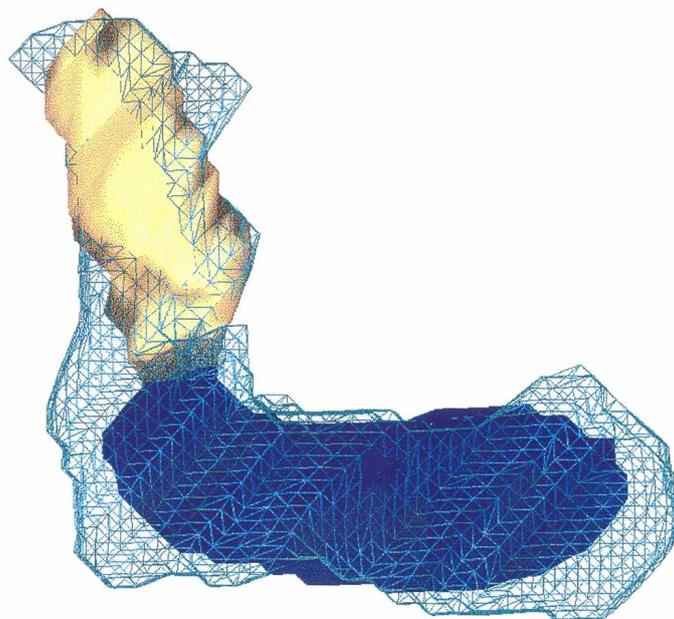


Abbildung 4: Dreidimensionale Darstellung von Komplex I aus *N. crassa* und *E. coli*. Für *N. crassa* gilt die Gitterstruktur und für *E. coli* der ausgefüllte Bereich. Der Membranarm ist dunkel und der periphere Arm hell dargestellt (Guenebaut et al., 1998).

Die resultierende L-förmige Struktur kann in zwei zueinander senkrecht stehende Bereiche von jeweils etwa 23 nm unterteilt werden (Hofhaus et al., 1991; Guenebaut et al., 1998). Der periphere Arm ragt ins Cytoplasma bzw. in die mitochondriale Matrix, während der andere Arm in die Membran eingebettet ist. Der Winkel zwischen beiden Armen ist variabel. Die bei niedrigen Salzkonzentrationen in *E. coli* gefundene hufeisenförmige Struktur (Böttcher et al., 2002) wurde allerdings in späteren Untersuchungen als Komplex I-Dimer identifiziert (Sazanov et al., 2003).

Der bakterielle Komplex I stellt mit 13 - 15 Untereinheiten die Minimalform des Enzyms dar (Yagi et al., 2003; Hinchliffe et al., 2006). Dabei bilden in der Regel sechs bis acht Untereinheiten den peripheren und sieben den membranständigen Arm. Der mitochondriale Komplex I besitzt neben den Homologen zu den Untereinheiten der Minimalform noch bis zu 32 weitere, so genannte akzessorische Untereinheiten (Carroll et al., 2003; Hirst et al., 2003; Gabaldon et al., 2005). Die sieben Homologen zu den membranständigen Untereinheiten der Minimalform werden von der mitochondrialen DNA kodiert und bilden zusammen etwa 52 - 59 Transmembranhelices aus (Brandt, 2006). Sie werden von den mitochondrialen Genen ND1 bis ND6 und ND4L kodiert und an mitochondrialen Ribosomen synthetisiert. Die übrigen Untereinheiten des Membranarms, sowie alle Untereinheiten des peripheren Arms sind kernkodiert und werden posttranslational in die Mitochondrien importiert.

Die Funktionen der akzessorischen Untereinheiten sind zum größten Teil ungeklärt. Es wird angenommen, dass sie ein isolierendes Gerüst um die Minimalform bilden, um den Verlust von Elektronen und dadurch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu verhindern (Robinson, 1998). Für die Bildung von so genannten Superkomplexen sollen akzessorische Untereinheiten als Andockstellen dienen (Budde et al., 2000).

Einige der akzessorischen Untereinheiten weisen eine bemerkenswerte Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen auf. So wird für zwei Untereinheiten ein Zusammenhang zum Fettsäuremetabolismus postuliert. Die 9.6 kDa-Untereinheit

des peripheren Arms wurde als Acyl-Carrier-Protein (ACP) mit einer Serin-gebundenen Phosphopantotheingruppe als Cofaktor identifiziert. Die Inaktivierung des ACP-Gens führt zu einer gestörten Komplex I-Assemblierung und der Vervielfachung der mitochondrialen Lysolipidmenge (Zensen et al., 1992; Schneider et al., 1995). Die 40 kDa-Untereinheit zeigt Ähnlichkeiten zur Familie der Reduktasen/Isomerasen und besitzt ein fest gebundenes NAD(P)H-Molekül. Das Fehlen dieser Untereinheit führt trotz Assemblierung von Komplex I zur Blockierung des Elektronentransports (Fearnley et al., 1992; Schulte et al., 1999).

Drei weitere Untereinheiten sind vermutlich an der Regulierung der Komplex I-Aktivität durch die Phosphorylierung bestimmter Serine beteiligt. So zeigt in *B. taurus* das Fehlen der Untereinheit MWFE, welche an Serin 55 phosphoryliert wird, einen erheblichen Effekt auf die Komplex I-Aktivität (Chen et al., 2004; Yadava et al., 2004). Außerdem erfolgt in *B. taurus* eine Phosphorylierung am Serin 20 der Untereinheit ESSS (Chen et al., 2004), statt wie ursprünglich angenommen an der gleichgroßen 18 kDa großen Untereinheit AQDQ (Scacco et al., 2000). Die physiologische Relevanz der Phosphorylierung der in *B. taurus* vorkommenden 42 kDa-Untereinheit an Serin 59 wird auf Grund ihres Fehlens im Menschen und in Mäusen als gering eingestuft (Schilling et al., 2005).

Die Untereinheiten 11.3, 12.3, 20.8 und 20.9 kDa enthalten mehrere konservierte Cysteine und scheinen in die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern (FeS-Cluster) involviert zu sein (Videira, 1998; Cardol et al., 2004).

Zwei Untereinheiten, 11.5 und 29.9 kDa in *N. crassa*, sollen an der Aktivierung und Deaktivierung von Komplex I beteiligt sein (Marques et al., 2005; Ushakova et al., 2005). Allerdings zeigten aktuelle Untersuchungen, dass die 11.5 kDa-Untereinheit lediglich zur Stabilisierung und Assemblierung von Komplex I notwendig ist (Marques et al., 2007).

Weitere Untereinheiten, die sich durch hydrophobe Transmembranbereiche auszeichnen, werden für die Förderung und Koordination der Assemblierung von mitochondrial kodierten Untereinheiten postuliert (Abdrakhmanova et al., 2004).

Die NADH-Bindestelle und alle bekannten Redoxgruppen befinden sich im peripheren Arm (Hinchliffe et al., 2005). Es handelt sich dabei um ein nicht kovalent gebundenes Flavinmononukleotid (FMN) und neun FeS-Cluster bei Prokaryoten bzw. acht FeS-Cluster bei Eukaryoten. In *N. crassa* wurden mittels ESR-Spektroskopie das binukleare FeS-Zentrum N-1 und die tetranuklearen FeS-Zentren N-2, N-3 und N-4 (Wang et al., 1991) sowie mittels UV/VIS-Spektroskopie zwei zusätzliche tetranukleare FeS-Zentren N-6a und N-6b identifiziert (Rasmussen et al., 2001). Weiterhin wurden die binuklearen FeS-Zentren N-1a und N-1b (Yano et al., 1996; Ohnishi, 1998) und das tetranukleare FeS-Zentrum N-5 (Djafarzadeh et al., 2000) charakterisiert. In *E. coli* wurde schließlich das in Eukaryoten vermutlich fehlende FeS-Zentrum N-7 nachgewiesen (Nakamaru-Ogiso et al., 2005; Uhlmann et al., 2005). Die in Abbildung 5a dargestellte Röntgenkristallstruktur des peripheren Arms in *T. thermophilus* bestätigt und ergänzt die spektroskopischen Daten (Hinchliffe et al., 2006).

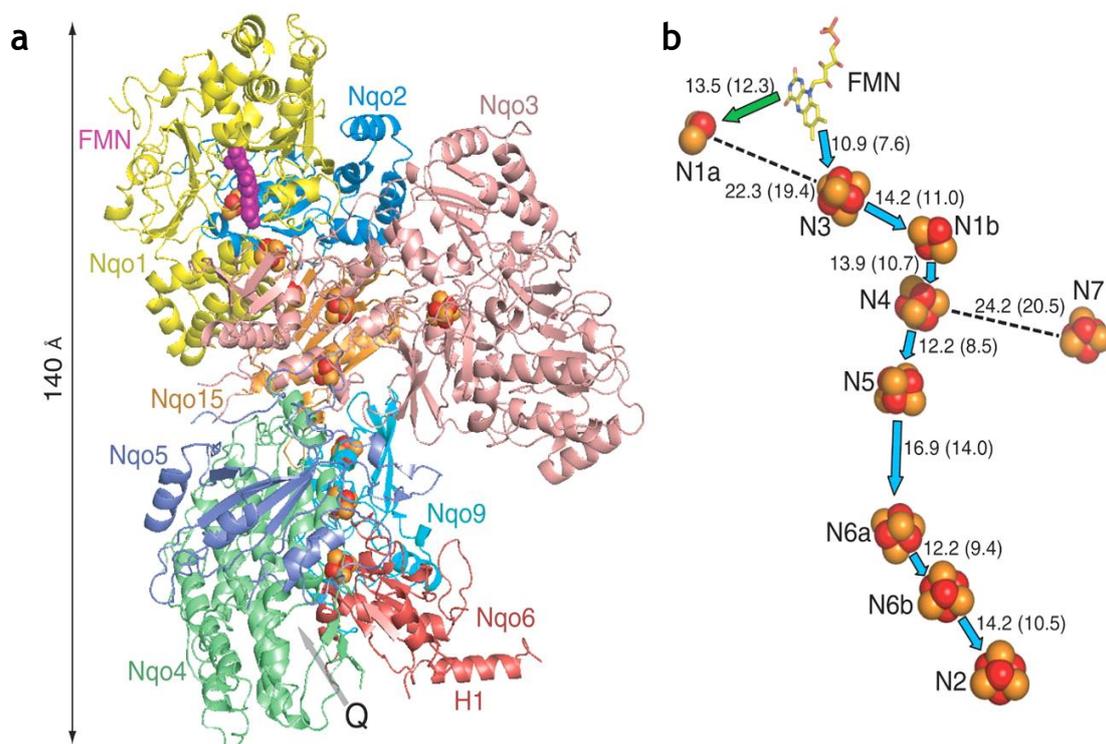


Abbildung 5: Kristallstruktur und Elektronenweg von Komplex I. (a) Kristallstruktur des peripheren Arms von Komplex I aus *T. thermophilus*. Proteinogene Untereinheiten sind als Bänderstrukturen dargestellt. Redoxgruppen als eingelagerte Kugeln (FMN: violett; FeS-Zentren: gelb-rot). Die vermutliche Ubichinon-Bindestelle ist durch ein Q markiert. (b) Elektronenweg entlang des FMN und der acht FeS-Zentren durch den peripheren Arm (Sazanov et al., 2006).

Demnach besitzt der periphere Arm eine Y-förmige Struktur mit einer Höhe von 140 Å. Der gesamte Elektronenweg bis zum FeS-Zentrum N-2 weist eine Distanz von 95 Å auf. In der Nähe des FMN ist die NADH-Bindestelle lokalisiert. FMN akzeptiert zwei Elektronen von NADH, wobei die Elektronen nur nacheinander über die FeS-Zentren transportiert werden können. Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) am FMN zu verhindern, wird das zweite Elektron auf das konservierte N-1a übertragen (Hincliffe et al., 2005; Sazanov, 2007). Von FMN erfolgt der Elektronentransfer über die FeS-Zentren N-3, N-1b, N-4, N-5, N-6a, N-6b auf N-2. Wie Elektronen auf Ubichinon übertragen werden, ist bislang unbekannt. Die Identifizierung der 25 Å großen amphipathischen  $\alpha$ -Helix H1 der Untereinheit Nqo6 an der Schnittstelle zwischen peripherem und Membranarm lässt einen Kontakt zwischen beiden Armen und somit auch eine Elektronenweiterleitung vermuten.

Die Bindung und Reduktion von Ubichinon erfolgt am Membranarm (Friedrich et al., 1990). Aufgrund der Zuordnung zweier Klassen von Hemmstoffen der Ubichinonreduktion werden zwei Ubichinon-Bindestellen diskutiert (Friedrich et al., 1994). Die große Potentialdifferenz zwischen dem FeS-Zentrum N-2 ( $E_{m,7} = -160$  mV) und dem Ubichinon ( $E_{m,7} = +60$  mV) legt die Existenz einer weiteren Redoxgruppe im Membranarm nahe, da der reverse Elektronentransfer über eine solche Potentialdifferenz nicht möglich wäre (Gutman et al., 1972). UV/VIS und FT-IR-spektroskopische Untersuchungen deuten auf eine chinoide Redoxgruppe mit einem Mittenpotential von -80 mV hin (Schulte et al., 1998; Friedrich et al., 2000).

Der Mechanismus der Energiekopplung ist bisher ungeklärt. Es wird sowohl eine direkte, redoxgetriebene als auch eine indirekte, durch Konformationsänderung hervorgerufene Kopplung diskutiert. Für eine direkte Kopplung sprechen die pH-Abhängigkeit des FeS-Zentrums N2, sowie die Lokalisierung mehrerer polarer Aminosäurereste in dessen direkter Umgebung (Kashani-Poor et al., 2001). Für die indirekte Kopplung durch Konformationsänderung sprechen dagegen die große Distanz zwischen den Redoxgruppen und deren räumliche Trennung zu den Untereinheiten des Membranarms (Ohnishi et al., 2005). Dabei werden die drei, vermutlich von  $K^+/H^+$ - oder  $Na^+/H^+$ -Antiporthern abstammenden membranständigen Untereinheiten ND2, ND4, ND5 für die Protonentranslokationen verantwortlich

gemacht (Fearnley et al., 1992; Mathiesen et al., 2003). Die ungewöhnliche Stöchiometrie von vier Protonen zu zwei Elektronen lässt eine Kombination beider Mechanismen vermuten (Friedrich, 2001; Sazanov et al., 2006).

Die Umsetzung der hydrophoben Chinone setzt die Einbettung des Enzyms in Phospholipidmembranen voraus. In Detergenzlösung wird daher stattdessen die Katalysation der NADH-Oxidation durch wasserlösliche Oxidationsmittel, wie Hexacyanoferrat III (Ferricyanid) als Enzymaktivität gemessen.

## 2.5 Assemblierung von Komplex I

In *N. crassa* wurden durch *pulse-chase*-Markierung und mit Hilfe von Deletionsmutanten wichtige Erkenntnisse über die Assemblierung von Komplex I gewonnen. Die Assemblierung des peripheren und des membranständigen Arms erfolgt in *N. crassa* unabhängig voneinander, bevor diese zum vollständigen, intakten Enzymkomplex assoziiert werden (Tuschen et al., 1990). Defekte in Untereinheiten des einen Arms führen in der Regel zur Anhäufung des anderen Armes. Eine Mutation in der peripheren 9.6 kDa-Untereinheit oder der 9.8 kDa-Untereinheit des Membranarms verhindert allerdings nicht nur die Assemblierung des jeweiligen Arms, sondern beeinträchtigt auch die Assemblierung des Membranarms bzw. peripheren Arms (Schneider et al., 1995; Marques et al., 2003). Die Mutanten *nuo51*, *nuo40*, *nuo24*, *nuo21* und *nuo21.3b* bilden dagegen den kompletten Komplex I, wobei die jeweils betroffene Untereinheit fehlt (Alves et al., 1994; Fecke et al., 1994; Almeida et al., 1999; Ferreirinha et al., 1999; Schulte et al., 1999). Die Bezeichnung von Komplex I-Mutanten setzt sich dabei aus dem Enzymnamen (*nuo* für NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase) und der molekularen Masse in kDa, der durch Gen-disruption fehlenden Untereinheit, zusammen. Die Mutanten *nuo51* und *nuo21.3b* weisen keinerlei bzw. stark beeinträchtigte NADH-Oxidase-Aktivität auf, während die anderen Mutanten eine vom Wildtyp nicht zu unterscheidende Aktivität zeigen. Grundsätzlich weisen Komplex I-Mutanten keinen ausgeprägten Phänotyp auf, sondern zeichnen sich lediglich durch verlangsamtes Wachstum und verminderte Konidienbildung aus.

Der Membranarm entsteht durch Assoziation einer großen und einer kleinen Membranarmvorstufe (Nehls et al., 1992; Schulte et al., 1994). Es wurden zwei Hilfsproteine identifiziert, welche Bestandteil der großen Membranarmvorstufe sind, aber im vollständig assemblierten Komplex I nicht mehr nachgewiesen werden können. Beide Proteine sind spezifisch für Komplex I und essentiell für die Assemblierung des Membranarms (Küffner et al., 1998). Entsprechend ihrem Wirkungsort und ihrer molekularen Masse werden sie als CIA84 und CIA30 (*complex I intermediate associated protein*) bezeichnet (Abbildung 6).

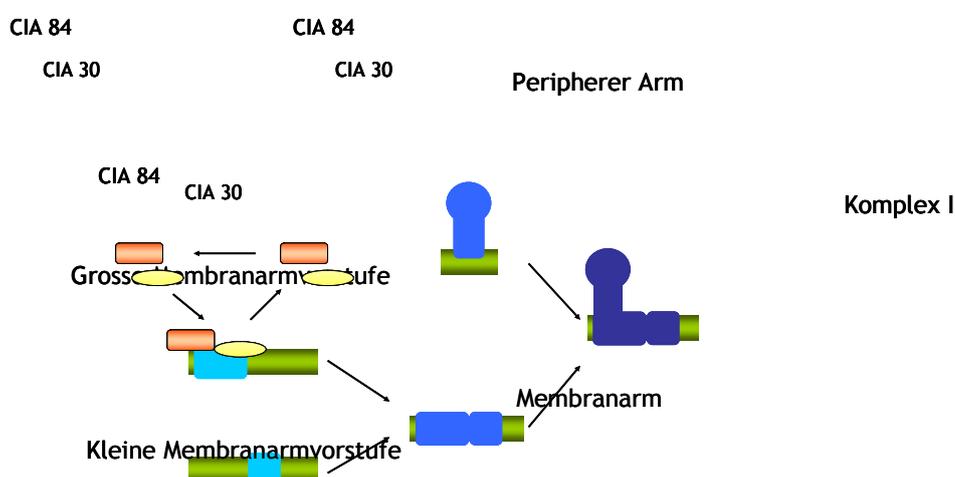
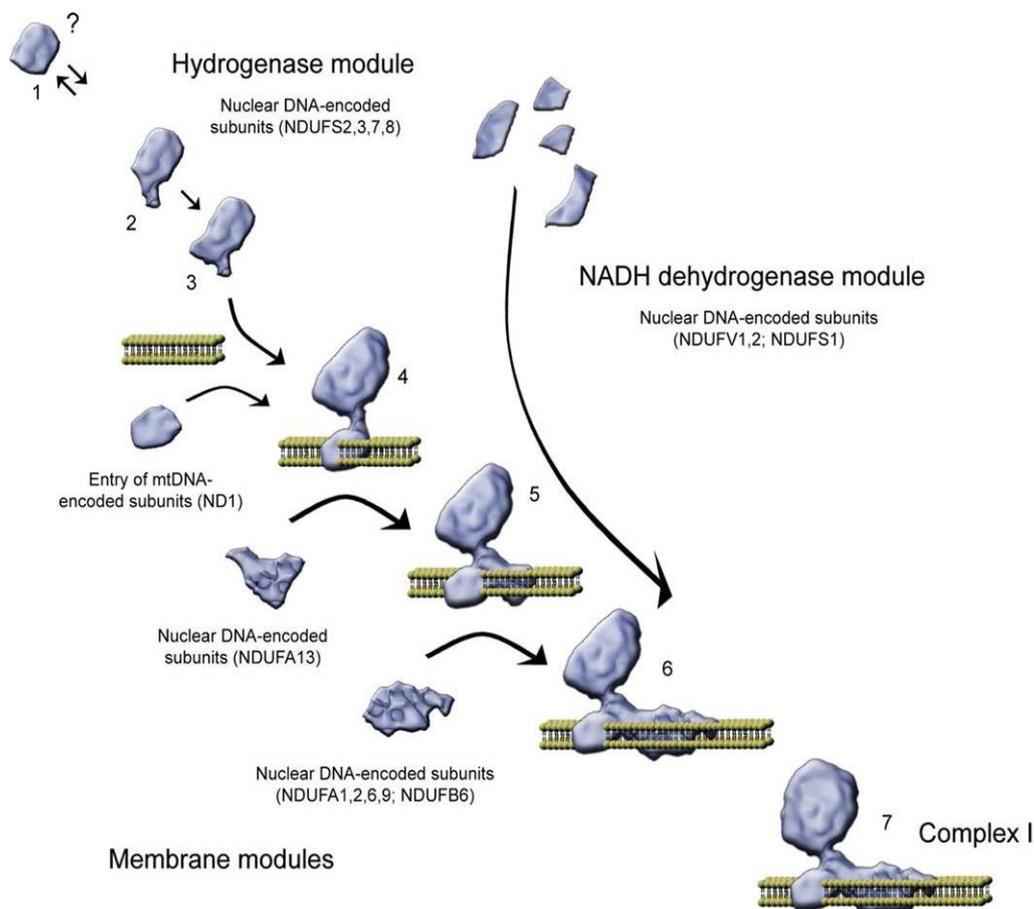


Abbildung 6: Assemblierungsschema von Komplex I in *N. crassa*. Die verschiedenen Blautöne stellen den Grad der Assemblierung von Komplex I dar (Schulte, 2001).

Ausgehend von den Erkenntnissen in *N. crassa* wurde in weiteren Arbeiten die Identifizierung des Assemblierungsprozesses im Menschen vorangetrieben. Die Untersuchungen von Muskelproben verschiedener Patienten mit Komplex I-Defekten ergaben nach Blue-Native-Gelelektrophorese ähnliche Fragmentmuster, aus denen sieben Vorstufen interpretiert wurden (Antonicka et al., 2003). Dabei wurden auch Vorstufen identifiziert, die Untereinheiten beider Arme enthalten. Der daraus abgeleitete Assemblierungsweg steht im direkten Widerspruch zu der in *N. crassa* postulierten, unabhängigen Bildung des peripheren und membranständigen Arms. Durch Arbeiten in einem konditionierten Komplex I-System mit regulierbarer Expression der mitochondrialen DNA, konnten die postulierten Assemblierungsintermediate allerdings nicht reproduziert werden. Vermutlich hat es sich dabei um

abgebaute oder fehlerhaft zusammengesetzte Produkte gehandelt (Ugalde et al., 2004). Zudem entspricht der Assemblierungspfad nach Antonicka et al. nicht der modularen Evolutionstheorie. Diese Theorie besagt, dass sich Komplex I aus verschiedenen Vorläuferproteinen entwickelt hat, welche den folgenden drei Funktionen zugeordnet werden können: der Elektronenaufnahme (Dehydrogenasemodul), dem Elektronentransport (Hydrogenasemodul) und der Protonentranslokation über die Membran (Transportmodul) (Friedrich et al., 1997). Das von Ugalde et al. aufgestellte Assemblierungsmodell bestätigt die in *N. crassa* postulierte unabhängige Bildung der beiden Arme. In humanen HEK293-Zellen mit intaktem Komplex I wurde durch GFP-Markierung die modulare Assemblierung auf der Basis evolutionärer Konservation bestätigt (Vogel et al., 2007). Allerdings zeigt der in Abbildung 7 dargestellte Assemblierungsweg eine frühzeitige mitochondriale Verankerung des Hydrogenasemoduls des peripheren Arms durch ND1.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der humanen Komplex I-Assemblierung. Die Assemblierung wird durch die Bildung des kernkodierten Hydrogenasemoduls initiiert, welches in weiteren Schritten in der mitochondrialen Membran verankert und durch das NADH-Dehydrogenasemodul und weitere Membranfragmente erweitert wird (Vogel et al., 2007).

Eine weitere Alternative bietet das Assemblierungsmodell in Abbildung 8, bei der die Assemblierung durch die Synthese von mitochondrial-kodierten Untereinheiten ausgelöst wird (Lazarou et al., 2007). Neben der Neusynthese wird die Regeneration durch Austausch von vorhandenen mit neu importierten Untereinheiten postuliert. Dieser Austausch wurde insbesondere bei Superkomplexen beobachtet und soll der Vermeidung von Zellschäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dienen.

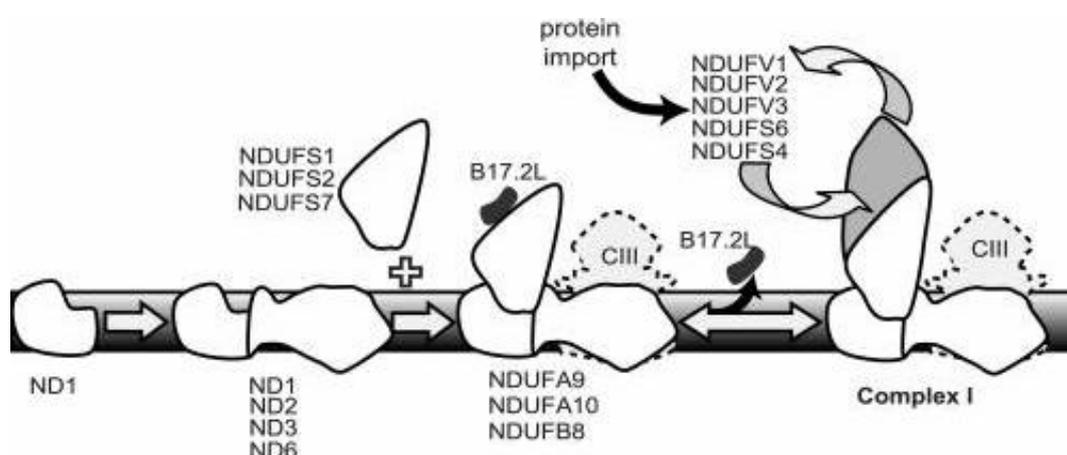


Abbildung 8: Schematische Darstellung der humanen Komplex I-Assemblierung unter Stabilisierung durch Komplex III (CIII) und Unterstützung durch das Hilfsprotein B17.2L (Lazarou et al., 2007).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Assemblierung in weiten Teilen noch ungeklärt ist und auch die Frage nach der Übertragbarkeit von Modellen auf andere Organismen offen bleibt. Es besteht allerdings Konsens darüber, dass die Assemblierung durch die Kombination größerer Vorstufen und nicht durch eine Aneinanderreihung einzelner Untereinheiten erfolgt. Auch wenn viele Untersuchungen auf die Validität der modularen Evolutionstheorie hindeuten, sind weitere Untersuchungen notwendig, um ein besseres Verständnis der Biogenese von Komplex I zu erhalten. Aufgrund seiner enormen Größen sowie der Komplexität der mit der Assemblierung der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase verbundenen Prozesse ist die Notwendigkeit einer größeren Anzahl Hilfsproteine evident (Vogel et al., 2007).

## 2.6 Identifizierte Hilfsproteine für die Komplex I-Assemblierung

Bislang wurden fünf für Komplex I spezifische Hilfsproteine in verschiedenen Organismen identifiziert, von denen zwei bereits auf Grund anderer Funktionen bekannt waren. Von den oben beschriebenen CIA30 und CIA84 in *N. crassa* wurde ein humanes Homolog bislang nur zu CIA30 charakterisiert, welches durch das Gen NDUFAF1 kodiert wird (Vogel et al., 2005). Die Relevanz dieses Proteins für die Assemblierung des humanen Komplex I wurde eindringlich durch die Identifizierung eines Patienten mit CIA30-Defekt bewiesen (Dunning et al., 2007). Ein humanes CIA84 wurde bereits auf Sequenzebene identifiziert, aber eine Charakterisierung steht noch aus (Gabaldon et al., 2005). Auf Grund eines Vergleichs der Genome von Hefen mit und ohne Komplex I wurde das an der Assemblierung des humanen Komplex I beteiligte Hilfsprotein B17.2L identifiziert (Ogilvie et al., 2005). Dabei handelt es sich um ein hochkonserviertes Paralog von B17.2, einer kleinen Unter-einheit des Membranarms. Die Notwendigkeit des für den Zelltod verantwortlichen Flavoprotein AIF (apoptosis inducing factor) für die korrekte Assemblierung von Komplex I wurde in Mauszellen gezeigt, allerdings muss der Mechanismus noch weiter aufgeklärt werden (Vahsen et al., 2004). In jüngsten Untersuchungen wurde die Notwendigkeit des mit NDUFAF1 interagierenden Signalproteins Ecsit für die Stabilität und Assemblierung von Komplex I nachgewiesen (Vogel et al., 2007).

## 2.7 Der Modellorganismus *Neurospora crassa*

*N. crassa* ist auf Grund seiner alternativen NADH-Dehydrogenasen für die genetische Manipulation des damit nicht essentiellen Komplex I geeignet. Die zur Charakterisierung der anderen Atmungskettenkomplexe verwendete Hefe *S. cerevisiae* besitzt keinen Komplex I und stellt damit keine Alternative dar. Von Vorteil ist die leichte Kultivierbarkeit und einfache Handhabung des apathogenen Hyphenpilzes (Perkins et al., 2000). Für sein Wachstum werden neben einer Kohlenstoff- und einer Stickstoffquelle lediglich einfache Salze, wenige Spurenelemente und das Vitamin Biotin benötigt (Davis et al., 1970). Aufgrund der fast siebzigjährigen Verwendung als Modellorganismus existieren vielfältige Methoden zur genetischen Manipulation und biochemischen Analyse (Davis et al., 2002). Das Genom von *N. crassa* wurde vollständig sequenziert und durch öffentliche

Datenbanken<sup>a,b</sup> zugänglich gemacht (Mewes et al., 2002; Schulte et al., 2002; Galagan et al., 2003). Es besteht aus etwa 43 MBp, die auf sieben Chromsomen verteilt sind. Die Anzahl der proteinkodierenden Gene beläuft sich auf ca. 10.000 mit einer Durchschnittsgröße von 1.700 Bp. Durch das Fungal Genetics Stock Center der University of Missouri<sup>c</sup> wird ein umfangreiches Angebot von Wildtyp- und Mutantenstämmen zur Verfügung gestellt.

*N. crassa* gehört zu der Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) und zeichnet sich durch ein schlauchförmiges Sporangium, den Ascus, aus. Der Lebenszyklus von *N. crassa* in Abbildung 9 lässt sich in eine vegetative und eine generative Form der Vermehrung unterteilen.

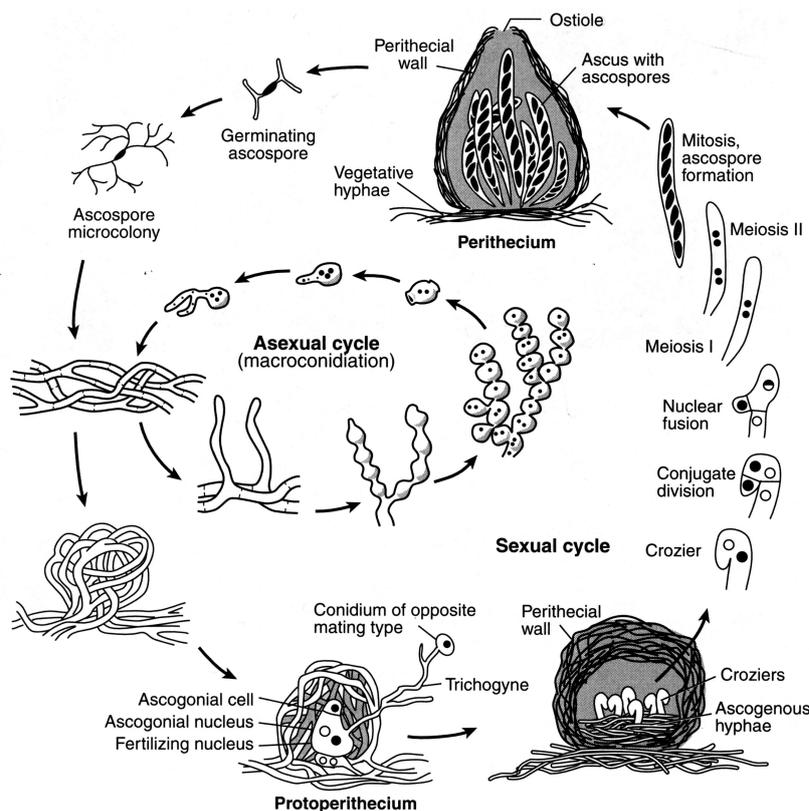


Abbildung 9: Lebenszyklus von *N. crassa* (Davis, 2000)

<sup>a</sup> MNCDB: MIPS *Neurospora crassa* database (<http://mips.gsf.de/projects/fungi/neurospora>)

<sup>b</sup> Broad Institut *Neurospora crassa* Database ([www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora))

<sup>c</sup> FGSC: Fungal Genetics Stock Center (<http://www.fgsc.net>)

Die vegetative Form weist verzweigte, mehrkernige und schlauchartige Zellen auf. Diese so genannten Hyphen werden in ihrer Gesamtheit als Mycel bezeichnet. Dabei unterscheidet man zwischen Substrathyphen, die zur Stoffaufnahme in das Substrat eindringen, und Lufthyphen, die sich in den Luftraum erheben und der Ausbreitung dienen. Beide Vermehrungsarten erfolgen über Sporen, wobei zwischen den vegetativen Makro- und Mikrokonidien und den generativen Ascosporen unterschieden wird. Die durch Abschnürung von Lufthyphen gebildeten, orangefarbenen Makrokonidien besitzen im Durchschnitt zwei bis drei Kerne und haben eine Größe von 4 - 7  $\mu\text{m}$  (Huebschmann, 1952). Sie stellen die häufigste Verbreitungsform für *N. crassa* dar (Lowry et al., 1967). Die einkernigen Mikrokonidien weisen eine Größe von 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$  auf und werden nicht über den Luftraum übertragen, sondern bleiben traubenförmig am Muttermycel haften (Fincham et al., 1979). Sie werden erst zu einer späteren Entwicklungsphase des Pilzes gebildet und zeichnen sich durch eine geringere Lebensdauer aus. Der vegetative Lebenszyklus ist in Abbildung 10 gesondert dargestellt.

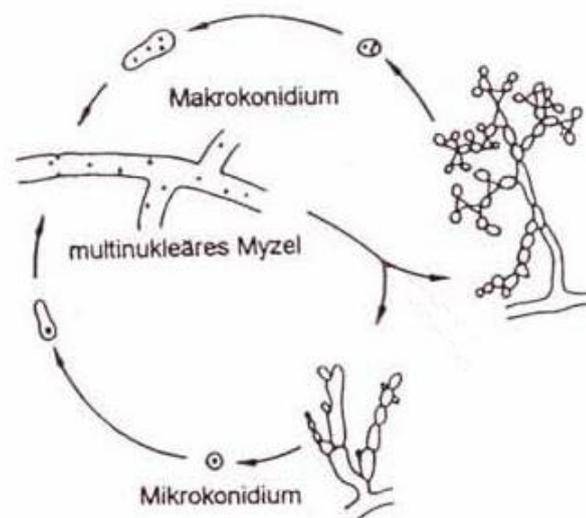


Abbildung 10: Vegetativer Lebenszyklus von *N. crassa* (Fincham et al., 1979)

Die vegetative Vermehrung ist im Gegensatz zur generativen Vermehrung nicht mit einem Kernphasenwechsel verknüpft und dient lediglich der Ausbreitung des Pilzes. Die generative Ausbreitung erfolgt durch langlebige Ascosporen, die durch einen sexuellen Prozess zwischen den Kreuzungstypen A und a von *N. crassa* gebildet werden. Die selbst-inkompatiblen Stämme bilden sowohl männliche wie auch weibliche Keimzellen aus. Der generative Zyklus wird durch Nährstoffmangel

ausgelöst und führt zu acht haploiden Ascosporen, welche im schlauchförmigen Ascus entwickelt werden. Nach ihrer Reifung werden die Ascosporen aus dem Ascus herausgeschleudert. Die Aktivierung der Sporen erfolgt durch Hitze, z.B. durch Waldbrände (Davis et al., 1970).

Im Labor kann durch unterschiedliche Ausgangsbedingungen die Ausbildung von Makro- bzw. Mikrokonidien beeinflusst werden. Dabei wird die Ausbildung von Makrokonidien durch Reduzierung der Feuchtigkeit und der CO<sub>2</sub>-Konzentration, sowie durch ständige Beleuchtung bei 28°C gefördert. Im Gegensatz dazu werden durch Inkubation unter erhöhter Luftfeuchtigkeit und verringerter Stickstoffkonzentration bei 20 - 25°C vermehrt Mikrokonidien erhalten (Maheshwari, 1999). Die Bildung wird durch Zugabe von Iodacetat und Inkubation bei Dunkelheit weiter verstärkt (Ebbole et al., 1990). Durch Genmutation wurden *N. crassa*-Stämme erhalten, die bevorzugt eine der beiden Konidienarten ausbilden (Maheshwari, 1991).

## **2.8 Ungezielte Mutagenese durch Insertion eines Resistenzgens**

Die Bedeutung von Hilfsproteinen für die Assemblierung von Komplex I wird insbesondere anhand der Auswirkungen auf Grund einer Inaktivierung der sie kodierenden Gene deutlich. Für die in 2.6 beschriebenen Proteine geschah dies vor allem durch gezielte Mutagenese. Alternativ kann die Geninaktivierung auch zur Identifikation bisher unbekannter Proteine genutzt werden, die für die Assemblierung von Komplex I wichtig sind. Dazu wird zunächst eine ungerichtete Mutagenese durchgeführt und anschließend die interessanten Mutanten anhand ihrer Eigenschaften ausgewählt. Da durch ungezielte Mutagenese eine Vielzahl von Klonen produziert wird, ist ein effizientes Selektionsverfahren notwendig. Das Verfahren der Identifizierung von Hilfsproteinen durch ungerichtet erzeugte Mutanten kann in drei Schritte unterteilt werden: ungezielte Mutagenese, Selektionsverfahren und Charakterisierung der Mutationen.

### 2.8.1 Ungezielte Mutagenese

Für die ungezielte Mutagenese eignen sich verschiedene Methoden, wie der gut dosierbare Einsatz von Röntgen- und UV-Strahlen (Beadle et al., 1941; Lindegren et al., 1941) oder von mutagenen Reagenzien wie Salpetrige Säure und Nitrit (Sherman, 1964; Malling, 1965). Die anschließende Lokalisierung der betroffenen Gene durch Komplementation mittels cDNA ist allerdings aufwendig und stellt somit einen großen Nachteil dieser Methoden dar (Akins et al., 1985). Eine Alternative ist die Insertionsmutagenese per Transformation mit Fremd-DNA, die eine nachfolgende Ermittlung der Insertionsstelle mittels PCR ermöglicht (Paietta et al., 1985). Dazu wird Fremd-DNA, die einen Selektionsmarker enthält, in das Genom von *N. crassa* integriert, so dass das Leseraster gestört ist und zu einer Inaktivierung des Gens führt. Zur Transformation werden die Zellwände mit entsprechenden Enzymen lysiert. In der Cytoplasmamembran der Protoplasten werden mittels elektrischer Impulse hydrophobe Poren gebildet, so dass die Fremd-DNA von der Zelle aufgenommen werden kann. Dieses Verfahren wird als Elektroporation bezeichnet (Chakraborty et al., 1990).

In dieser Arbeit wurde als Selektionsmarker das *bar-Gen* aus dem pKSbar2-Plasmid verwendet (Abbildung 11).

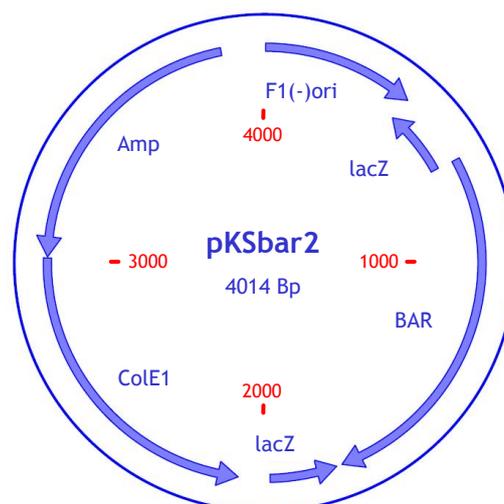


Abbildung 11: Schematische Darstellung des pKSbar2-Plasmids. Das Plasmid enthält neben dem *bar-Gen* (BAR), ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp), einen Replikationsursprung (f1(-)ori) aus dem Bakteriophagen, ColE1 aus *E. coli* und einen Promotor des Laktose-Operons (lacZ).

Dieses Gen verleiht durch Acetylierung eine Resistenz gegen das Herbizid Phosphinothricin Basta<sup>®</sup> (Avalos et al., 1989) und kommt ursprünglich aus dem Organismus *Streptomyces hygroscopicus*. Phosphinothricin wirkt durch Hemmung der Glutamin-Synthase, welche die Reaktion von Glutamat und Ammonium zu Glutamin katalysiert. Die Hemmung dieser Reaktion geht mit einer toxisch ansteigenden Ammoniumkonzentration in der Zelle einher. Auf einem geeigneten Basta-haltigen Medium können somit nur Klone wachsen, bei denen die Transformation erfolgreich verlaufen ist.

### 2.8.2 Selektion von Komplex I-Mutanten

Bei statistischer Insertion des *bar-Gens* kann die Wahrscheinlichkeit einer Mutation in Komplex I durch ungezielte Mutagenese wie folgt berechnet werden. In *N. crassa* sind bislang 39 Komplex I-Untereinheiten kodierende Gene bekannt. Unter der Annahme von zehn zusätzlichen Genen, welche Hilfsproteine für die Assemblierung kodieren, kommt man auf ca. 50 für Komplex I-spezifische Gene. Da das Genom von *N. crassa* aus etwa 10.000 Genen besteht, betreffen nur 0,5 % aller induzierten Defekte Gene von Komplex I. Bei Annahme von 50 % stillen Mutationen in intergenischen Bereichen ergibt sich ein Anteil von ca. 0,25 %. Somit wäre bei jeder vierhundertsten Mutante ein Komplex I-Defekt zu erwarten.

Zur eindeutigen Identifizierung eines Komplex I-Defektes ist ein verhältnismäßig aufwendiger enzymatischer Test notwendig. Dazu werden isolierte Mitochondrien solubilisiert und die extrahierten Proteine entsprechend ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit durch Zuckergradientenzentrifugation aufgetrennt. Die NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität der einzelnen Fraktionen wird photometrisch bestimmt. Die entscheidende Voraussetzung zur effizienten Identifizierung ungerichtet erzeugter Mutanten ist daher ein einfaches und spezifisches Selektionsverfahren. Das Verfahren muss geeignet sein, mehrere Tausend mutierte Kolonien in überschaubarer Zeit zu analysieren. Ein solches Verfahren wurde auf der Basis von phänotypischem Wachstumsverhalten in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe entwickelt (Tsaladra, 2004; Golestani, 2004).

Komplex I-Mutanten weisen durch das Vorhandensein der internen, alternativen NADH-Dehydrogenasen keinen auffälligen Phänotyp auf, d.h. der Verlust bei der Energiekonservierung aufgrund eines defekten Komplex I hat keine großen Auswirkungen auf das Wachstum. Bei gleichzeitiger Störung in den Atmungskettenkomplexen III oder IV ist dagegen ein deutlicher Effekt erkennbar. Ein vollständiger Verlust der Energiekonservierung in der Atmungskette ist für den Pilz letal (Tsalastra, 2004). Für eine auf Wachstumsunterschieden basierende Selektion ist daher ein regulierbarer Defekt in einem weiteren Komplex notwendig.

Für diese Arbeit wurde der Stamm *cuco5* verwendet, bei dem die Bildung der FeS-Untereinheit von Komplex III durch den Chinasäure-induzierbaren *qa2*-Promotor reguliert wird (Tsalastra, 2004). Bei Anwesenheit von Chinasäure im Medium wird dieser Promotor angeschaltet, indem Chinasäure an den Repressor bindet und dadurch die Expression der kontrollierten Gene ermöglicht. Bei Abwesenheit von Chinasäure wird eine Repression der Transkription hervorgerufen (Giles et al., 1991). Die Komplex III-Aktivität des *cuco5*-Stammes in Abwesenheit von Chinasäure ist gering und wird durch Chinasäure deutlich gesteigert. Bei Abwesenheit von Chinasäure wird eine Beeinträchtigung des Wachstums beobachtet.

Die Auswirkungen eines Komplex I-Defekts im Stamm *cuco5* lassen sich anhand einer Komplex I/III-Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* untersuchen. Diese Doppelmutante wurde durch Kreuzung der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5* und der Komplex I-Mutante *nuo20.9* isoliert. Die Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* zeigt hinsichtlich des Wachstumsverhaltens eine deutlich stärkere Abhängigkeit von Chinasäure im Vergleich zu *cuco5*. Bei Abwesenheit von Chinasäure ist eine erhebliche Beeinträchtigung im Wachstum der Doppelmutante zu verzeichnen.

Abbildung 12 zeigt den Wachstumsvergleich der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* auf Sorboseagar mit und ohne Chinasäure.

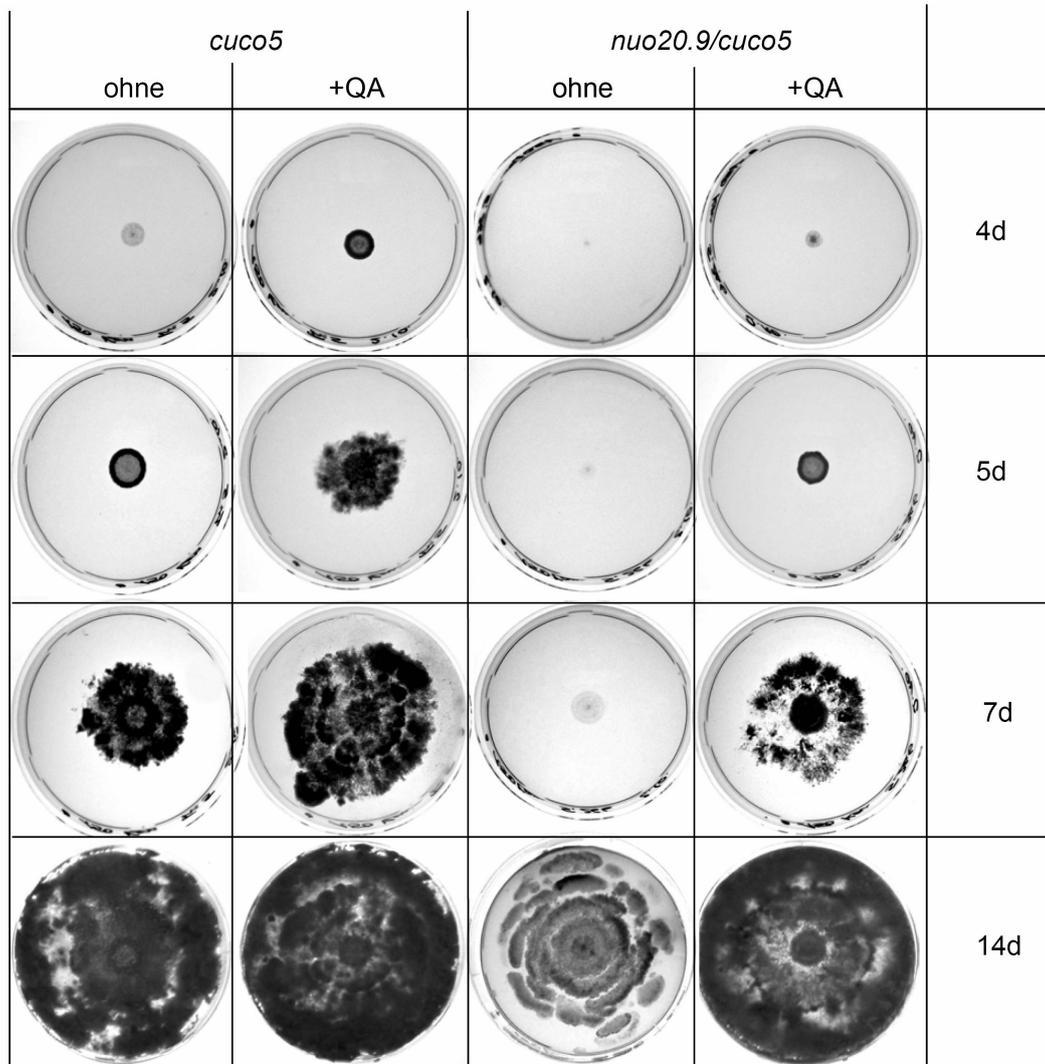


Abbildung 12: Wachstumsvergleich der Mutanten *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* auf Sorboseplatten mit (+QA) und ohne Chinasäure. Pro Platte wurden 150 Konidien zentral aufgetragen. Dargestellt sind die Platten nach 4, 5, 7 und 14 Tagen (Tsalastra, 2004).

Nach Mutagenese von *cuco5* sollten sich Mutanten mit einem Komplex I-Defekt daher auf Grund ihres chinasäureabhängigen Wachstums erkennen lassen.

### 2.8.3 Charakterisierung der Insertionsstelle

Der dritte Schritt bei der Identifizierung von Komplex I-Assemblierungsproteinen ist die Bestimmung der von der Mutation betroffenen Gene. Die in Abbildung 13 dargestellte Vektorette-PCR stellt eine effiziente Methode zur Charakterisierung von unbekanntem Integrationsstellen und somit der Position des *bar*-Gens im Genom von Insertionsmutanten dar (Riley et al., 1990; Hagiwara et al., 1996).

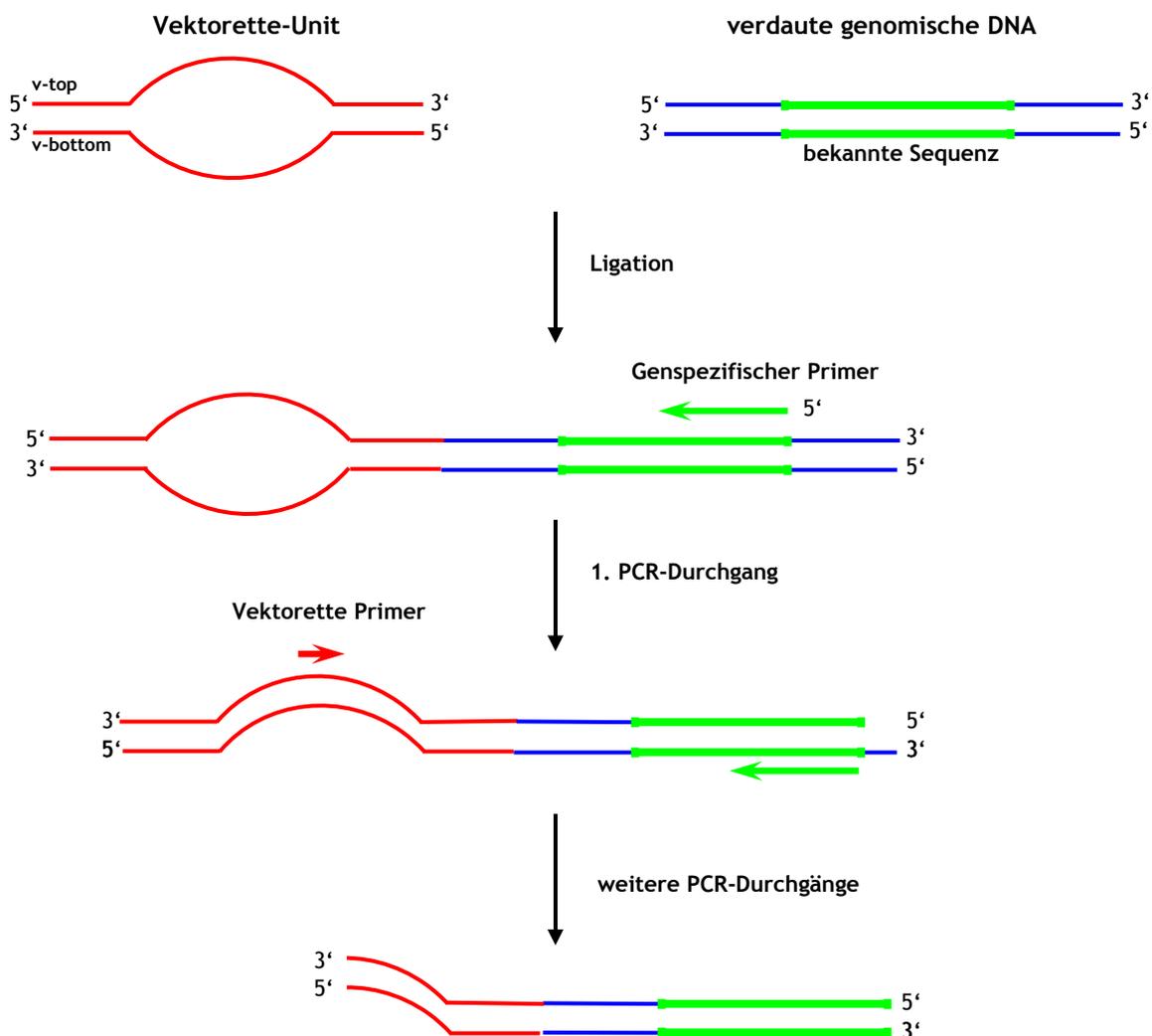


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Vektorette-PCR (nach Hagiwara et al., 1996).

Die zu untersuchende DNA wird mittels Restriktionsendonukleasen fragmentiert, welche glatte Enden („blunt-ends“) erzeugen. Bei der Wahl der Restriktionsenzyme ist zu beachten, dass deren Erkennungssequenz nicht zwischen dem genspezifischen Primer und der unbekanntem genomischen DNA lokalisiert ist. An

die geschnittene DNA wird eine Vektorette-Einheit ligiert. Bei der Vektorette-Einheit handelt es sich um ein doppelsträngiges Oligonukleotid aus 53 Bp mit bekannter Sequenz, wovon aber nur die ersten und letzten 12 Bp komplementär sind, so dass sich in der Mitte eine 29 Bp große Blase bildet. Nachdem die unbekannte DNA von dem Insert und der Vektorette-Einheit flankiert ist, kann der zur Vektorette-Einheit komplementäre Primer an dem in dem ersten PCR-Zyklus entstehenden Strang binden. Dadurch wird eine unerwünschte Amplifizierung von DNA-Bereichen, die lediglich zwischen zwei Vektorette-Einheiten lokalisiert sind, unterdrückt.

Eine Weiterentwicklung der Vektorette-PCR stellt die in Abbildung 14 gezeigte Splinkerette-PCR dar (Devon et al., 1995; Hui et al., 1998).

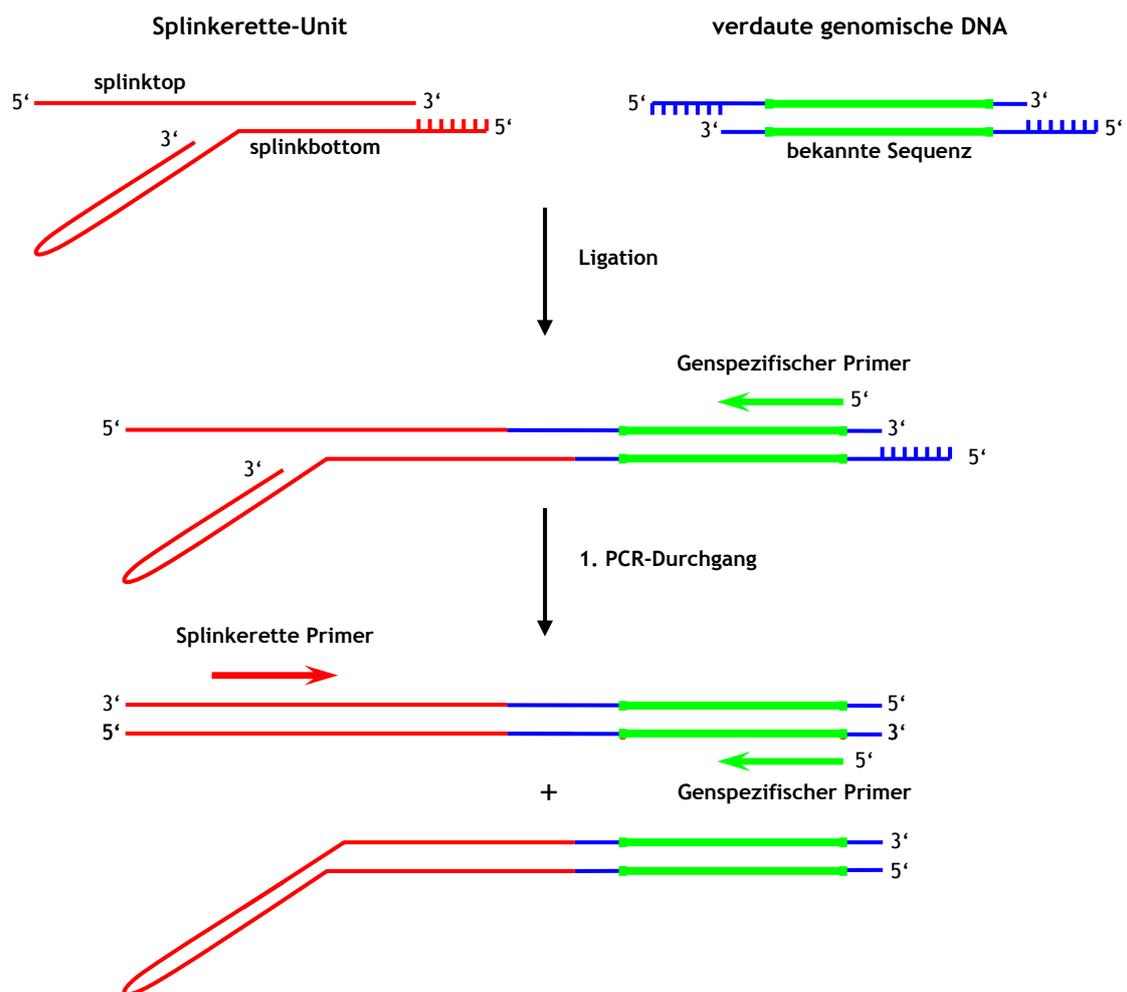


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Splinkerette-PCR (nach Devon et al., 1995).

Dieses Verfahren soll im Vergleich zur Vektorette-PCR die Bildung von Artefakten reduzieren. Hierzu werden Enzyme verwendet, die einen 5'-Überhang („sticky-ends“) erzeugen. An die so erzeugten Enden wird die Splinkerette-Einheit ligiert, die aus zwei Oligonukleotiden besteht. Der untere Strang („s-bottom“) bildet am 3'-Ende eine Haarnadelstruktur und am 5'-Ende einen Überhang aus. Der obere Strang („s-top“) ist zum 5'-Ende von s-bottom zu 1/3 komplementär. In dem ersten PCR-Zyklus kann, wie bei der Vektorette-PCR, nur der zur Insertion komplementäre Primer anlagern. Der Splinkerette-Primer kann erst an dem neu synthetisierten, zur s-bottom-Sequenz komplementären Strang binden. Die charakteristische Haarnadelstruktur der Splinkerette-Einheit hat eine Verlängerung des 3'-Ende zur Folge, welches zur Ausbildung einer stabileren Doppelbindung führt und dieses Ende damit für weitere PCR-Zyklen ungeeignet macht. Dadurch werden Artefakte verhindert, die bei der Vektorette-PCR auf Grund von Anlagerung der Enden („end-repair-priming“) auftreten. Durch die zusätzliche Verringerung von Primer-Fehlbindungen ist die Splinkerette-PCR insbesondere für die Amplifizierung von längeren DNA-Fragmenten ( $\geq 500$  Bp) besser geeignet.

## 2.9 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Weiterentwicklung und Anwendung des Verfahrens zur Identifizierung neuer, bislang unbekannter Hilfsproteine für die Assemblierung der NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase. Die Relevanz der weiteren Aufklärung der Komplex I-Assemblierung lässt sich durch medizinische Untersuchungen von Patienten mit Komplex I-Defekten eindrucksvoll belegen (Smeitink et al., 2001; Janssen et al., 2002; Thorburn et al., 2004). So waren nur für etwa 50 % der untersuchten Mutationen Defekte in bekannten Untereinheiten verantwortlich. Bei den restlichen Mutationen wurden Störungen von Hilfsproteinen für Komplex I angenommen (Dunning et al., 2007).

In dieser Arbeit wurde die ungezielte Mutagenese mittels Insertion eines Selektionsmarkers in die genomische DNA von *N. crassa* durchgeführt. Der Vorteil dieser Methode liegt in der Identifizierbarkeit der erzeugten Mutationen durch

Sequenzierung der Insertionsstelle. Vorarbeiten ließen vermuten, dass es für die Insertion der DNA bevorzugte Stellen im Genom gibt. Ein Ansatzpunkt für die Optimierung der Mutagenese war daher die Gestaltung des Selektionsmarkers.

Entscheidend für den Erfolg der Identifizierung von Komplex I-Mutanten ist die zeitlich effiziente Untersuchung der Vielzahl an ungerichtet erzeugten Transformanden. Als geeigneter Selektionsparameter kommt für ein solches Verfahren das Wachstumsverhalten in Frage. Da Komplex I-Mutanten keinen ausgeprägten Phänotyp aufweisen, wurde auf die mit Chinasäure regulierbare Komplex III-Mutante *cuco5* zurückgegriffen. Für eine eindeutige Identifizierung von Mutanten mit Komplex I-Defekt ist der NADH/Ferricyanid-Redoxaktivitätstest unumgänglich. Auf Grund des hohen Aufwandes müssen die Transformation und das Selektionsverfahren soweit optimiert werden, dass die Komplex I-Aktivität möglichst weniger, interessanter Klone bestimmt werden muss. Zur Überprüfung der Eignung eines Selektionsverfahrens stand die Doppelmutanten *nuo20.9/cuco5* zur Verfügung.

Bei der Charakterisierung der identifizierten Komplex I-Mutanten steht die Untersuchung der Insertionsstellen im Vordergrund. Dazu sollten PCR-basierte Methoden wie Vektorette- und Splinkerette-PCR eingesetzt werden. Zudem war von besonderem Interesse, ob die Mutationen spezifisch Komplex I betreffen oder auch Auswirkungen auf andere mitochondriale Funktionen haben.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Mikroorganismen und Plasmide

pKSbar2-Plasmid in *E. coli DH5 $\alpha$*  (Hanahan, 1983)

*N. crassa 7089/nuo20.9*

*N. crassa cuco5* (Tsalastra, 2004)

*N. crassa nuo20.9/cuco5* (Tsalastra, 2004)

#### 3.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma MWG-Biotech AG und wurden auf eine Endkonzentration von 100 pmol/ $\mu$ l eingestellt.

**Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide für die Vektorette-Einheit**

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`)
v-top	GAGAGGGAAGAGAGCAGGCAAGGAATGGAAGCTGTCTGTCGCAGGAGAGGAAG
v-bottom	CTTCCTCTCTGTCGCTAAGAGCATGCTTGCCAATGCTAAGCTCTCCCTCTC

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide für die Splinkerette-Einheit**

Bezeichnung	Sequenz (5`-3`)
s-top	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACCGTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCACACTAGTGC
s-bottom-XbaI	GATCCCACTAGTGTGCACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTCAAAAAA
s-bottom-HindIII	TCGACCACTAGTGTGCACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTCAAAAAA
s-bottom-EcoRI	TTAACCACTAGTGTGCACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTCAAAAAA
s-bottom-XmaI	GGCCCCACTAGTGTGCACACCAGTCTCTAATTTTTTTTTTCAAAAAA

**Tabelle 3: Übersicht der eingesetzten Primer**

Primerbezeichnung	Sequenz (5`-3`)
ampforneu	GACCGAGTTGCTCTT
ampforneu-2	AATACCGCGCCACATAGC
ampforneu-3	ACCGCTGTTGAGATCC
ampforseq	GATGCTGAAGATCAGTTG
amprev	TCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGG
amprevseq	ATAGACTGGATGGAGGC

Tabelle 4: Übersicht der eingesetzten Primer (Fortsetzung)

Primerbezeichnung	Sequenz (5`-3`)
Bar3	GGGATCCACTAGTTTCTCG
barcheckfor	CAGCCCACTTGTAAAGCAGTAG
barcheckrev	CAAGACCGGCAACAGGATTC
barhindfor	GGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATC
barhindfor-2	GAAGGCACGCAACGCCTACG
barhindrev	CGCACAAGTTATCGTGCACCAAGC
barhindrev-2	TGCTCACCGCCTGGACGACTAA
barforneu	CCTGCAGATCGTTCAAACATTTGG
barforseq-2005	GCGATGATTATCATATAATTTCTG
barforw-2005	AGATTGAATCCTGTTGCCGGTCTTGC
barrev-neu	TCAATTGTTGACCTCCAAGTCTCC
barseq2-2005	CTCCTTCAATATCATCTTCTGTGCGAGTCTAGTTCTAGAG
barseq3-2005	TCGAGTCTAGTTCTAGAGC
b11e5-0	CATTGCGTTCCTGTTATTATTCC
b11e5-1	TGAGCGTAGGTAGCATTAAAG
b11e5-2	AGGTCGATACATAGGTAAGT
b10c3-1	CTGTCTGTCTCCCTGTAAGTCTTG
b10c3-1a	GACACTAGCGTACATATTCC
b10c3-2	GGTATCGTGGCGGATGAAGAG
b10c3-3	TCCGTACCCTGTTTACTTGA
contig3.83-1	GCACCAATGGCATGTGATAG
contig3.83-2bi	ATCAGGTGTTGGAAAGGGTG
pUC5	GGCGATTAAGTTGGGTAACG
vektop-2005	TGTAACACGACGGCCAGTGTCTGTGCGAAGGTAAGG
vektopamp-2005	AGGAAGGAACGGACGAGAGAAGGGAG
G1-hyp1	CAGGTCTCGGAATGTATTCC
G1-hyp2	CTCTAGTCTCAGATCCGCAATCC
T19-hyp0	TGGTCCACCGCAAGTTGTC
T19-hyp1	CACTTCTCGGTCTTGATCGTCAAC
T19-hyp1seq	CAGTTCGGTGGTGGC
splink 1	CGAAGAGTAACCGTTGCTAGGAGAGACC
splink 2	GTGGCTGAATGAGACTGGTGTGCGAC
degen. pUC5	xGGCGATTAAGTTGGGTAACG (x= variable Basensequenz von 25 Bp)
degen. Bar3	xGGGATCCACTAGTTTCTCG (x= variable Basensequenz von 25 Bp)
ribprim	GTGCGTGCGCAGAGACCAG
Not20.9A	AAGCGGCCGCATGTCCAGCACTTCATCCCCG

### 3.3 Medien und Lösungen

LB/Ampillicin-Medium      10 g/l Caseinhydrolysat  
    10 g/l NaCl  
    5 g/l Hefe-Extrakt  
    100 mg/l Ampillicin

---

0,5-fach TBE-Puffer	89 mM Tris-Borat 1 mM EDTA
5-fach DNA Probenpuffer	10 mM EDTA 445 mM Tris-Borat, pH 8,2 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
1,0 % Agarose-Gel	10 g/l Agarose 70 µl/l Ethidiumbromid-Lösung in 0,5-fach TBE-Puffer
Spurenelementlösung (Davis et al., 1970)	50 g/l Citronensäure 50 g/l ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 2,5 g/l CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O 0,5 g/l H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 10 g/l Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O 0,5 g/l MnSO <sub>4</sub>
50-fach Vogelsmedium (Vogel, 1956)	150 g/l Natriumcitrat 250 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 g/l NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 10 g/l MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 5 g/l CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O 5 ml/l Spurenelementlösung 0,25 mg/l Biotin
Kultivierungsagar	16 g/l Agar 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 0,5 mg/l Benomyl (nach Autoklavieren) ggf. mit 1,2 g/l Basta

Agarböden	18 g/l Agar 10 g/l Glycerin 10 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 2,5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Caseinhydrolysat 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Kreuzungsplatten (Westergaard et al., 1947)	10 g/l KNO <sub>3</sub> 7 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 g/l MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 1 g/l NaCl 50 µg/l Biotin-Lösung 1 ml/l Spurenelementlösung 15 g/l Saccharose 16 g/l Agar 0, 1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 1 g/l CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O (nach Autoklavieren)
Mikrokonidienplatten (Westergaard et al., 1947)	0,1 g/l KNO <sub>3</sub> 70 mg/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mg/l MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O 10 mg/l NaCl 0,5 µg/l Biotin-Lösung 10 µl/l Spurenelementlösung 150 mg/l Saccharose 16 g/l Agar 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 10 mg/l CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O (nach Autoklavieren) 1 mM Iodacetat (nach Autoklavieren)

Sorboseagar	16 g/l Agar 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 15 g/l L(-)-Sorbose ggf. mit 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Flüssigmedium	15 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Elektroporationslösung	182 g/l Sorbit 10 g/l PEG 4.000
Regenerationslösung	182 g/l Sorbit 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 20 g/l Saccharose 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8
Topagarose	7 g/l Low Melting Agarose 20 g/l Saccharose 20 ml/l 50-fach Vogelsmedium 182 g/l Sorbit 15 g/l L(-)-Sorbose 0,1 % (w/v) Chinasäure, pH 6,8 0,4 g/l Basta (nach Autoklavieren)
Isolationspuffer	50 ml/l 1 M Tris-Acetat, pH 6,8 150 g/l Saccharose 2 ml PMSF-Lösung (0,1 M)
Aktivitätspuffer	0,05 % Triton X-100 50 ml/l 1M Tris-HCl, pH 7,5 50 ml/l 1M NaCl-Lösung

Biuret-Reagenz	5 g/l Kaliumtartrat 3 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l Kaliumiodid 8 g/l NaOH
Zuckergradientenlösung	75 bzw. 250 g/l Saccharose 0,05 % Triton X-100 50 ml/l 1M Tris-HCl, pH 7,5 50 ml/l 1M NaCl-Lösung
4 %-iges Sammelgel	1,1 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid 0,44 ml 1M Tris-Acetat, pH 6,8 66 $\mu\text{l}$ 10 %-ige SDS auf 6,7 ml mit bidest. Wasser auffüllen 44 $\mu\text{l}$ TEMED 22 $\mu\text{l}$ APS
16 %-iges Trenngel	18,75 ml 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid 4,86 ml 1M Tris-Acetat, pH 8,8 350 $\mu\text{l}$ 10 % SDS auf 35 ml mit bidest. Wasser auffüllen 17,5 $\mu\text{l}$ TEMED 100 $\mu\text{l}$ APS
Kammerpuffer	2 M Glycerin 0,25 M Tris-HCl, pH 8,3 0,5 % (w/v) SDS
Lysispuffer, pH 8,0	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA 20 mM Natriumacetat 1 % SDS

4-fach Protein-Probenpuffer	<p>1 M Saccharose</p> <p>200 mM Tris-Acetat, pH 6,8</p> <p>5 mM EDTA</p> <p>7 mM Dithioerythrol (DTE)</p> <p>5 % (w/v) SDS</p> <p>0,1 % (w/v) Bromphenolblau</p>
PBS	<p>130 mM NaCl</p> <p>2,7 mM KCl</p> <p>6,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></p> <p>1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></p>
PBST	<p>PBS</p> <p>0,1 % Tween-20</p>
Antikörper-Lösung	<p>1,5 g BSA</p> <p>50 ml PBST</p> <p>0,1 - 0,2 % der entsprechenden Antikörper</p>
Färbelösung	<p>10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4</p> <p>18 mg DAB</p> <p>9 mg CoCl<sub>2</sub></p> <p>9 mg NiSO<sub>4</sub></p>

## 3.4 Erzeugung von Komplex I-Mutanten

### 3.4.1 Plasmidisolierung

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C in der Beckmann Kühlzentrifuge J2-21 mit dem Rotor JS 13.1 durchgeführt.

Die Isolierung des pKSbar2-Plasmids erfolgte aus dem Bakterium *E. coli* DH5 $\alpha$ /pKSbar2. Zur Kultivierung wurden zunächst 4 ml LB/Ampillicin-Medium mit dieser Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit 500  $\mu$ l dieser Vorkultur wurden 80 ml LB/Ampicillin-Medium angeimpft und analog inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 7.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 4 ml P1-Puffer (150 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml RNase) resuspendiert und nach Zugabe von 4 ml P2-Puffer (200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS) für 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension mit 4 ml Kaliumacetat-Lösung (3M, pH 5,5) versetzt, für 15 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die DNA wurde mittels Plasmid Midi Kit (Qiagen) aus dem Überstand isoliert. Dazu wurde die Qiagen 100 Säule mit 4 ml QBT-Puffer equilibriert und anschließend der Extrakt aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen mit je 10 ml QC-Puffer wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert. Zum Ausfällen der DNA wurde das Eluat mit 3,5 ml Isopropanol versetzt. Nach einer einstündigen Inkubation auf Eis wurde 30 min bei 12.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde 1 Stunde an der Luft getrocknet und in 200  $\mu$ l bidest. Wasser resuspendiert.

### 3.4.2 Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Analyse

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese. Mit diesem Verfahren wurde auch der Erfolg von Isolierungen und Restriktionen überprüft. Zur Vorbereitung des Gels wurde die Agarose in der Mikrowelle in TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlen auf 60°C mit 70  $\mu$ l/l Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Durch Abkühlung der Lösung in einer entsprechenden Gießform wurden Gele mit definierten Ausmaßen erhalten. Die Aliquots der zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 2  $\mu$ l 5-fach DNA-Puffer versetzt und anschließend mit bidest.

Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Je nach verwendeter Formgröße wurde die Elektrophorese bei 100 bzw. 180 V für 30 min durchgeführt. Als Standard wurden wahlweise 5 µl λ-DNA/EcoRI+HindIII Marker (Fermentas) oder 5 µl pUC Mix Marker, 8 (Fermentas) aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden durch Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht.

### 3.4.3 Präparation des *bar*-Gens zur Transformation

Zur Isolierung des *bar*-Resistenzgens aus dem Plasmid pKS*bar*2 wurden vier verschiedene Methoden angewendet. Der Erfolg der Restriktion bzw. PCR sowie die Konzentration des erhaltenen PCR-Produktes wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

#### Restriktion von pKS*bar*2 mit dem Restriktionsenzym BamHI

Zur Linearisierung wurden 20 µl pKS*bar*2-Plasmidlösung (2 µg/µl) in 290 µl bidest. Wasser mit 40 µl Puffer A, 40 µl BSA-Lösung und 10 µl BamHI (Fermentas, 10 U/µl) für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Denaturierung des Restriktionsenzym erfolgte durch zehnmütige Inkubation bei 80°C.

#### Restriktion von pKS*bar*2 mit den Restriktionsenzymen BamHI und BssHII

Die Restriktion erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde, wie oben beschrieben, das pKS*bar*2-Plasmid mittels BamHI linearisiert. Im zweiten Schritt erfolgte die Restriktion des linearisierten Plasmids mit BssHII. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 5 µl BssHII (Roche, 10 U/µl) versetzt und zwei Stunden bei 50°C inkubiert.

#### Amplifizierung des *bar*-Gens durch PCR mit den Primern Bar3 und pUC5

Zur PCR wurde ein Kit, bestehend aus Taq-DNA-Polymerase und ThermoPol-Puffer von Biolabs (B9004S) verwendet. Mittels der Primer Bar3 und pUC5 wurde das *bar*-Gen aus dem Plasmid pKS*bar*2 amplifiziert. Der PCR-Ansatz, bestehend aus 19,3 µl bidest. Wasser, 2,5 µl ThermoPol-Puffer, 1 µl dNTPs (10mM), 0,5 µl Primer Bar3, 0,5 µl Primer pUC5, 1 µl pKS*bar*2 (2 ng/µl) und 0,2 µl Taq-DNA-Polymerase, wurde dem PCR-Programm entsprechend Tabelle 5 unterworfen.

Tabelle 5: PCR-Programm unter Verwendung der Taq-Polymerase

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	2.00	1
Denaturierung	94	0.30	} 39
Annealing	56	0.30	
Elongation	72	2.00	
Elongation	72	7.00	1
Abkühlung	4	-	1

Für den späteren Einsatz der DNA wurden die PCR Ansätze in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt, mit dem zweifachen Volumen Ethanol versetzt und für 30 min bei -20°C inkubiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 4°C und 14.000 Upm (Eppendorf Tischzentrifuge 5415C) wurde das trockene Sediment in 100 µl sterilem, bidest. Wasser resuspendiert.

#### Amplifizierung des *bar*-Gens durch PCR mit degenerierten Primern

Die Amplifizierung erfolgt hierbei analog zu der oben beschriebenen PCR, wobei hier statt der oben verwendeten Kombination die degenerierte Primer *degen. pUC5* und *degen. Bar3* verwendet wurden. Während die ersten 20 Bp am 3'-Ende identisch zum Template sind, weisen diese am 5'-Ende eine variable Basensequenz von 25 Bp auf.

#### **3.4.4 Kreuzung von *N. crassa*-Stämmen**

Zur Kreuzung wurden zwei Makrokonidienstämme, *cuco5* und *7089/20.9*, unterschiedlicher Paarungstypen (A/a) gegenüberliegend mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Kreuzungsplatten angeimpft. Dabei ist es sinnvoll, frisch angezogene Stämme zu verwenden, da sich ein verringerter Kreuzungserfolg bei älteren Stämmen gezeigt hat. Zur Bildung von Perithezien wurden die Platten für 14 Tagen bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde weitere sieben Tage bei 25°C unter Beleuchtung inkubiert. Die Plattendeckel wurden mit Hilfe eines Mikroskops nach Ascosporen untersucht, um diese anschließend mit etwa 2 ml sterilen, bidest. Wasser zu resuspendieren. Die Suspension wurde auf Sorboseagar mit Chinasäure ausplattiert. Zur Hitzeaktivierung der Ascosporen erfolgte eine vierstündige Inkubation bei 60°C. Diese keimten nach 2 - 3 Tagen bei 28°C unter Beleuchtung

aus. Die gekreuzten Stämme wurden anschließend auf ihre Eigenschaften untersucht und die gewünschten Kreuzungsprodukte selektiert.

#### **3.4.5 Kultivierung von Makrokonidien aus *cuco5***

Zur Kultivierung des *N. crassa*-Stammes *cuco5* wurden Schrägagarröhrchen mit den entsprechenden Makrokonidien bzw. Hyphen angeimpft und fünf bis acht Tage unter Beleuchtung bei 28°C inkubiert (Sebald et al., 1979). Da zur Transformation eine Zelldichte von  $6 \cdot 10^8$  Konidien/ml erwünscht ist, wurde anschließend auf mehreren Agarböden angezogen. Hierzu wurden die zuvor auf Schrägagarröhrchen kultivierten Konidien mit 1 - 2 ml sterilem, bidest. Wasser unter starkem Schütteln resuspendiert, um die Agarböden anschließend mit jeweils 500 µl dieser Konidien suspension anzuimpfen. Nach zweitägiger Inkubation bei 20°C im Dunkeln wurden die Agarböden für weitere fünf Tage zur Kultivierung unter Beleuchtung bei 24°C gelagert. Die Resuspendierung erfolgte durch Zugabe von 40 ml sterilem, bidest. Wasser. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 3.000 Upm wurde das Konidienpellet zur Transformation eingesetzt.

#### **3.4.6 Kultivierung von Mikrokonidien aus *cuco5/7089***

Die Kultivierung erfolgt analog zu *cuco5* bis einschließlich der Anzucht auf Agarböden. Zur Erzeugung der Mikrokonidien wurden die mit dem Stamm *cuco5/7089* bewachsenen Agarböden in etwa 40 ml sterilem, bidest. Wasser unter Schütteln gelöst. Zur Entfernung von Hyphen wurde die Konidien suspension über sterile Glaswolle filtriert. Mit Hilfe einer Thomazählkammer wurde die Konidienkonzentration der Suspension bestimmt, um anschließend jeweils 60 ml Flüssigmedium mit  $2 \cdot 10^8$  Konidien anzuimpfen. Die Flüssigmedien wurden für drei Tage bei 20°C im Dunkeln bei 240 Upm geschüttelt. Durch Filtration wurde eine Mikrokonidien-Lösung mit einem Makrokonidienanteil von unter 10 % erhalten, die anschließend einer zehnmütigen Zentrifugation bei 3.000 Upm unterworfen wurde. Das erhaltene Mikrokonidienpellet wurde zur Transformation eingesetzt.

### 3.4.7 Alternative Erzeugung von Mikrokonidien

Neben der Anzucht in Flüssigkulturen können Mikrokonidien auch durch Luftaustausch auf Mikrokonidienplatten erzeugt werden (Pandit et al., 1993). Da dieses Verfahren eine eindeutigere Selektion bei gleichzeitig geringerer Menge an homokaryonten Konidien bedeutet, wurde es zur Aufreinigung potentieller Klone angewendet. Die große Zahl von Mikrokonidien für die Transformation ist mit diesem Verfahren nicht zu erreichen. Die Mikrokonidienagarplatten wurden mit einer sterilen und in bidest. Wasser gequollen Cellophanfolie luftdicht abgeschlossen. Anschließend wurden mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers die entsprechenden Makrokonidien durch die Cellophanfolie in das Medium überführt. Nach zehntägiger Inkubation bei 25°C im Dunkeln wurde die Folie mit Hilfe einer sterilen Pinzette abgezogen, wobei damit auch die darauf gewachsenen Makrokonidien entfernt wurden. Zur Produktion von Mikrokonidien wurde für weitere 24 Stunden bei 25°C im Dunkeln inkubiert. Die Mikrokonidien wurden schließlich mit 2 ml sterilem, bidest. Wasser durch wiederholtes Spülen der Platte resuspendiert und zur Abtrennung von übrig gebliebenen Hyphen bzw. Makrokonidien mittels Millipore-Filter (5 µm) filtriert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Thomazählkammer. Für weitere Untersuchungen wurden die Mikrokonidien auf Sorboseagarplatten mit Chinasäure und 1,2 g/l Basta vereinzelt.

### 3.4.8 Transformation

Zur Transformation wurden die Stämme *cuco5* und *cuco5/7089* verwendet. Der Stamm *cuco5/7089* wurde durch Kreuzung der *N. crassa*-Stämme *cuco5* und *7089/nuo20.9* erhalten und bildet bevorzugt Mikrokonidien in Flüssigmedium.

#### Transformation in Makrokonidien

Das in 1 M Sorbit-Lösung resuspendierte Makrokonidienpellet wurde nach der Konzentrationsbestimmung in einer Thomazählkammer auf eine Konidienkonzentration von  $6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt. Die Zellwände wurden mit 20 mg/ml Lysing Enzyme (Sigma 1-1412) für 2 Stunden bei 28°C unter leichtem Schütteln abgebaut. Anschließend wurden die Protoplasten für 5 min bei 2.000 Upm und 4°C (Eppendorf

Tischzentrifuge 5415C) abzentrifugiert, zweimal mit der Sorbit-Lösung und einmal mit der Elektroporationslösung gewaschen. Nach Einstellung der Protoplastenkonzentration auf  $2 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$  wurden jeweils 400  $\mu\text{l}$  der Suspension mit 4  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA für 20 min auf Eis inkubiert. Die Plasmid-DNA stammte bei diesen Transformationen entweder aus Restriktionen mit BamHI oder aus Restriktionen mit BamHI und BssHII. Anschließend wurden im einminütigen Abstand für 250  $\mu\text{s}$  drei Elektroporationen bei 750 V durchgeführt (Eppendorf Multiporator). Nach einer zwanzigminütigen Regenerationszeit auf Eis wurde 1 ml Regenerationslösung zugegeben und anschließend für mindestens 1 Stunde bei  $28^\circ\text{C}$  bei 300 Upm geschüttelt. Die Transformationsansätze wurden mit 10 ml flüssiger Topagarose bei  $30^\circ\text{C}$  in sterilen Reagenzgläsern gemischt und auf Sorbosagar mit 182 g/l Sorbit und 1,2 g/l Basta gegossen.

#### Transformation in Mikrokonidien

Das Mikrokonidienpellet wurde ebenfalls mittels einer Thomazählkammer auf eine Konidienkonzentration von  $6 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$  eingestellt und analog zu der oben beschriebenen Transformation in Makrokonidien vorbereitet. Neben der durch die Restriktion mit BamHI und BssHII gewonnenen Plasmid-DNA wurden hier auch PCR-Produkte eingesetzt (1,33  $\mu\text{g}$ /Transformation), die durch die Primerkombination Bar3/pUC5 oder deren degenerierte Form erzeugt wurden. Die Elektroporation wurde, abweichend von der Transformation in Makrokonidien, dreimal für 350  $\mu\text{s}$  bei 1.200 V durchgeführt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie bei der Transformation in Makrokonidien.

Nach einer Inkubation von vier bis zehn Tagen wurden, sowohl bei Makro- als auch Mikrokonidien, einzelne Transformanden mit Hilfe steriler Zahnstocher auf Schrägagarröhrchen übertragen und 5 - 7 Tage bei  $28^\circ\text{C}$  inkubiert. Neben Kultivierungsmedium enthielten diese das Herbizid Basta, um das Wachstum nicht-resistenter Kolonien auszuschließen.

## 3.5 Selektion von Komplex I-Mutanten

### 3.5.1 Selektionsverfahren

Basta-resistente Transformanden wurden auf Schrägagarröhrchen mit Sorbose-medium ohne Chinasäure überführt. Nur Klone, die auf diesem Medium ein beeinträchtigt Wachstum zeigten, wurden dem Selektionsverfahren weiter unterzogen. Im nächsten Selektionsschritt wurden diese Klone auf je zwei Sorbose-medien überführt, wovon eines zusätzlich Chinasäure enthielt. Nach etwa vier bis sieben Tagen Inkubationszeit wurden die Schrägagarröhrchen miteinander verglichen. Dabei wurden solche Klone ausgewählt, die verstärkt auf dem mit Chinasäure versetzten Sorbosemedium wuchsen. Die Konidien selektierter Klone wurden resuspendiert und jeweils 50 Konidien auf Sorboseplatten mit Chinasäure ausplattiert. Nach drei, vier und fünf Tagen Inkubation bei 28°C wurden die Größen der ausgekeimten Kolonien vermessen und mit dem parallel ausplattierten Referenzstamm *nuo20.9/cuco5* verglichen. Die Kolonien mit vergleichbarem Wachstum wurden für weitere Untersuchungen auf Kultivierungsmedium mit Chinasäure angezogen.

### 3.5.2 Mitochondrienpräparation aus *Neurospora crassa*

Die selektierten Klone wurden zur Isolierung der Mitochondrien in 100 ml Flüssigmedium bei 28°C unter Beleuchtung kultiviert. Die so erzeugten Hyphen wurden durch Filtration geerntet und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Maximal 3 g dieser Hyphenmasse wurde mit etwa 5 ml Isolationspuffer im Mörser gleichmäßig zerrieben. Die Probe wurde in ein 70 ml-Kugelmühlengefäß überführt, welches mit 15 ml Glasperlen gefüllt und anschließend mit Isolationspuffer auf ein Endvolumen von 60 ml gebracht wurde. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch starkes Schütteln in einem Zellhomogenisator (B. Braun, Melsungen AG) über 12 Sekunden. Die Zellreste wurden durch zweimalige Zentrifugation des Überstandes für 10 min bei 4°C und 7.000 Upm (Rotor JS-13.1, Beckmann Kühlzentrifuge J2-21) abgetrennt. Die Mitochondrien sedimentierten schließlich bei einer weiteren Zentrifugation bei 4°C und 18.000 Upm (Weiss et al., 1970). Das Sediment wurde anschließend in 200 µl zuckerfreiem Isolationspuffer aufgenommen. Zur Protein-

konzentrationsbestimmung nach Biuret wurden zwei 10 µl-Aliquots abgenommen und der Rest zur Lagerung in 1,5 ml-Reaktionsgefäße bei -20°C überführt.

### 3.5.3 Biuret-Methode

Der Proteingehalt von Hyphen- und Mitochondriensuspensionen wurde mit der Biuret-Methode bestimmt (Beisenherz et al., 1953). Es wurde eine Standardreihe mit 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µl BSA-Lösung (10 mg/ml) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen erstellt. Zu den 10 µl-Aliquots der Mitochondriensuspension und der Standardreihe wurden jeweils 1 ml 6 %-ige TCA zugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei 4°C wurden ausgefällte Proteine durch fünfminütige Zentrifugation bei 14.000 Upm sedimentiert. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Proteinpellet mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt. Diese Mischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur unter starkem Schütteln inkubiert. Zur Entfernung von Schwebeteilchen wurden die Proben für 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend einer Extinktionsmessung bei 546 nm unterzogen. Um den auf Trübung durch Membranlipiden beruhenden Anteil der Extinktion zu bestimmen, wurde die Lösung durch Zugabe von einigen Körnchen KCN entfärbt und nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 Upm erneut vermessen. Aus der Differenz der beiden Messwerte wurde die exakte Proteinmenge bestimmt.

### 3.5.4 NADH/Ferricyanid-Redoxaktivitätstest

Durch Zuckergradientenzentrifugation wurden die Mitochondrienmembranproteine je nach Sedimentationskoeffizient voneinander getrennt. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von Komplex I sedimentiert dieser durch  $\frac{3}{4}$  des Gradienten. Vorstufen von Komplex I sedimentieren entsprechend ihrer molekularen Masse langsamer (Abbildung 15).

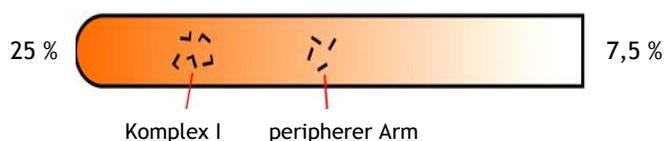


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Zuckergradienten.

Zur Solubilisierung dieser Proteine wurde zuerst die Mitochondriensuspension mit dem halben Volumen 20 % (w/v) Triton X-100 versetzt. Nach Zentrifugation bei 14.000 Upm für 10 min wurde der Überstand mit 5 mg Protein auf einen 7,5 bis 25 %-igen (w/v) Saccharosegradienten (4 ml Ultrazentrifugenröhrchen) geschichtet und bei 30.000 Upm (TST 41.14, Kontron Centrikon 2060 Ultrazentrifuge) für 16 Stunden zentrifugiert. Der Zuckergradient wurde anschließend auf 16 Fraktionen verteilt. Die Aktivität von Komplex I wurde mit Hilfe der NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität bestimmt (Friedrich et al., 1989). Die photometrische Messung der Oxidation von NADH durch Kaliumhexacyanoferrat ( $K_3[Fe(CN)_6]$ ) erfolgte bei 410 nm bei Raumtemperatur mittels eines Photometers (Helios  $\delta$ , Thermospectronic). Dazu wurden in einer Messküvette 1 ml Aktivitätspuffer, 10  $\mu$ l  $K_3[Fe(CN)_6]$  (100 mM), 15  $\mu$ l NADH (0,1 mM) vorgelegt und mit 5 - 15  $\mu$ l Probe versetzt. Der molare Extinktionskoeffizient für  $K_3[Fe(CN)_6]$  beträgt  $\epsilon_{410\text{ nm}} = 1\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

### 3.6 Charakterisierung von Komplex I-Mutanten

Die Charakterisierung der Komplex I-Mutanten setzt sich aus der Wiederholung des NADH/Ferricyanid-Redoxaktivitätstest im großen Maßstab, der Western-Blot-Analyse und der spektroskopischen Bestimmung der Cytochrome zusammen.

#### 3.6.1 Große Mitochondrienpräparation aus *N. crassa*

Zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die erfolgreich selektierten Mutanten im großen Maßstab angesetzt. Dazu wurden 7,5 l Flüssigmedium in 10 l-Steilbrustflaschen mit den entsprechenden Makrokonidien aus zwei Agarböden angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden während einer Wachstumszeit von zwei Tagen bei 28°C unter Beleuchtung durch ein zentrales Einleitungsrohr belüftet. Die Hyphen wurden mit Hilfe eines Büchnertrichters abfiltriert und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert. 150 bis 300 g dieser Hyphen wurden in 500 - 750 ml Isolationspuffer im Mixer (Rotor GT800, Rotor) für 5 min homogenisiert. Das Homogenisat wurde in einer Korundmühle (Eigenbau) zur Isolierung der Mitochondrien aufgeschlossen. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 4.500 Upm (Rotor H6000A, Kühlzentrifuge RC 3B Plus, Du Pont Sorvall) wurde der

Überstand erneut bei 7.500 Upm für 105 min zentrifugiert (Rotor SLC-6000, Kühlzentrifuge Evolution RC, Kendro Sorvall). Das Pellet wurde in einer geringen Restflüssigkeit resuspendiert, in einem Teflon-in-Glas-Homogenisator gepottert und anschließend bei 19.000 Upm für 20 min zentrifugiert (Rotor A8.24, Centrikon Kühlzentrifuge H-401, Kontron). Die Mitochondrienpellets wurden in wenig zuckerfreiem Isolationspuffer aufgenommen und bei -70°C gelagert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels der Biuret-Methode wurde die Mitochondriensuspension mit dem halben Volumen 20 % (w/v) Triton X-100 versetzt und einer zehnmütigen Zentrifugation bei 14.000 Upm unterworfen. Der Überstand, mit einer Proteinmenge von 40 mg, wurde auf einen 7,5 - 25 %-igen (w/v) Saccharosegradienten (12 ml Ultrazentrifugenröhrchen) geschichtet und bei 36.000 Upm (TST 41.14, Kontron Centrikon 2060 Ultrazentrifuge) für 16 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurde die NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität analog zu der Mitochondrienpräparation im kleinen Maßstab durchgeführt.

### **3.6.2 Auftrennung der Proteine durch Gelelektrophorese**

Zur Untersuchung des individuellen Sedimentationsverhaltens der Untereinheiten von Komplex I wurden 80 µl-Aliquots von ausgewählten Zuckergradientenfraktionen mit 20 µl 4-fach Probenpuffer versetzt. Die Mischung wurde anschließend auf eine SDS-PAGE, bestehend aus einem 5 %-igen Sammelgel und einem 16 %-igen Trenngel, aufgetragen. Die Separation der Proteine erfolgte bei 10 mA für ca. 16 Stunden.

### **3.6.3 Western-Blot Analyse**

Die Proteine wurden durch Elektrobplot vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Das Blotten wurde durch Anlegen eines Stroms von 400 mA für zwei Stunden bei 4°C durchgeführt. Die Membran wurde kurz unter leichtem Schwenken in 50 ml PBS-Lösung gewaschen und anschließend für 1 - 2 min mit einer 0,1 %-igen Ponceau S-Färbelösung angefärbt. Nach Entfernung der Färbelösung wurden die unbedeckten Nitrocelluloseflächen durch Einwirkung von 1 %-iger Essigsäure entfärbt, so dass ausschließlich die Proteinbanden markiert waren. Durch leichtes Schwenken der Membran in 50 ml Magermilch-Lösung (1,5 g Magermilch in 50 ml PBS) für 40 - 60 min bei Raumtemperatur wurde der Hintergrund der Membran

abgedeckt. Nach fünfminütigem Waschen mit 50 ml PBST bei Raumtemperatur wurde die Membran mit der gewünschten polyklonalen Antikörper-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran viermal mit jeweils 50 ml PBST-Lösung bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einem verdünnten Protein-A-Meerrettichperoxidase-Konjugat in PBST (1:15.000). Die Membran wurde zweimal mit je 50 ml PBS-Lösung und dann zweimal mit je 50 ml 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung (pH 7,4) gewaschen. Jeder Waschschrift wurde bei Raumtemperatur durchgeführt und dauerte jeweils 5 min. Die peroxidasegebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 30 ml Färbelösung und 100 µl 5 %-iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung visuell angefärbt. Nach kurzer Entwicklungsphase wurde die Membran mit bidest. Wasser gewaschen.

### 3.6.4 Cytochrombestimmung

Die Bestimmung des Cytochromgehalts von Mitochondrien erfolgte mit einem Zweistrahlphotometers (Perkin-Elmer). Zur Ermittlung der Basislinie wurden sowohl Proben- als auch Referenzküvette mit 1 ml Isolationspuffer (5 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) befüllt und über den Messbereich von 650 bis 500 nm bei einer Scangeschwindigkeit von 60 nm/min vermessen. Für die anschließenden Messungen wurden 0,5 ml der zu untersuchenden Mitochondriensuspension mit 0,2 ml 20 % Triton X-100 und 1,5 ml Isolationspuffer in einem Reagenzglas vermischt. Je 1 ml dieser Mischung wurde in der Proben- und Referenzküvette von 650 bis 500 nm vermessen. Das erhaltene Spektrum stellt die oxidierte Form der Probe dar. Anschließend wurden zur Reduktion einige Körnchen Natriumdithionit in die Probenküvette eingerührt und das Differenzspektrum von dithionitreduzierter Probe minus luftoxidiertes Referenz erstellt. Die Konzentrationen der Cytochrome a, b und c in der Mitochondriensuspension wurde unter Verwendung der in Tabelle 6 aufgelisteten Differenz-Extinktionskoeffizienten bestimmt.

**Tabelle 6: Differenz-Extinktionskoeffizienten zur Bestimmung der Cytochrome**

Cytochrom	Wellenlängendifferenz	Extinktionskoeffizient
a	605nm - 650 nm	24 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
b	560 nm - 580 nm	25 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>
c	550 nm -581 nm	20 mM <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>

### 3.7 Identifizierung der Insertionsstellen des *bar*-Gens

Zur Identifizierung der Insertionsstellen wurden die Methoden der Vektorette-, Splinkerette- und der direkten PCR verwendet.

#### 3.7.1 Isolierung der genomischen DNA aus *N. crassa*

Die Isolierung der DNA erfolgte nach Al-Samarrai (Al-Samarrai et al., 2000). Von den auffälligen Mutanten wurden Hyphen in Flüssigmedien kultiviert und durch Filtration geerntet. Anschließend wurden ca. 0,03 g der Hyphenmasse gefriergetrocknet und durch Zugabe von flüssigem Stickstoff zu einem homogenen Pulver verarbeitet. Das Hyphenpulver wurde mit 0,5 ml Lysispuffer durch 5 bis 30-faches Invertieren homogenisiert und nach Zugabe von 2 µl RNase-Lösung (10 mg/ml) für 5 min bei 37°C inkubiert. Zu dieser Suspension wurden 165 µl 5 mM NaCl-Lösung gegeben. Nach wiederholter Invertierung wurde für 10 min bei 14.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Zur Aufreinigung der DNA wurde der Überstand mit 0,8 ml Phenol/Chloroform-Lösung versetzt und durch erneutes Invertieren homogenisiert. Die entstandene Phenol/Chloroform/Wasser-Emulsion wurde durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 14.000 Upm und 4°C sichtbar voneinander getrennt. Die wässrige DNA-Lösung wurde mit Hilfe einer Pipette von der organischen Phase separiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Aufreinigung wurde mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch und anschließender zweiminütiger Zentrifugation wiederholt. Durch Zugabe des doppelten Volumens Ethanol (p.a.) und leichtes Schütteln wurde die DNA in Faden- bzw. Knäulform gefällt. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurde die DNA in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zwanzigminütigen Trocknung der DNA wurde diese in 100 µl 5 mM Tris-HCl (pH 7,8) resuspendiert. Die isolierte DNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Der Erfolg der Isolierung und die Konzentration wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

#### 3.7.2 Vektorette-PCR

Proben, die mittels der Vektorette-PCR (Hagiwara et al., 1996) identifiziert werden sollten, wurden mit den Restriktionsenzymen AfaI, AluI, HaeIII und HincII gespalten,

welche ausschließlich glatte Enden erzeugen. Zur Spaltung wurden jeweils 200 ng der zu untersuchenden, genomischen DNA in 40 µl Spaltungspuffer nach Herstellerangaben mit 4 U Restriktionsendonukleasen 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden zur Aufreinigung mit dem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform-Lösung versetzt und nach starkem Schütteln für 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit Hilfe einer Pipette in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch versetzt. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 4°C und 14.000 Upm wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zur Fällung der DNA wurden das doppelte Volumen Ethanol (p.a.) und  $\frac{1}{10}$  des Volumens an 5 M NaCl-Lösung hinzugegeben. Nach zehninütiger Inkubation bei -20°C wurde für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet solange an der Luft getrocknet bis der alkoholische Geruch verfliegen war. Das Pellet wurde schließlich in 13 µl sterilem, bidest. Wasser resuspendiert.

Zur Erzeugung der Vektorette-Einheit wurden zu 92 µl bidest. Wasser jeweils 4 µl der Oligonukleotide v-top und v-bottom zugesetzt und für 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde innerhalb von 30 min auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die in 13 µl bidest. Wasser resuspendierte DNA-Lösung wurde mit 2 µl 10-fach Ligationspuffer, 1 µl ATP-Lösung (10 mM), 2 µl PEG 4000 Lösung 50 % (w/v), 1 µl Vektorette-Einheit und 1 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas 5 U/µl) versetzt. Die Ligationsansätze wurden für 16 Stunden bei 22°C inkubiert. Die T4 DNA-Ligase wurde bei 65°C für 10 min denaturiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 30 µl bidest. Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Für die PCR wurde das Expand Long Template PCR System von Roche verwendet. Dieses System besteht aus der Taq-Polymerase und der Pwo-Polymerase und zeichnet sich durch einen Korrekturmechanismus aus, der eine präzise Amplifizierung sehr langer DNA-Fragmente ermöglicht. Neben 0,5 µl der entsprechenden

Primer bestand jeder Ansatz aus 17,3 µl bidest. Wasser, 2,5 ml Puffer P3, 1 µl dNTP (10mM), 0,4 µl Long Template Expand Polymerase Mix und 2,5 µl der ligierten DNA. Entsprechend der verwendeten Restriktionsenzyme wurden die in Tabelle 7 dargestellten Primer-Kombinationen gewählt.

**Tabelle 7: Primerkombinationen für den ersten Durchgang der Vektorette-PCR**

Ansatz	Restriktion mit	Primer 1	Primer 2
1	AfaI	barrev-2005	vektop-2005
2	AluI	barforneu	vektop-2005
3	HaeIII	barforneu	vektop-2005
4	HaeIII	ampforneu	vektop-2005
5	HincII	ampforseq-2005	vektop-2005
6	HincII	barrev-2005	vektop-2005

Die PCR wurde im Mastercycler Gradient von Eppendorf durchgeführt. Es wurde das in Tabelle 8 dargestellte PCR-Programm verwendet.

**Tabelle 8: PCR-Programm für die Vektorette-PCR**

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	2.00	1
Denaturierung	94	0.30	} 39
Annealing	56	0.30	
Elongation	68	2.00 + 0.10	
Elongation	68	7.00	1
Abkühlung	4	-	1

Der Erfolg der PCR und die Konzentration wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Anschließend wurde das PCR-Produkt in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit dem doppelten Volumen Ethanol (p.a.) gefällt und in 20 µl sterilem, bidest. Wasser resuspendiert.

In einem zweiten Durchgang der Vektorette-PCR wurde nochmals 1 µl des DNA-Produktes amplifiziert, um das vorhergehende Ergebnis zu bestätigen und die für eine Sequenzierung notwendige DNA-Menge zu erhalten. Für eine erfolgreiche Sequenzierung wurden 40 ng DNA pro 100 Basenpaare und 30 µl des entsprechenden Sequenzierungsprimers (10 pmol/µl) benötigt. Bei der Amplifizierung ist die Wahl

der Primerkombination abhängig von den im ersten PCR-Durchgang verwendeten Primern (Tabelle 9).

**Tabelle 9: PCR-Ansätze für den zweiten Durchgang mit Sequenzierungsprimern**

Ansatz	Primer 1	Primer 2	Sequenzierungsprimer
1	barseq2-2005	vektopamp-2005	ampforseq
2	barforw-2005	vektopamp-2005	barforseq2-2005
3	barforw-2005	vektopamp-2005	barforseq-2005
4	ampforneu2	vektopamp-2005	ampforneu3
5	amprev	vektopamp-2005	amprevseq
6	barseq2-2005	vektopamp-2005	barseq3-2005

Das erhaltene Produkt wurde nach Fällung mit Ethanol in 20 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,2) resuspendiert oder über eine Spinsäule (Qiaquick Spin Column, Qiagen) aufgereinigt und in 30 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,2) aufgenommen. Die Sequenzierung erfolgte durch die MWG Biotech AG in Martinsried.

### 3.7.3 Splinkerette-PCR

Für die Probenpräparation bei der Splinkerette-PCR (Devon et al., 1995) wurden die Restriktionsenzyme EcoRI, HindIII, XbaI und XmaI verwendet, welche überhängende Enden erzeugen. Hierzu wurde 300 ng genomische DNA in 5 µl Spaltungspuffer nach Herstellerangaben mit 4 U Restriktionsendonukleasen 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden anschließend 20 min bei 80 °C deaktiviert.

Zur Erzeugung der Splinkerette-Einheit wurden 10 µl der Oligonukleotide s-top mit 10 µl des schnittstellenabhängigen s-bottom im Thermocycler für 3 min auf 95 °C inkubiert und anschließend sehr langsam (1 °C pro 15 sek) auf Raumtemperatur abgekühlt. Die hochkonzentrierte Splinkerette-Mischung wurde mit sterilem, bidest. Wasser von 100 pmol/µl auf 4 pmol/µl verdünnt.

Zur Ligation wurden 12 µl steriles, bidest. Wasser, 2 µl Ligationspuffer, 1 µl ATP-Lösung (10 mM), 5 µl DNA-Lösung (300 ng), 0,5 µl T4 DNA-Ligase (Fermentas 5 U/µl) und 0,3 µl Splinkerette-Einheit zugesetzt. Die Ligationsansätze wurden für 16 Stunden bei 22 °C inkubiert und analog zur Restriktion bei der Vektorette-PCR

aufgereingt. Das Pellet wurde schließlich in 30 µl sterilem, bidest. Wasser resuspendiert.

Es wurde ebenfalls von dem Expand Long Template PCR System von Roche Gebrauch gemacht. Abhängig von der Wahl des Restriktionsenzym, mit dem die genomische DNA zuvor geschnitten wurde, muss eine bestimmte Primerkombination gewählt werden (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Primer für den ersten Durchgang der Splinkerette-PCR**

Ansatz	Restriktion mit	Primer 1	Primer2
1	EcoRI	barrev-2005	splink1
2	EcoRI	barhindfor	splink1
3	EcoRI	barforneu	splink1
4	HindIII	barhindfor	splink1
5	HindIII	barhindrev	splink1
6	XbaI	barhindfor	splink1
7	XmaI	barhindfor	splink1
8	XmaI	barhindrev	splink1
9	XmaI	barforneu	splink1

Die PCR-Ansätze, bestehend aus 19,3 µl bidest. Wasser, 2,5 µl Puffer P3, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), jeweils 0,5 µl der entsprechenden Primer, 5 µl DNA-Lösung und 0,4 µl Long Template Expand Polymerase Mix, wurden dem in Tabelle 11 dargestellten PCR-Programm unterworfen.

**Tabelle 11: PCR-Programm für Splinkerette-PCR**

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	3.00	1
Denaturierung	94	0.15	10
Annealing	62	0.30	
Elongation	68	5.00	
Elongation	94	0.15	20
Annealing	62	0,3	
Elongation	68	5.00 + 0,20	
Elongation	68	7	1
Abkühlung	4	-	1

Der Erfolg der Amplifizierung und die Konzentration wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Das PCR-Produkt wurde mit dem doppelten Volumen Ethanol

(p.a.) gefällt und schließlich in 20 µl bidest. Wasser resuspendiert. Aus der ersten PCR wurde 0,2 µl der DNA-Lösung in einem zweiten Durchgang erneut amplifiziert, um das vorhergehende Ergebnis zu bestätigen und die für die Sequenzierung bei der MWG Biotech AG in Martinsried notwendige DNA-Menge zu erhalten. Die Präparation der Sequenzierungsproben ist identisch mit der für die durch Vektorette-PCR erhaltenen Produkte. In Tabelle 12 sind die Primerkombinationen für die einzelnen Ansätze zusammengefasst.

**Tabelle 12: PCR-Ansätze für den zweiten Durchgang mit Sequenzierungsprimern**

Ansatz	Primer 1	Primer 2	Sequenzierungsprimer
1	barseq2-2005	splink2	barseq3-2005
2	barhindfor2	splink2	barforseq-2005
3	barforw-2005	splink2	barforseq-2005
4	barhindfor2	splink2	barforseq-2005
5	barhindrev2	splink2	barseq2-2005
6	barhindfor2	splink2	barseq2-2005
7	barhindfor2	splink2	barforseq2-2005
8	barhindrev2	splink2	barseq2-2005
9	barforw-2005	splink2	barseq2-2005

### 3.7.4 PCR auf genomischer DNA

Zur Bestätigung der Insertionsstellen wurde auch die Methode der direkten PCR verwendet. Dazu wurden genspezifische Primer sowie Primer, die an das Insert binden, eingesetzt. Die Zusammensetzung der Ansätze erfolgte analog zur Amplifizierung des *bar*-Gens. Es wurde das in Tabelle 13 beschriebene PCR-Programm angewendet.

**Tabelle 13: PCR-Programm für die direkte PCR**

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	5.00	1
Denaturierung	94	0.30	} 30
Annealing	54	0.30	
Elongation	72	5.00	
Elongation	72	5.00	1
Abkühlung	4	-	1

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung des Selektionsverfahrens

Die Chinasäureabhängigkeit des Wachstums von Komplex I/III-Doppelmutanten wurde als Basis für die Entwicklung eines effizienten Selektionsverfahrens verwendet (Tsaladra, 2004). Das für diese Arbeit entwickelte Anreicherungsverfahren von Komplex I-Mutanten nach der Transformation des *cuco5*-Stammes besteht aus drei Stufen: der Präselektion, der Selektion und der Postselektion (Abbildung 16).

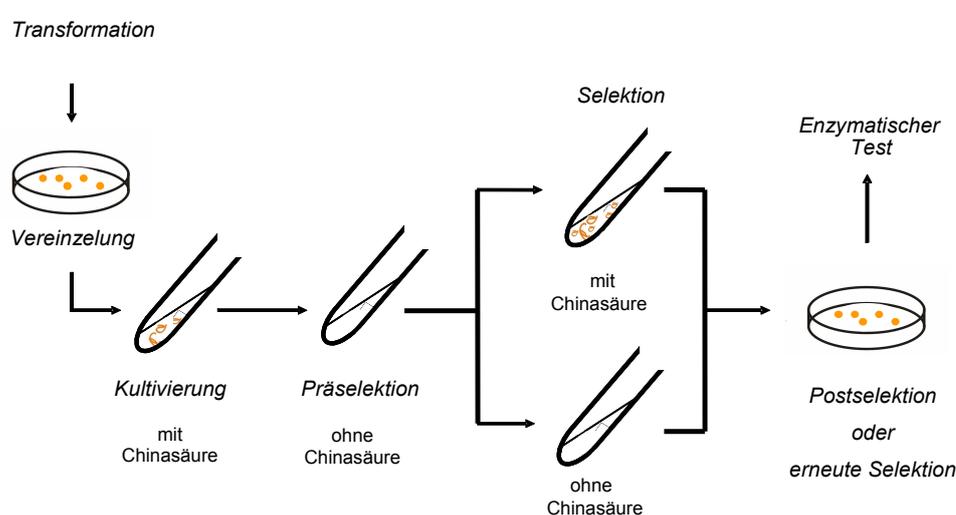


Abbildung 16: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte des Selektionsverfahrens.

Durch die mehrfache Überprüfung der chinasäureabhängigen Wachstumsraten in den einzelnen Selektionsschritten ist eine effiziente Reduktion der Transformanten auf wenige potentielle Mutanten möglich. Dabei stellt jeder Schritt eine Verfeinerung der vorausgehenden Untersuchung dar.

Die einzelnen Transformanten wurden nach dem Auskeimen von den Transformationsplatten auf chinasäurehaltige Kultivierungsröhrchen mit Basta überführt. Nach einer maximalen Inkubationszeit von 14 Tagen wurden nur jene Transformanten einer Präselektion unterworfen, die ein deutliches Wachstum und damit eine Resistenz gegen das Herbizid Basta aufwiesen. Alle restlichen Transformanten

wurden aussortiert. Somit war sichergestellt, dass nur Transformanden mit dem inserierten *bar*-Gen weiter untersucht wurden.

Für die Präselektion wurden die Transformanden auf chinasäurefreie Sorbose-röhrchen übertragen und für fünf Tage inkubiert. Nur die Transformanden, die ein schlechtes bzw. gar kein Wachstum auf dem chinasäurefreien Medium aufwiesen, wurden für die Selektion weiter verwendet. Durch diesen Schritt wurden die Transformanden auf die zur Komplex I/III-Doppelmutante phänotypischen Klone reduziert.

Im nachgelagerten Schritt erfolgte die Selektion durch einen direkten Wachstumsvergleich der Klone, die jeweils auf Sorboseröhrchen mit und ohne Chinasäure überführt wurden. Durch die Wachstumsunterschiede auf den jeweiligen Medien wurde die Chinasäureabhängigkeit der Klone überprüft und dadurch die, in der Präselektion durchgeführte Auslese verfeinert. Zeigten die Klone ein deutliches chinasäureabhängiges Wachstum, wurden diese einem dritten Schritt, der Postselektion, unterzogen.

Dazu wurden die Konidien auf Agar mit Chinasäure ausplattiert. Die Postselektion erfolgte durch Größenvergleich der ausgekeimten Kolonien mit der parallel ausplattierten Doppelmutante *nuo20.9/cuco5*. Nach vier bis fünf Tagen wurden die entstandenen Kolonien vermessen. Nur Klone mit einem der Doppelmutante ähnlichen Wachstumsverhalten wurden dem enzymatischen Test unterzogen.

Der Vorteil der visuellen Unterscheidbarkeit durch die Verwendung einer chinasäureregulierbaren Komplex III-Mutante als Ausgangsstamm für die Transformation geht mit einem langsamerem Wachstum der zu selektierenden Doppelmutanten einher. Da die stärker wachsenden *cuco5*-Kolonien bereits nach drei bis fünf Tagen auskeimen und die Kolonien der Doppelmutante *nuo20.9/cuco5* etwa vier bis sechs Tage benötigten, bestand für die durch ungezielte Mutagenese erhaltenen Doppelmutanten die Gefahr des Überwachsens durch den Ausgangsstamm. Um die Anwendbarkeit des Verfahrens zu überprüfen wurde ein 1:1 Gemisch von *cuco5*- und *nuo20.9/cuco5*-Konidien in Suspension erstellt und ausplattiert. Da sich die

beiden eingesetzten Stämme eindeutig im Wachstum unterscheiden ist für ein einwandfreies Selektionsverfahren die Bestätigung der in der Präselektion erhaltenen Zahl in den weiteren Selektionschritten notwendig. Es wurden 66 Kolonien isoliert und in Schrägagarröhrchen mit chinasäurehaltigem Kultivierungsmedium mit Basta angezogen. Jede angezogene Kolonie wurde dem oben beschriebenen Selektionsverfahren unterzogen (Tabelle 14).

Tabelle 14: Überprüfung der Anwendbarkeit des Selektionsverfahrens

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Klone	66	100,0
gewachsene Transformanden	66	100,0
Präselektion bestanden	30	45,5
Selektion bestanden	30	45,5
Postselektion bestanden	30	45,5

Auf Grund des Wachstumsverhaltens sind also 30 der isolierten Kolonien als chinasäureabhängig und 36 als chinasäureunabhängig identifiziert worden. Zur Verifizierung der durch das Selektionsverfahren erhaltenen Zuordnung wurde für je eine chinasäureunabhängige bzw. abhängige Kolonie die NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität des Komplex I mit der Aktivität des jeweiligen Referenzstamms *cuco5* bzw. *nuo20.9/cuco5* verglichen (Abbildung 17).

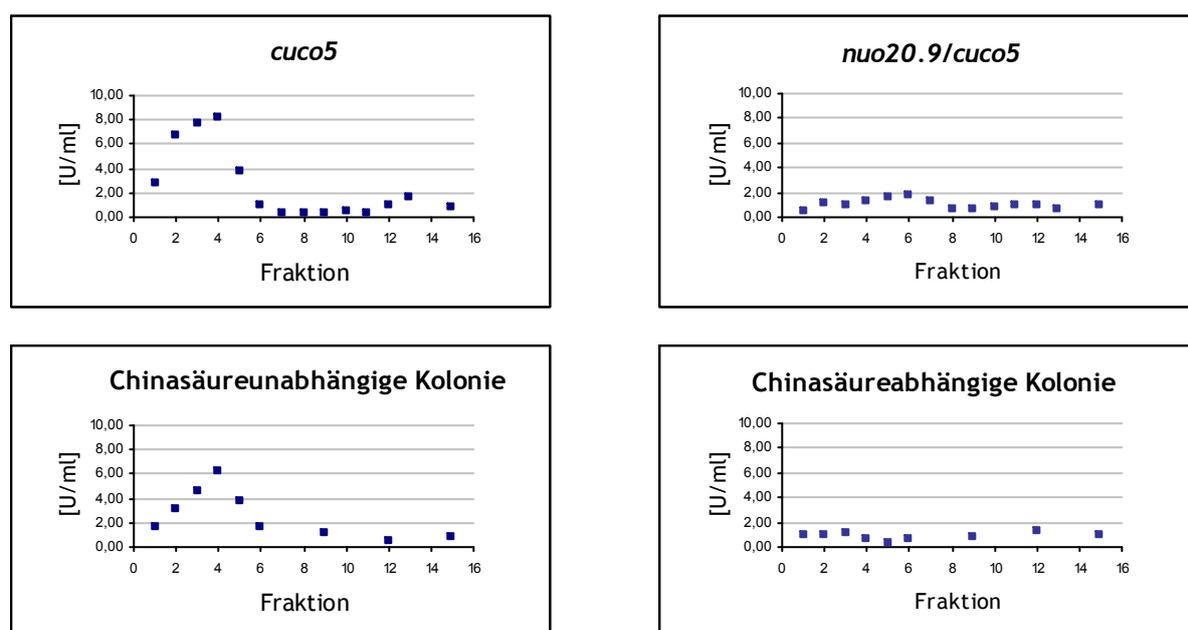


Abbildung 17: Enzymatischer Test zur Überprüfung des Selektionsverfahrens.

Dazu wurden die solubilisierten Mitochondrienproteine mittels Zuckergradientenzentrifugation entsprechend ihrer Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt. Proteine mit höherem Molekulargewicht sind dabei in den niedrigeren Fraktionen des Zuckergradienten zu finden. Für einen intakten Komplex I wird ein Gipfel der enzymatischen Aktivität innerhalb der ersten fünf Fraktionen erwartet. Die erhaltenen Aktivitätsprofile bestätigen die Korrelation von Chinasäureabhängigkeit und Komplex I-Defekt.

Das durch Selektion erhaltene Verhältnis von 36:30 entspricht in etwa dem eingesetzten Verhältnis von 1:1. Die Effizienz des Selektionsverfahrens wurde somit gezeigt. Das Überwachsen der langsameren Doppelmutante spielte in dem für die Selektion notwendigen Zeitraum keine Rolle. Bei einer höheren Koloniedichte muss allerdings die Isolierung der einzelnen Transformanten frühzeitig nach der Auskeimung erfolgen, um das Ineinanderwachsen der Kolonien zu verhindern.

Im Verlauf der Arbeit wurde die Postselektion durch einen erneuten direkten Vergleich des Wachstumsverhaltens analog zur Selektion ersetzt. Zum einen hatte sich die Postselektion als uneindeutig aufgrund der stark variablen Koloniegrößen eines Durchganges erwiesen und zum anderen war die erneute Selektion sowohl zeitlich als auch von der Handhabung her effektiver.

## 4.2 Erzeugung von Komplex I-Mutanten durch Transformation

Im Folgenden wird die durchgeführte Mutagenese von Makro- und Mikrokonidien mit verschiedenen DNA-Fragmenten beschrieben. Dabei wurde in Makrokonidien ausschließlich das durch BamHI bzw. BamHI und BssHII fragmentierte Plasmid pKS*bar2* eingesetzt, während in Mikrokonidien sowohl das mit BamHI und BssHII fragmentierte Plasmid pKS*bar2* als auch das durch PCR mit den Primern pUC5 und Bar3 bzw. deren degenerierter Form amplifizierte *bar*-Gen verwendet wurde. Neben der jeweiligen Selektionsbilanz wird auf die Insertion in Hinblick auf die Zusammensetzung der inserierten Plasmid-DNA eingegangen. Eine ausführliche Erläuterung zu den verwendeten PCR-Methoden und Insertionsstellen in den identifizierten Komplex I-Mutanten erfolgt in Kapitel 4.4.

#### 4.2.1 Transformation und Selektion von *cuco5*

##### Restriktion des pKSbar2-Plasmids mit BamHI

Zur Erzeugung von Komplex I-Mutanten wurde der Makrokonidienstamm *cuco5* mit dem linearisierten pKSbar2-Plasmid transformiert. Durch die Aufnahme des im Plasmid enthaltenen *bar*-Gens erhalten die Mutanten eine Resistenz gegen das Herbizid Basta. Das inserierte Gen dient somit als Selektionsmarker. Die Linearisierung des pKSbar2-Plasmids erfolgte durch Restriktion mit dem Enzym BamHI (Abbildung 18).

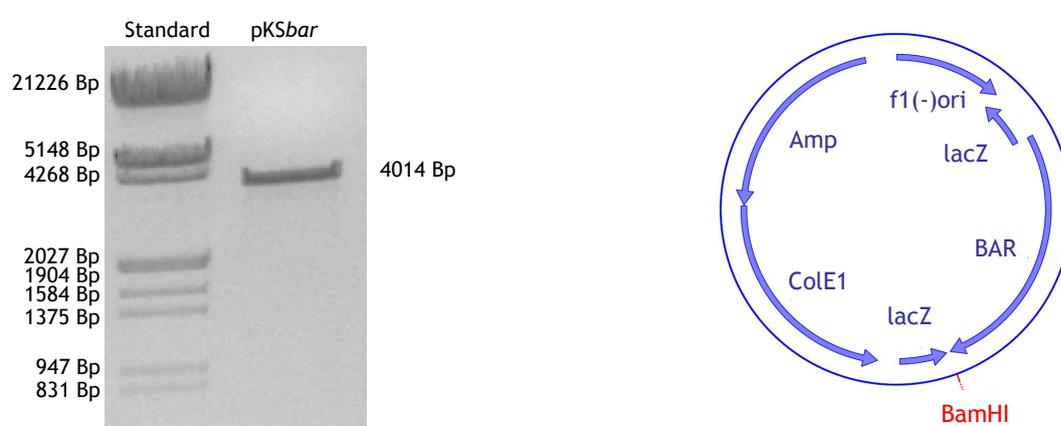


Abbildung 18: Überprüfung der erfolgreichen Restriktion von pKSbar2 mit BamHI durch Gelelektrophorese (links). Schematische Darstellung der Schnittstelle im Plasmid (rechts).

Die durch Insertion des linearisierten Plasmids erhaltenen Transformanten wurden dem Selektionsverfahren unterzogen. Dadurch wurde die Zahl der dem aufwendigeren enzymatischen Aktivitätstest zu unterziehenden Mutanten von 5.190 auf 54 reduziert (Tabelle 15).

Tabelle 15: Selektionsbilanz für die Restriktion mit BamHI in Makrokonidien.

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Transformanten	7.487	144,3
gewachsene Transformanten	5.190	100,0
Präselektion bestanden	552	10,6
Selektion bestanden	231	4,5
Postselektion bestanden	54	1,0
Enzymatischen Test bestanden	1	0,02

Basierend auf den statistischen Berechnungen (siehe Abschnitt 2.8.2) müssten etwa zwölf dieser Klone eine Komplex I-Mutation aufweisen. Es wurde allerdings nur eine Mutante ohne Komplex I-Aktivität identifiziert (siehe Abschnitt 4.2.2). Neben der geringeren Ausbeute erwies sich die weitgehende Fragmentierung des Plasmids als zusätzlicher Nachteil dieser Methode. Durch die Linearisierung wurde ein 4014 Bp langes Fragment mit einem Übergang an der BamHI-Schnittstelle sowohl am 3'- wie auch am 5'-Ende erzeugt. In der untersuchten Mutante wurden zwei Insertionsstellen gefunden (siehe Abschnitt 4.4). In beiden Fällen wurden weder die erwartete Länge noch die entsprechenden Fragmentenden identifiziert. Offensichtlich war vor oder während der Insertion eine zusätzliche Verkürzung des linearisierten Plasmids erfolgt, die die Bestimmung der Insertionsstellen erschwerte. Im Folgenden wurde das Plasmid daher mit zwei Restriktionsenzymen fragmentiert.

#### Restriktion des pKSbar2-Plasmids mit BamHI und BssHII

Die gewählten Restriktionsenzyme BamHI und BssHII schneiden 5' und 3' in der Nähe des *bar*-Gens und bilden drei Fragmente: das *bar*-Gen enthaltene Fragment mit 1.162 Bp und zwei weitere Fragmente mit 2.788 Bp und 64 Bp (Abbildung 19). Für die Transformation wurde die durch Spaltung erzeugte Mischung der Fragmente eingesetzt. Da eine weitere Verkürzung des *bar*-Gens die Funktion als Selektionsmarker unterbindet, ist zu erwarten, dass Basta-resistente Klone das weitgehend intakte Fragment inseriert haben.

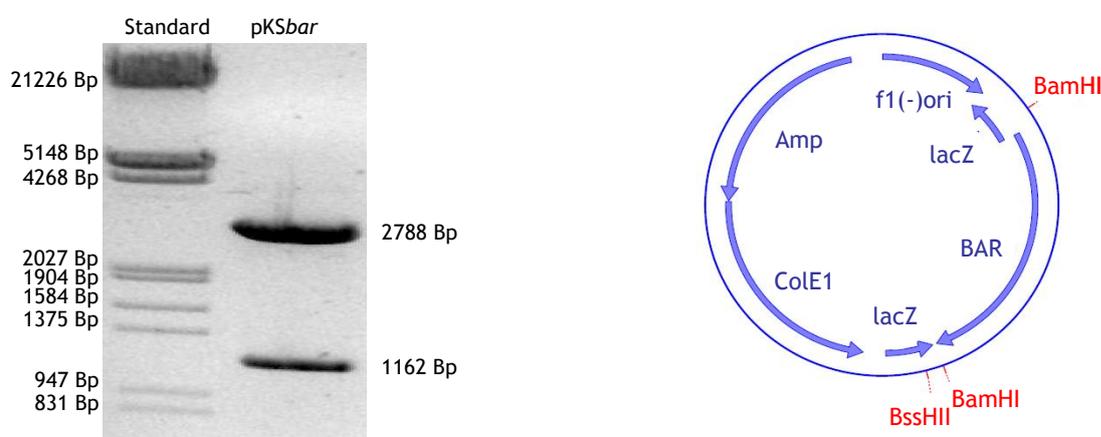


Abbildung 19: Überprüfung der erfolgreichen Restriktion von pKSbar2 mit BamHI und BssHII durch Gelelektrophorese (links). Schematische Darstellung der Schnittstellen im Plasmid (rechts)

Die erhaltenen Transformanden wurden ebenfalls dem Selektionsverfahren unterworfen. Die in Tabelle 16 zusammengefassten Ergebnisse zeigen eine deutliche Verbesserung der Ausbeute an Komplex I-Mutanten im Vergleich zur Restriktion mit BamHI, wobei das Ergebnis immer noch um den Faktor 4 niedriger als theoretisch erwartet ist.

**Tabelle 16: Selektionbilanz für die Restriktion mit BamHI und BssHII in Makrokonidien.**

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Transformanden	8.949	153,6
gewachsene Transformanden	5.825	100,0
Präselektion bestanden	838	14,4
Selektion bestanden	258	4,4
Postselektion bestanden	72	1,2
Enzymatischen Test bestanden	3	0,05

Die durchgeführten Aktivitätstests sind im folgenden Abschnitt 4.2.2 zusammengefasst.

#### 4.2.2 Enzymatischer Test der Mutanten aus Makrokonidien

Beide Restriktionsansätze ergeben eine Gesamtzahl von 16.436 Transformanden, von denen 11.015 Klone dem Selektionsverfahren unterworfen wurden. 126 Klone haben die verschiedenen Selektionsschritte überstanden. Zur Unterscheidung der Klone wurde eine systematische Bezeichnung eingeführt. Der erste Teil der Bezeichnung z.B. T8 steht für den jeweiligen Transformationsdurchgang und die darauffolgende, mit einem Bindestrich getrennte Zahl für die jeweilige Kolonie aus diesem Durchgang. Somit steht z.B. T8-207 für die 207te isolierte Kolonie des Transformationsdurchgangs T8.

Im Aktivitätstest zeigten nur vier der 126 selektierten Klone (T8-207, T19-26, T32-21 und P2-204) keine Komplex I-Aktivität. Von diesen vier Proben war ausschließlich der Klon T8-207 durch Insertion des mit BamHI linearisierten pKS*bar2*-Plasmid entstanden. Alle anderen Klone stammten aus Transformation mit dem BamHI und BssHII geschnittenen pKS*bar2*.

Bei einer erneuten Untersuchung zur Bestätigung der Ergebnisse zeigten die Klone T8-207 und T19-26 unerwartet Komplex I-Aktivität, während die anderen Klone weiterhin inaktiv blieben. In Abbildung 20 sind die Elutionsprofile für die vier Klone, sowie die Wiederholungen für T8-207 und T19-26 dargestellt.

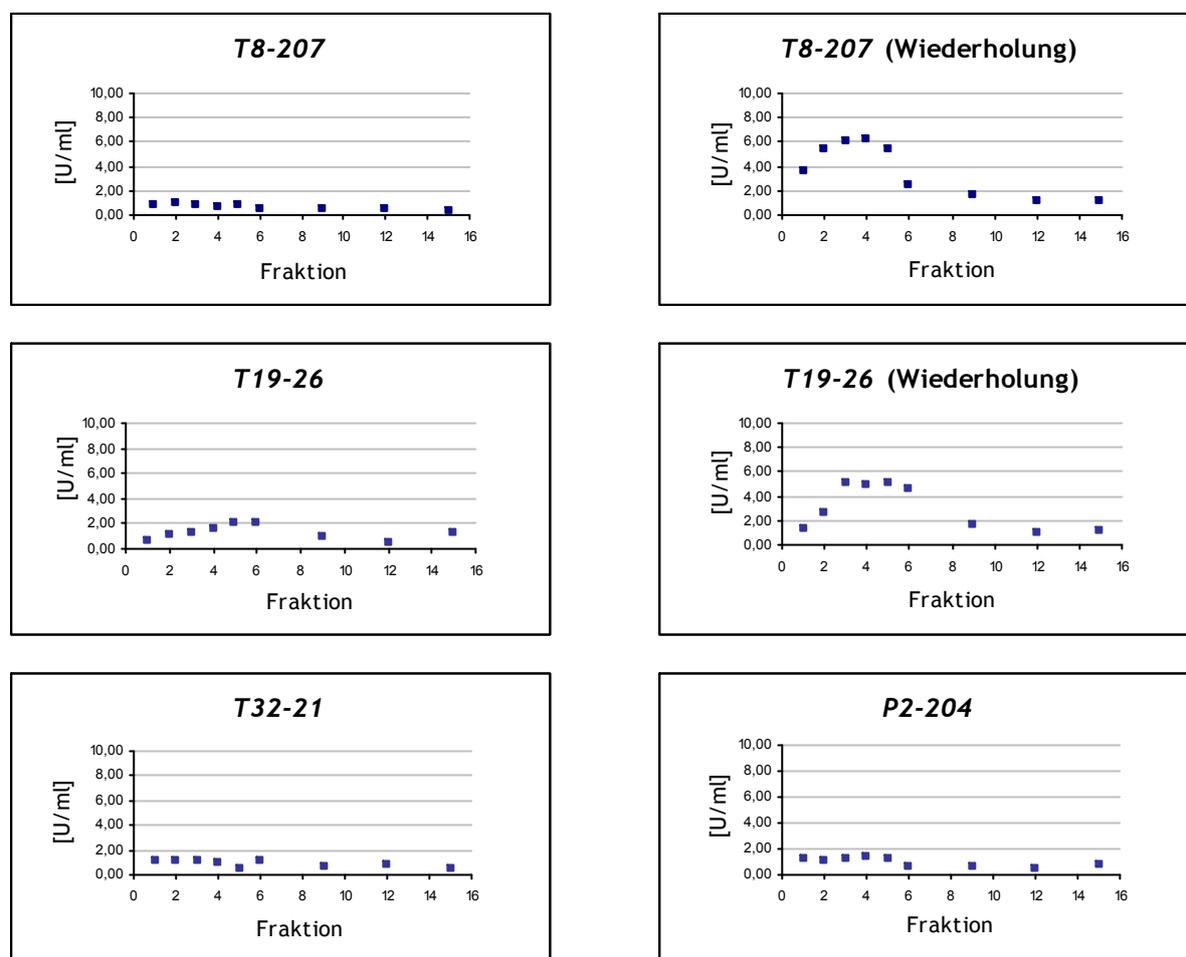


Abbildung 20: Doppelte enzymatische Test der *cuco5*-Transformanten T8-207 und T19-26 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten. Da sich die Werte für T32-21 und P2-204 nicht ändern, ist nur jeweils eine Messung angefügt.

Die wechselhaften enzymatischen Aktivitäten sind vermutlich auf die Multi-nuklearität der Konidien zurückzuführen. Das Nebeneinander unterschiedlicher, in diesem Fall transformierter und nicht-transformierter, Kerne führte zu instabilen Phänotypen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden homokaryonte Klone durch Vereinzelung von Mikrokonidien erzeugt.

### 4.2.3 Erzeugung homokaryonter Klone

Mikrokonidien entstehen bei Inkubation auf geeigneten Medien und unter spezifischen Umweltbedingungen. Sie sind einkernig und ergeben daher homokaryonte Klone. Da bei der Erzeugung auf Mikrokonidienplatten auch vereinzelt Makrokonidien entstehen, ist zur vollständigen Trennung der beiden Konidienarten eine Filtration unerlässlich. Die Konzentration der erhaltenen Mikrokonidien durch Anzucht auf Plattenmedien ist sehr gering und stark schwankend. Durch die Filtration wird die Anzahl der erhaltenen Konidien noch weiter reduziert. Die Erzeugung und Überprüfung der Mikrokonidien wird am Beispiel der Mutante T8-207 erklärt. Zur Unterscheidung der vereinzelt homokaryonten Kolonien wird an die Bezeichnung die jeweilige Zahl mit einem Schrägstrich angehängt. Es wurden vier homokaryonte Klone der Probe T8-207 isoliert und zweimal auf ihre Chinasäureabhängigkeit überprüft (Selektion). Anschließend wurde von allen vier Klonen die Komplex I-Aktivität vermessen (Abbildung 21).

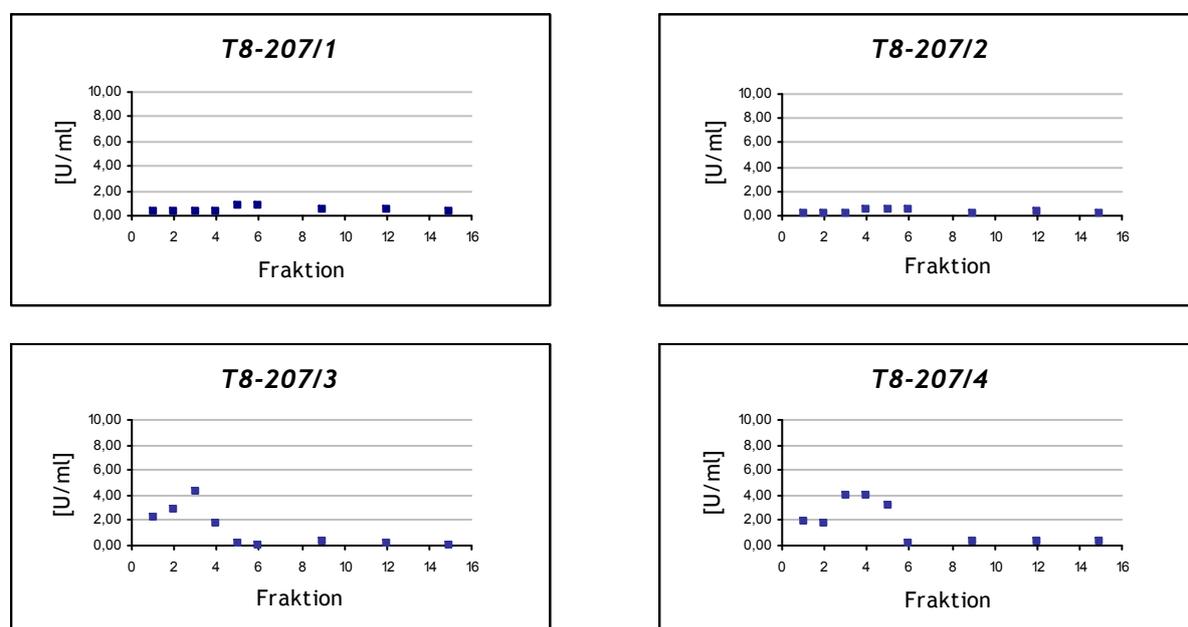


Abbildung 21: Enzymatischer Test der vier homokaryonten Klone von T8-207. Die beiden Klone T8-207/1 und T8-207/2 zeigen keine Komplex I-Aktivität, während die Klone T8-207/3 und T8-207/4 in den Fraktionen 3 bzw. 4 einen charakteristischen Komplex I-Gipfel aufweisen.

Die Ergebnisse der Selektion und der Aktivitätsmessungen sind kohärent und in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Untersuchung der isolierten, homokaryonten Kolonien von T8-207

Nr.	Wachstum mit QA	Wachstum ohne QA	Komplex I-Aktivität
1	+	-	inaktiv
2	+	-	inaktiv
3	+	+	aktiv
4	+	+	aktiv

Die anderen drei Komplex I-Mutanten wurden analog zu der Probe T8-207 vereinzelt und zweifach auf eine Chinasäureabhängigkeit geprüft. Zur Bestätigung wurden ebenfalls Komplex I-Aktivitätstests der positiv selektierten Mikrokonidien durchgeführt. Die Ergebnisse bestätigen die für T8-207 gemachten Beobachtungen und damit die Problematik von Kompensationseffekten bei Makrokonidien.

Um diesen unerwünschten Kompensationseffekt zu vermeiden und somit eindeutigere Ergebnisse zu erhalten, ist es sinnvoll in einen homokaryonten Mikrokonidienstamm zu transformieren. Da zur Transformation eine hohe Konidienzahl von  $6 \cdot 10^8$  Konidien/ml benötigt wird, ist das in diesem Abschnitt angewendete Verfahren zur Erzeugung von homokaryonten Stämmen nicht geeignet. Spezielle Stämme von *N. crassa*, mit Mutationen in den Genen *mbc* bzw. *mcm*, bilden in Flüssigmedien Mikrokonidien mit konstanten Konzentrationen von etwa  $2 \cdot 10^7$  Konidien/ml (Maheshwari, 1991). Dies entspricht einer um den Faktor 10 bis 100 höheren Ausbeute im Vergleich zu der Anzucht auf Agar.

Um das Selektionsverfahren auf den Mikrokonidienstamm anwenden zu können, muss dieser ebenfalls einen regulierbaren Komplex III-Defekt enthalten. Durch Kreuzung des *cuco5*-Stammes mit dem Mikrokonidienstamm 7089/*nuo20.9* sollte ein geeigneter Ausgangsstamm für die Transformation in Mikrokonidien erhalten werden.

#### 4.2.4 Erzeugung des Mikrokonidienstammes *cuco5/7089*

In Zusammenarbeit mit Petra Küppers wurde die Kreuzung von der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5* und der mcm-Mutante *7089/nuo20.9* durchgeführt. Bei Letzteren ist die Komplex I-Untereinheit 20.9 kDa durch das *hph*-Gen ersetzt worden, welches eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Hygromycin B verleiht. Nach der Kreuzung wurden die erzeugten Klone aufgrund der vermittelten Resistenzen und Abhängigkeiten selektiert. Die gewünschten *cuco5/7089*-Klone müssen eine Benomylresistenz bei gleichzeitiger moderater Chinasäureabhängigkeit aufweisen und dürfen nicht auf hygromycinhaltigen Medien wachsen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Selektion der Kreuzungsmutanten auf Basis der vermittelten Resistenzen

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Klone	109	100,0
benomylresistente Klone	33	30,3
nicht hygromycinresistente Klone	14	12,8
chinasäureabhängige Klone	10	9,2

Die zehn selektierten Klone wurden auf ihre Fähigkeit zur Bildung von Mikrokonidien überprüft. Als Referenz wurden die jeweiligen Ausgangsstämme *cuco5* und *7089/nuo20.9* verwendet. Maß für die Stärke der Mikrokonidienkonzentration ist die Intensität der mit deren Bildung einhergehenden grün-braunen Färbung, so dass die Selektion des geeigneten Stammes bereits visuell möglich ist (Abbildung 22).

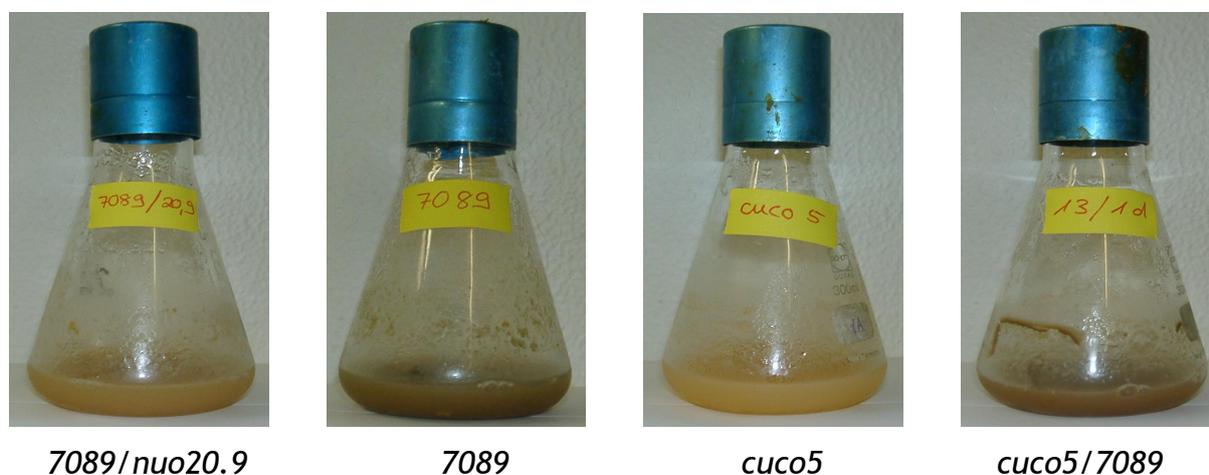


Abbildung 22: Flüssigkulturen der Referenzstämme *7089/nuo20.9*, *7089*, *cuco5* und die Flüssigkultur der gewünschten Doppelmutante *cuco5/7089*.

Bei der Untersuchung der zehn Stämme wies nur einer die für den Mikrokonidienstamm 7089 charakteristische Färbung auf. Die visuelle Selektion wurde durch eine Konzentrationsbestimmung der Flüssigkulturen im Verdünnungsverhältnis 1:100 mit Hilfe einer Thomazählkammer überprüft und bestätigt (Tabelle 19).

Tabelle 19: Konidienbildung in Flüssigkulturen.

Kultur	Konzentration [Konidien/ml]
7089/nuo20.9	0,17 * 10 <sup>8</sup>
7089	0,43 * 10 <sup>8</sup>
cuco5	0,09 * 10 <sup>8</sup>
cuco5/7089	0,63 * 10 <sup>8</sup>

#### 4.2.5 Transformation in Mikrokonidien

##### Restriktion von pKSbar2-Plasmid mit BamHI und BssHII

Die Bedingungen für die Transformation in Mikrokonidien basieren auf einer Versuchsreihe mit dem Stamm 7089, welche an unserem Institut durchgeführt wurde. Zur Transformation wurde wiederum das mit BamHI und BssHII fragmentierte pKSbar2 verwendet. Die erhaltenen Transformanden wurden dem Selektionsverfahren unterworfen. Die Ergebnisse in Tabelle 20 zeigen eine leichte Erhöhung der verbliebenen Klone nach der Postselektion gegenüber den Ergebnissen bei Verwendung von Makrokonidien.

Tabelle 20: Selektionsbilanz für Restriktion mit BamHI und BssHII in Mikrokonidien

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Transformanden	7.333	124,6
gewachsene Transformanden	5.887	100,0
Präselektion bestanden	1.300	22,1
Selektion bestanden	434	7,4
Postselektion bestanden	87	1,5
Enzymatischen Test bestanden	2	0,03

Besonders auffällig ist die um etwa 10 % höhere Überlebensquote der isolierten Transformanden im Vergleich zur Transformation in den Makrokonidienstamm *cuco5*.

Die erhoffte, vereinfachte Charakterisierung der Insertionsstelle bei Verwendung von BamHI/BssHII-Fragmenten bestätigte sich nur teilweise. Sowohl transformierte Makro- als auch Mikrokonidien wiesen in mehreren Fällen unerwartete Rekombinationen an den Insertionsstellen auf, in die neben dem *bar*-Gen-Fragment auch Teile der anderen Fragmente von *pKSbar2* einbezogen waren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die transformierten Zellen mehrere Fragmente aufgenommen haben. Somit besteht die Gefahr mehrerer unabhängiger Mutationen im Genom, die bei der Suche nach Insertionen des *bar*-Gens unentdeckt bleiben würden. Um nur das gewünschte Fragment in der Transformation einzusetzen, wäre eine arbeits- und zeitintensive Aufreinigung notwendig. Die Restriktion stellt somit keine geeignete Präparationsmethode des *bar*-Gens für die Insertionsmutagenese dar. Geeigneter ist die Amplifizierung mittels PCR.

Zwei der 87 auf enzymatische Aktivität untersuchten Klone (G1-99, M3-515) wurden als Komplex I-Mutanten identifiziert. Der Klon M3-515 zeigt im Laufe der Zeit wechselhafte enzymatische Aktivität, so dass man auch in diesem Fall davon ausgehen kann, dass trotz der Transformation in Mikrokonidien keine homokaryonten Kerne vorliegen (Abbildung 23).

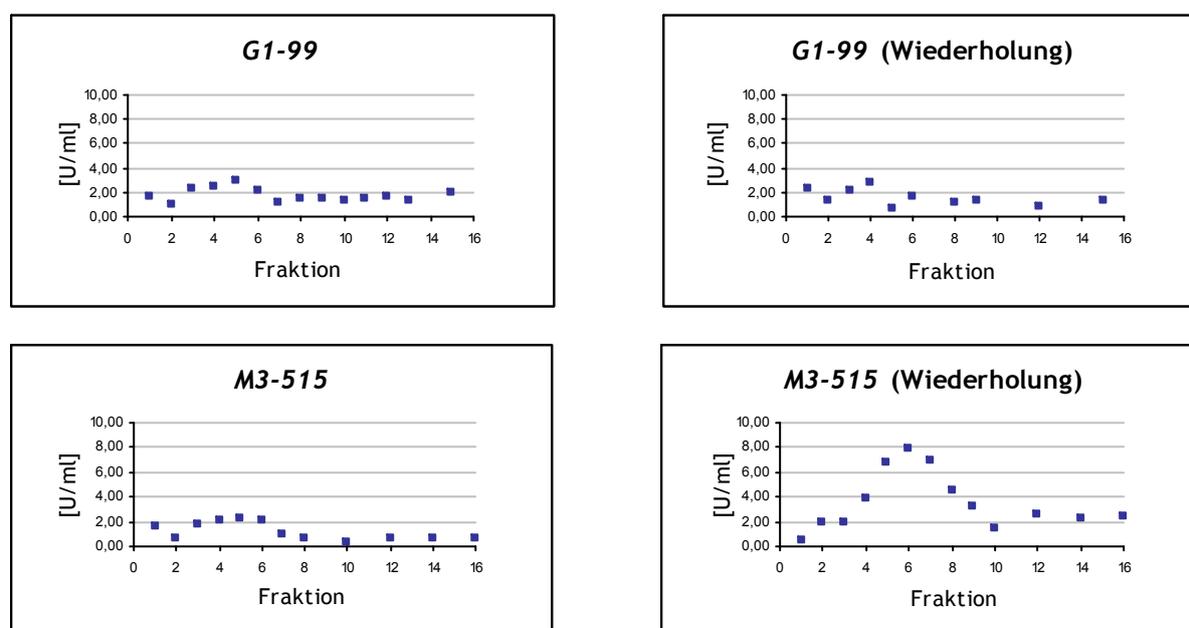


Abbildung 23: Doppelter enzymatischer Test der *cuco5/7089*-Transformanten G1-99 und M3-515 zu zwei verschiedenen Zeitpunkten.

Um eine eindeutige Aussage zu treffen, wurden Mikrokonidien von M3-515 vereinzelt und die isolierten Kolonien einer doppelten Selektion unterzogen. Von den 19 isolierten Kolonien zeigten neun eine Chinasäureabhängigkeit, drei Kolonien wiesen eindeutig keine Abhängigkeit von Chinasäure auf, während die restlichen sieben kein klares Wachstumsverhalten zeigten. Durch die Bestimmung der enzymatischen Aktivität wurden die Selektionsergebnisse bestätigt. Somit zeigt sich, dass die Transformation in Mikrokonidien für die Erzeugung homokaryonter Mutanten nicht ausreicht. Vermutlich ist durch die dichte Anordnung der Kolonien auf den Transformationsplatten eine Isolierung einzelner Klone schwer möglich, so dass häufig eine Mischung verschiedener Klone selektiert wird. Eine an das Selektionsverfahren anschließende Vereinzlung der Kerne ist für die Reproduzierbarkeit und Eindeutigkeit der Ergebnisse somit unumgänglich.

#### Amplifizierung des *bar*-Gens mittels PCR

Um die ausschließliche Inserierung des *bar*-Gens sicherzustellen wurde es für die Transformation mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden als Template pKSbar2 und die flankierenden Primer Bar3 und pUC5 verwendet. Das PCR-Produkt hatte eine Länge von 1233 Bp und trägt die komplette genetische Information zur Vermittlung der Basta-Resistenz (Abbildung 24).

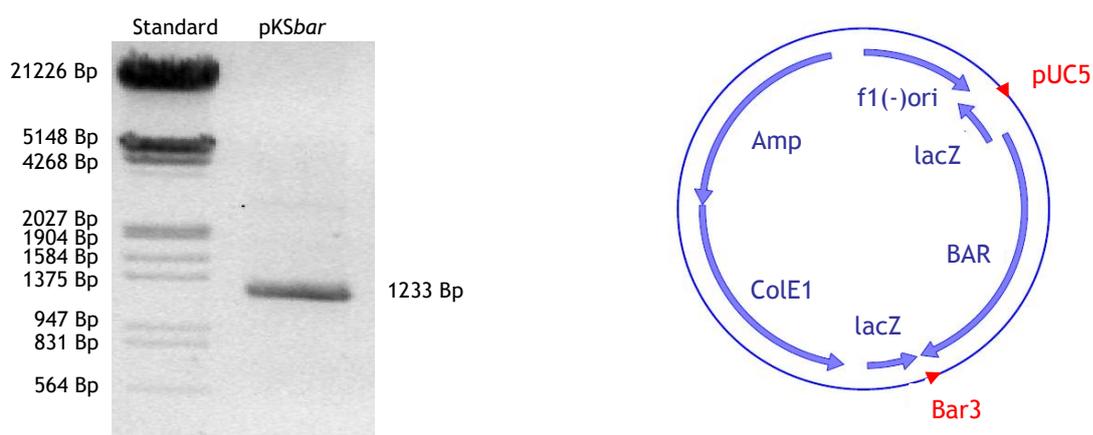


Abbildung 24: Amplifizierung des *bar*-Gens durch PCR. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 1233 Bp (links). Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen pUC5 und Bar3 im Plasmid pKSbar2 (rechts).

Die Ergebnisse in Tabelle 21 zeigen eine deutlich verbesserte Bilanz bei der Transformation in Mikrokonidien unter Verwendung des PCR-Fragments.

Tabelle 21: Selektionsbilanz für Transformationen mit pUC5/Bar3-PCR-Produkt

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Transformanden	3.378	123,5
gewachsene Transformanden	2.736	100,0
Präselektion bestanden	831	30,4
Selektion bestanden	359	13,1
Postselektion bestanden	112	4,1
Enzymatischen Test bestanden	5	0,18

Zudem wurde kaum eine willkürliche Aneinanderreihung oder Fragmentierung der inserierten Plasmid-DNA beobachtet, so dass der Einsatz von PCR-Produkt auch im Hinblick auf die Insertion eine Verbesserung darstellt. Von den 92 Klonen wurden nach wiederholtem enzymatischem Test fünf Klone als Komplex I-Mutanten identifiziert (Abbildung 25).

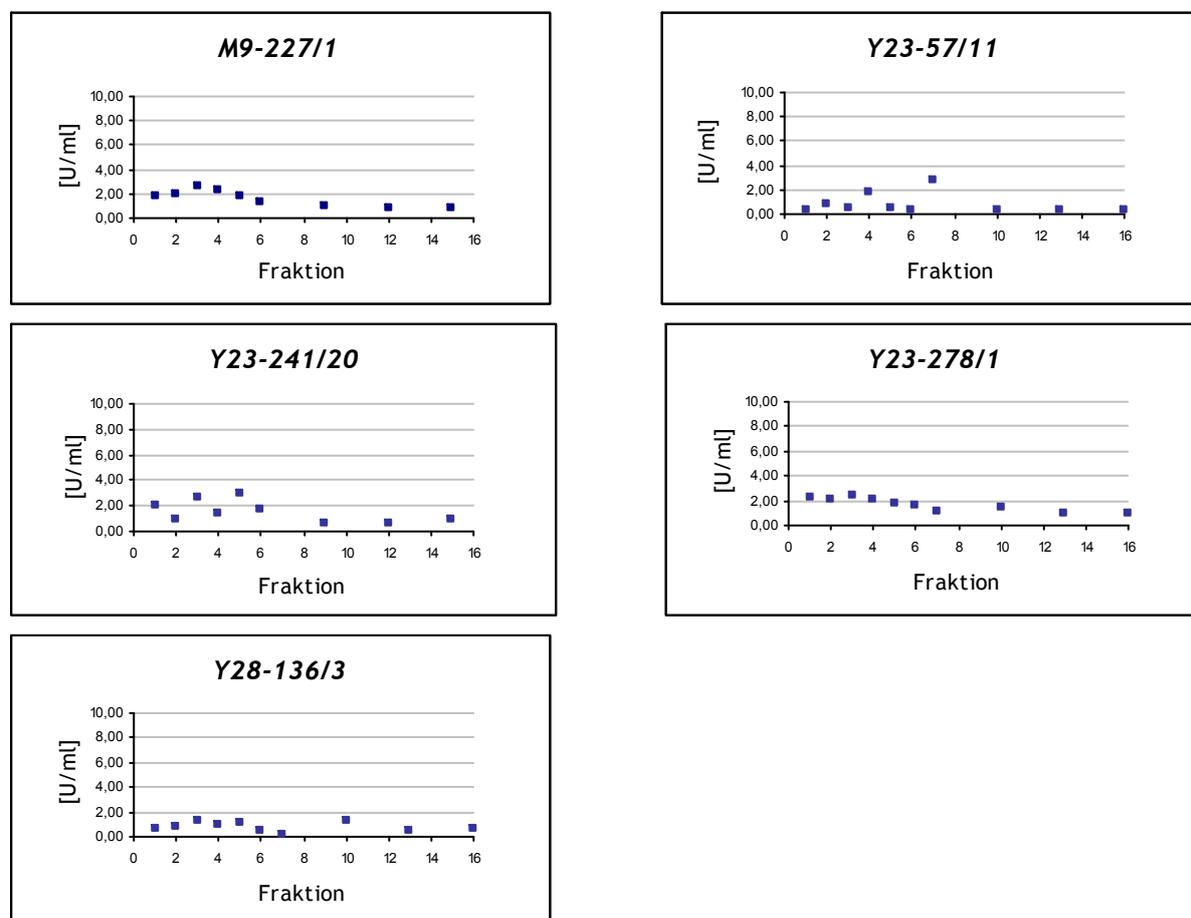


Abbildung 25: Enzymatische Aktivität der homokaryonten Klone aus Mikrokonidien.

Nach der in Abschnitt 2.8.2 aufgestellten Berechnung zur Erzeugung von Komplex I-Mutanten wurden für die 2.736 untersuchten Transformanden sechs Komplex I-Mutanten erwartet. Damit ist die Ausbeute an Mutanten bei Verwendung des PCR-Produkts in der Nähe des Erwartungswerts.

Die Insertion von Fremd-DNA erfolgt an einigen Stellen des Genoms mit erhöhter Wahrscheinlichkeit (Fernau, 2005). Um die unerwünschte Häufung einzelner Insertionsstellen zu reduzieren, wurden auch degenerierte Primer zur Amplifizierung des *bar*-Gens eingesetzt. Diese Primer entsprachen den bereits verwendeten Primern Bar3 und pUC5, wurden aber am 5'-Ende mit 25 Zufallsnukleotiden versehen. Die gebildeten PCR-Produkte wiesen dadurch zusätzliche zu den 1.233 amplifizierten Basen von *pKSbar2* an beiden Enden je 25 unterschiedliche Basen auf. In Tabelle 22 ist die Selektionsbilanz für die so erzeugten Transformanden wiedergegeben.

Tabelle 22: Selektionsbilanz für PCR mit degen. pUC5 und degen. Bar3

Selektionsschritte	Anzahl	%
isolierte Transformanden	537	102,9
gewachsene Transformanden	522	100,0
Präselektion bestanden	148	28,4
Selektion bestanden	67	12,8
Postselektion bestanden	26	5,0
Enzymatischen Test bestanden	1	0,19

Die Überlebensrate der angezogenen Transformanden ist gegenüber der Überlebensrate der Transformation mit dem einheitlicheren PCR-Produkt deutlich verbessert. Aus diesem Transformationsdurchgang ist, wie theoretisch erwartet, ein Komplex I-Klon (Y28-55/7) hervorgegangen (Abbildung 26).

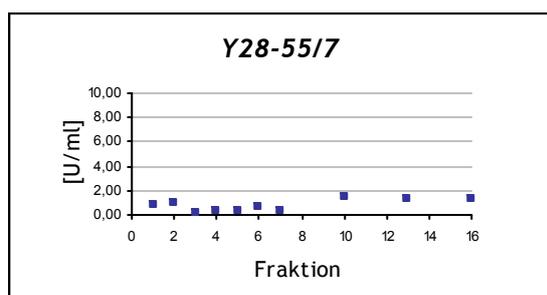


Abbildung 26: Enzymatische Aktivität des Klons Y28-55/7

### 4.3 Charakterisierung der Komplex I-Klone

Zur Bestätigung der erfolgreichen Selektion sowie zur eindeutigen Charakterisierung des Komplex I-Defektes wurde der enzymatische Test für die zwölf Mutanten im großen Maßstab wiederholt. Die weitere Charakterisierung des Defektes erfolgte mittels Western-Blot-Analyse und der Bestimmung des Cytochromgehaltes.

#### 4.3.1 Überprüfung der erzeugten Komplex I-Mutanten

Von den zwölf selektierten Komplex I-Klonen wurden in Zusammenarbeit mit Garlef Ehlig im vergrößerten Maßstab Mitochondrien isoliert und jeweils 40 mg Protein auf 12 ml-Zuckergradienten aufgetragen. Die Proteine wurden nach ihrem Sedimentationskoeffizienten aufgetrennt. Um eine geeignete Referenz zu erhalten, wurden die Stämme *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* im selben Maßstab ebenfalls vermessen (Abbildung 27).

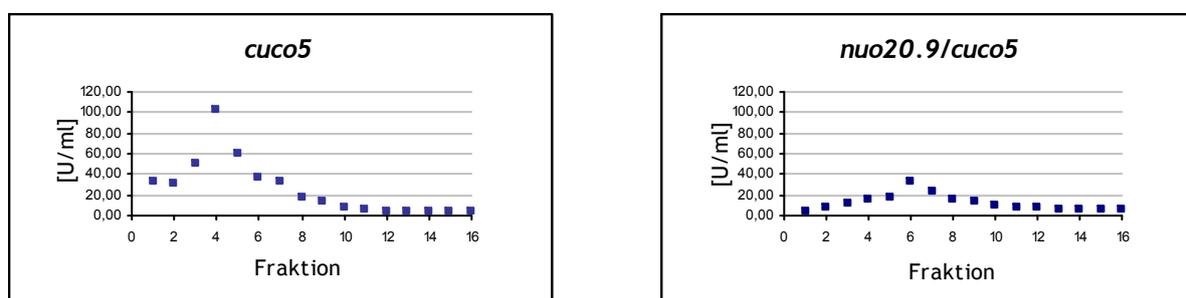


Abbildung 27: Elutionsprofil der Referenzstämme *cuco5* und *nuo20.9/cuco5*.

In der Mutante *nuo20.9/cuco5* wird der periphere Arm vollständig assembliert. Auf Grund seiner Größe sedimentiert er langsamer als der vollständige Komplex I und führt zu einem Aktivitätsgipfel im Bereich mittlerer Fraktionen.

#### Aktivitätstest der aus Makrokonidien entstandenen Transformanden

In Abbildung 28 sind die Elutionsprofile der vier potentiellen Komplex I-Klone dargestellt, die ursprünglich durch Transformation des Makrokonidienstammes *cuco5* entstanden sind und anschließend homokaryont gemacht wurden.

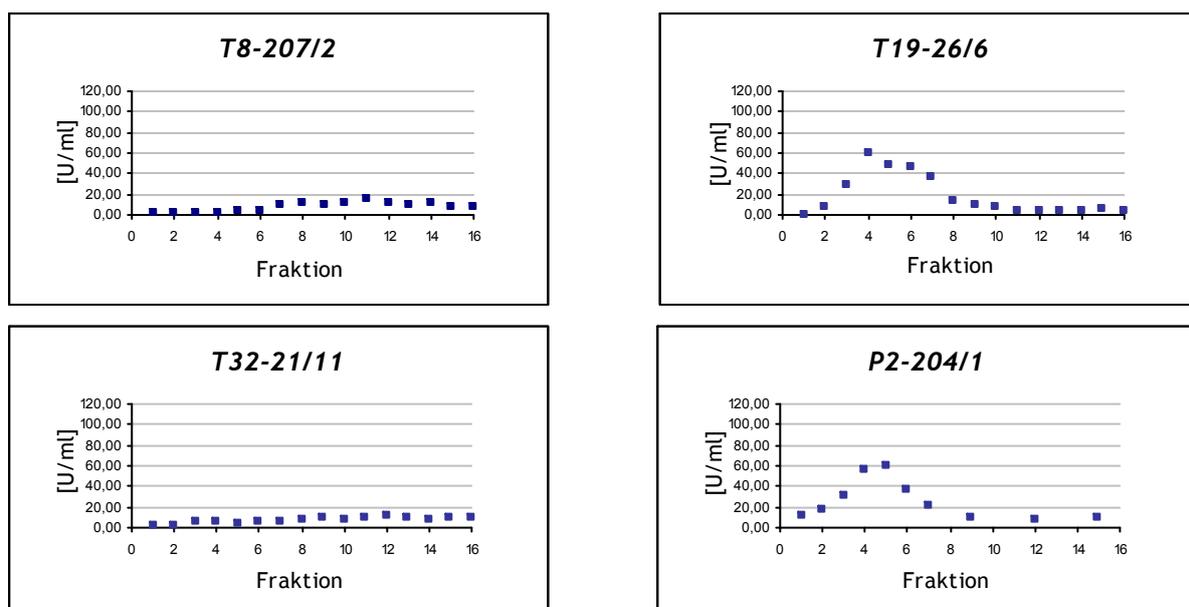


Abbildung 28: Elutionsprofile der Transformanden aus Makrokonidien.

Von den vier untersuchten Klonen zeigen nur die Proben T8-207/2 und T32-21/11 keine Komplex I-Aktivität in den niedrigeren Fraktionen. Die Proben P2-204/1 und T19-26/6 zeigen eine verringerte Aktivität mit einem leicht verschobenen Maximum im Vergleich zu *cuco5*.

#### Aktivitätstest der aus Mikrokonidien entstandenen Transformanden

Von den acht erhaltenen Mutanten besitzen Y23-57/11, Y23-241/20, Y28-55/7 und Y28-136/3 keine Komplex I-Aktivität (Abbildung 29).

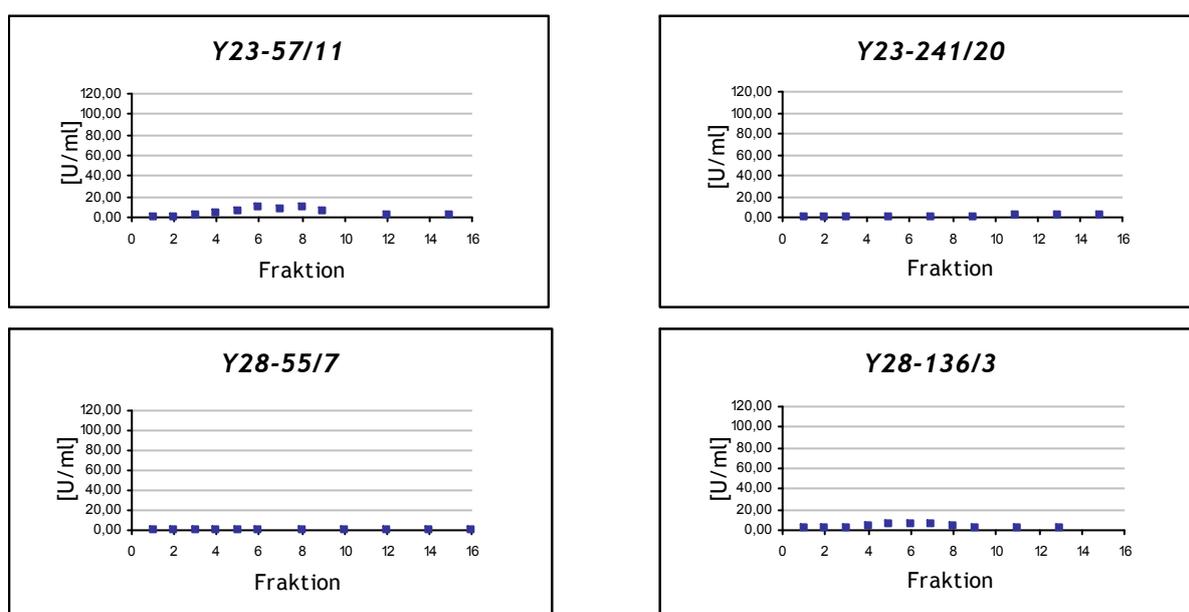


Abbildung 29: Elutionsprofile der Transformanden aus Mikrokonidien ohne Komplex I-Aktivität

Bei M9-227/1 und Y23-278/1 zeigt sich eine leichte Zunahme zu höheren Fraktionen. Die Proben G1-99/1 und M3-515/1 zeigen eine leicht bis deutlich verringerte Komplex I-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 30).

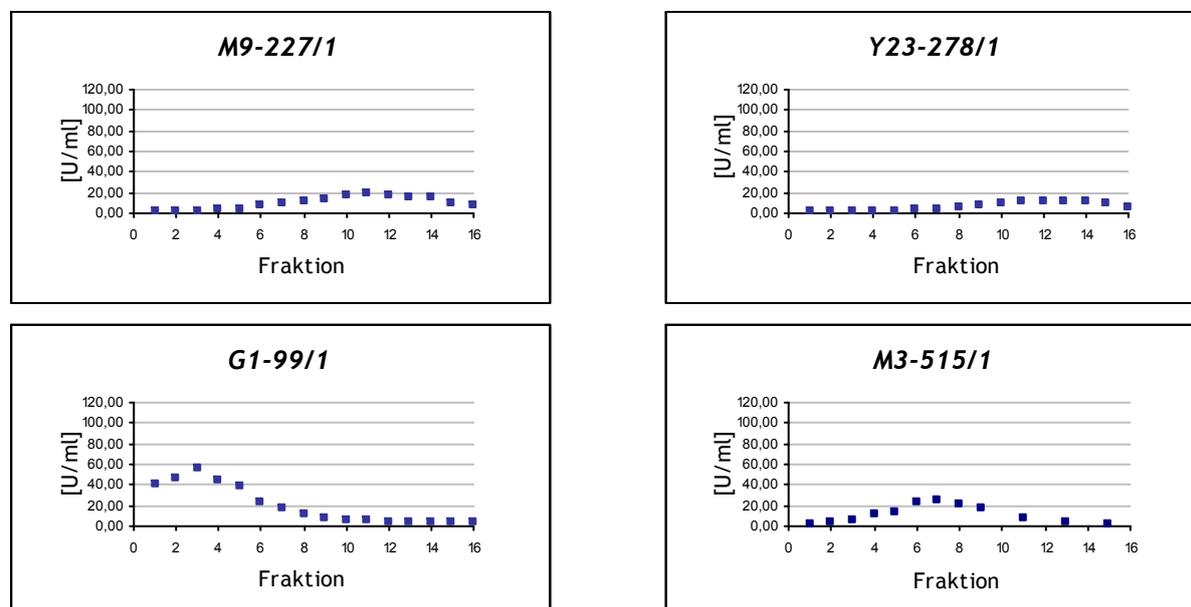


Abbildung 30: Elutionsprofile der weiteren Transformanden aus Mikrokonidien.

#### 4.3.2 Charakterisierung durch Western Blot-Analyse

Zur Bestätigung und Ergänzung der Ergebnisse wurde das Sedimentationsverhalten von Komplex I-Untereinheiten aller zwölf potentiellen Komplex I-Mutanten sowie der Referenzstämmen *cuco5* und *cuco5/7089* mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Es wurden spezifische Antikörper gegen Untereinheiten des peripheren (78, 51, 49, 40 und 21 kDa) und des membranständigen Arms (21.3a, 20.9 und 20.8 kDa) eingesetzt. Ein intakter Komplex I zeigt die stärkste Intensität der markierten Untereinheiten bei niedrigen Fraktionszahlen. Die Intensität nimmt zu höheren Fraktionszahlen stark ab.

Die Western-Blots zu den aus *cuco5* erhaltenen Stämmen P2-204/1 und T19-26/6 zeigen das für den intakten Komplex I charakteristische Bandenmuster. In Abbildung 31 ist zum Vergleich der Ausgangsstamm *cuco5* dargestellt.

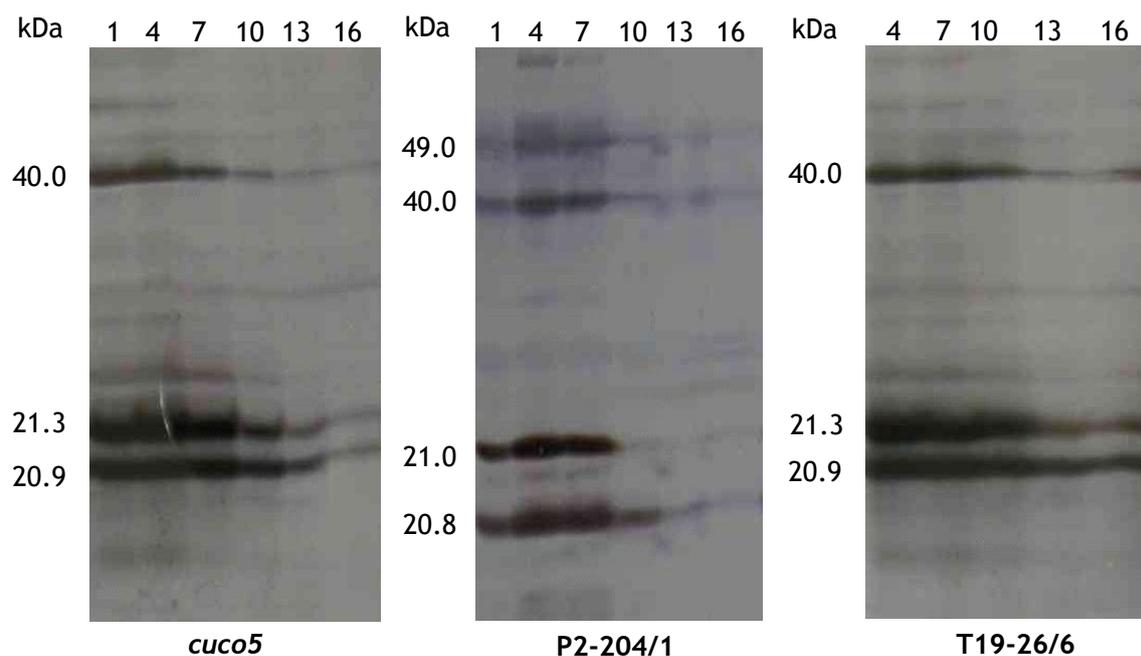


Abbildung 31: Western Blot-Analyse der Stämme *cuco5*, P2-204/1 und T19-26/6.

Die aus dem Mikrokonidienstamm *cuco5/7089* erzeugten Mutanten M3-515/1 und G1-99/1 zeigen ebenfalls das charakteristische Bandenmuster eines intakten Komplex I. Für M3-515/1 ist analog zum Aktivitätstest eine leichte Verschiebung des Maximum zu beobachten, die aber auf periphere und membranständige Untereinheiten gleichermaßen zutrifft (Abbildung 32).

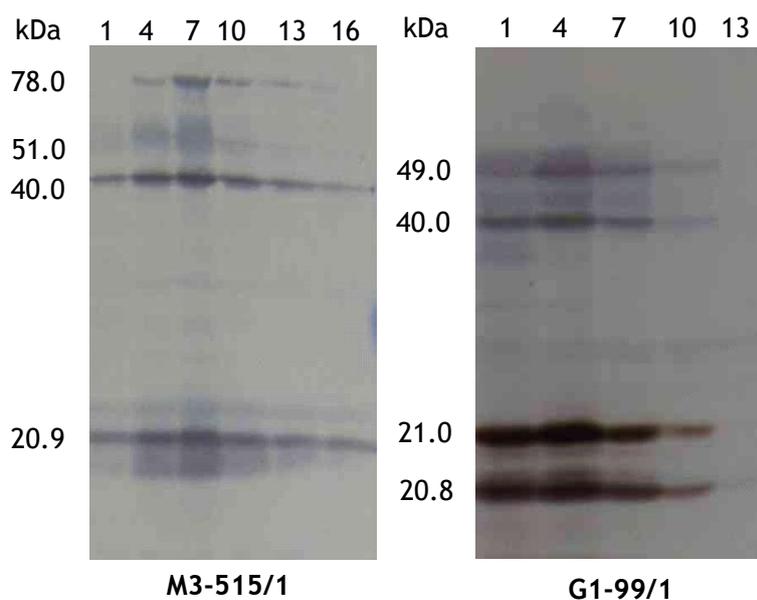


Abbildung 32: Western Blot-Analyse von M3-515/1 und G1-99/1.

Bei T8-207/2 und Y23-278/1 sind die Untereinheiten des peripheren Arms in den Fraktionen 7 bis 13 konzentriert, während die Untereinheit 20.9 kDa der großen Membranarmvorstufe fehlt. In Y23-278/1 kann die 21.3 kDa Untereinheit der kleinen Membranarmvorstufe am stärksten in Fraktion 13 nachgewiesen werden. Bei T8-207/2 ist die Bande im gleichen Bereich nur sehr undeutlich zu sehen. Es kann auf einen vollständig assemblierten peripheren und einen teilassemblierten bzw. fehlenden Membranarm geschlossen werden (Abbildung 33).

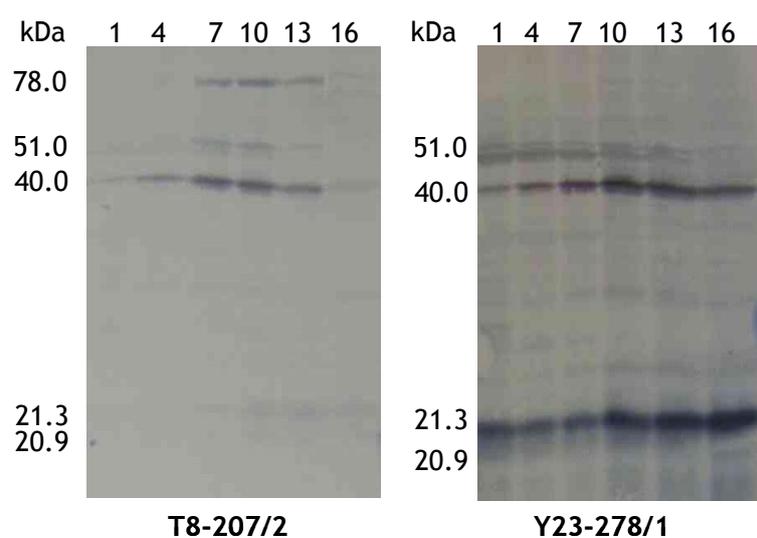


Abbildung 33: Western Blot-Analyse von T8-207/2 und Y23-278/1.

In Abbildung 34 sind die Western-Blot-Analysen der Komplex I-Mutanten Y23-241/20, Y28-55/7 und Y28-136/3 dargestellt.

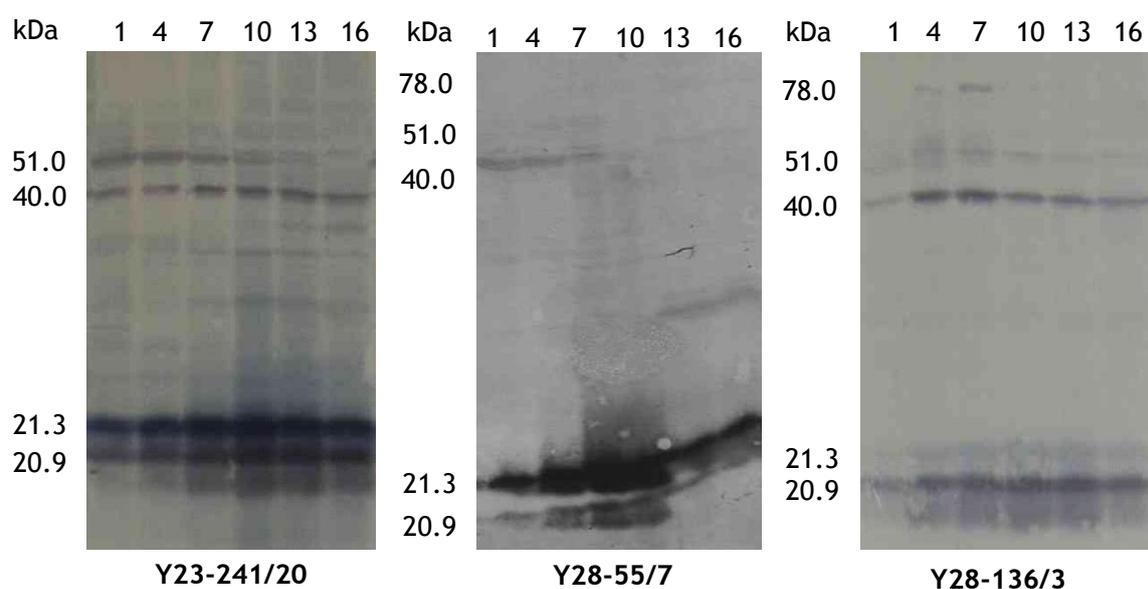


Abbildung 34: Western Blot-Analyse von Y23-241/20, Y28-55/7 und Y28-136/3.

Die Mutante Y23-241/20 zeigt, dass sowohl die membranständigen Untereinheiten, als auch die periphere Untereinheit 40 kDa zu höheren Fraktionen verschoben sind, allerdings ist die periphere Untereinheit in viel geringerer Konzentration vorhanden. Vermutlich stellt der periphere Arm den limitierenden Faktor für die Assemblierung des intakten Komplex I dar.

Im Gradienten der Mutante Y28-55/7 kommen die membranständigen Untereinheiten mit der stärksten Konzentration in den Fraktionen 7 bis 10 vor und die peripheren Untereinheiten fehlen. Vermutlich kann bei dieser Mutante nur der membranständige Arm vollständig assembliert werden.

Die Mutante Y28-136/3 zeigt eine gleichmäßige Verteilung der membranständigen Untereinheit 20.9 in den Fraktionen 4 bis 16, während nur die periphere Untereinheit 40 deutlich konzentriert in den Fraktion 4 bis 7 vorliegt. Die anderen peripheren Untereinheiten sind kaum sichtbar. Vermutlich stellt der periphere Arm den limitierenden Faktor für die Assemblierung des intakten Komplex I dar.

Die Western-Blot-Analysen der Mutanten T32-21/11, M9-227/1 und Y23-57/11 sind in Abbildung 35 dargestellt.

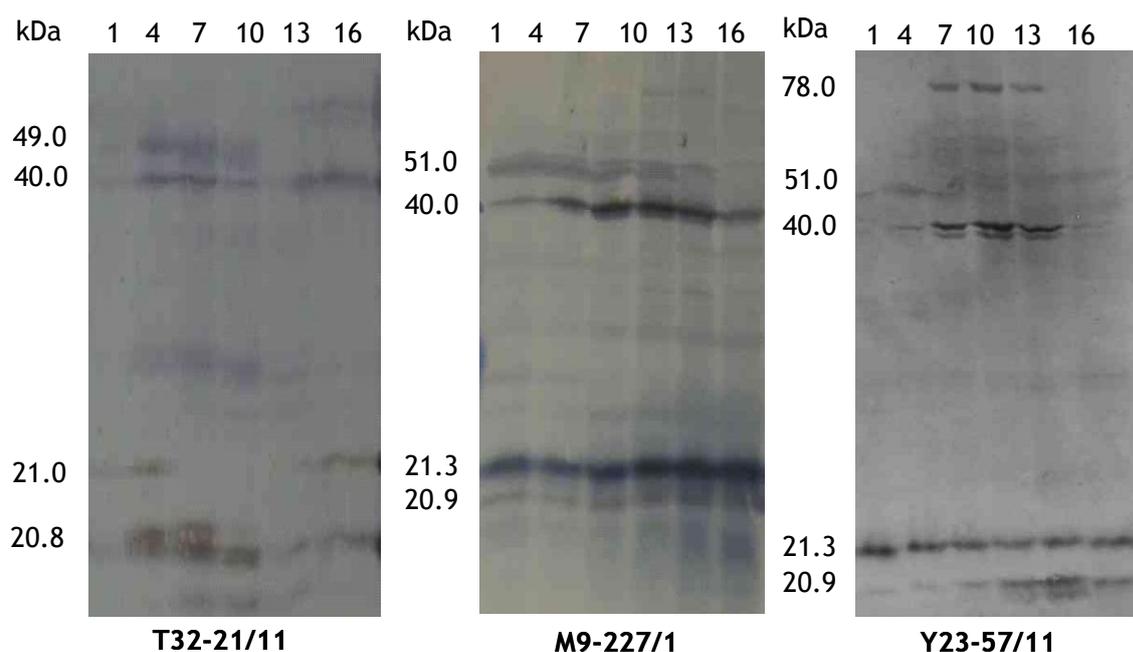


Abbildung 35: Western Blot-Analyse von T32-21/11, M9-227/1 und Y23-57/11.

Die Mutante T32-21/11 zeichnet sich trotz vergleichbarer Proteinkonzentration durch sehr geringe Intensitäten aus, so dass keine Assemblierungsintermediate identifiziert werden können.

Die Mutante M9-227/1 zeigt eine deutliche Verschiebung aller untersuchten Unterheiten zu höheren Fraktionen. Es ist keine Aussage über die entstehenden Assemblierungsintermediate möglich.

Bei Mutante Y23-57/11 liegen die Untereinheiten des peripheren Arms in Fraktion 10 konzentriert vor, während die membranständigen Untereinheiten in allen Fraktionen nahezu gleichmäßig und sehr schwach vorhanden sind. Vermutlich ist diese Mutante nur zur Assemblierung des peripheren Arms in der Lage. Eine genaue Aussage kann allerdings nicht getroffen werden.

#### 4.3.3 Charakterisierung durch Cytochrom-Bestimmung

Um die Spezifität der erzeugten Mutationen für Komplex I zu untersuchen, wurde der Gehalt der Atmungskettenkomplexe III und IV in den Mitochondrien der Mutanten bestimmt. Dazu wurde der Cytochromgehalt der zwölf potentiellen Komplex I-Mutanten mittels Differenzspektroskopie bestimmt, da eine beeinträchtigte Assemblierung von Komplex III oder Komplex IV zu einem verminderten Gehalt an Cytochrom a oder b führt.

Die drei Cytochrome a, b und c unterscheiden sich in ihren Lichtabsorptionsspektren. Bei Cytochrom a liegt die langwelligste Bande bei 605 nm, bei Cytochrom b bei 560 nm und bei Cytochrom c bei 550 nm. Zur Bestimmung der einzelnen Cytochromgehalte wurden die in Abschnitt 3.6.4 beschriebenen Wellenlängendifferenzen mit den entsprechenden Extinktionskoeffizienten verwendet.

Als Referenz wurden die Ausgangsstämme *cuco5* und *cuco5/7089* vermessen. An den Messwerten in Tabelle 23 kann man bereits erkennen, dass die Werte des Cytochromgehalts überwiegend den Cytochromgehalten der Ausgangsstämme ähneln.

Tabelle 23: Ermittelter Cytochromgehalt der untersuchten Stämme

Stamm	Cytochrom a [nmol/mg]	Cytochrom b [nmol/mg]	Cytochrom c [nmol/mg]
<i>cuco5</i>	0,07	0,10	0,26
P2-204/1	0,05	0,07	0,13
T8-207/2	0,10	0,07	0,28
T19-26/6	0,06	0,12	0,24
T32-21/11	0,14	0,44	1,58
<i>cuco5/7089</i>	0,09	0,11	0,16
G1-99/1	0,09	0,17	0,33
M3-515/1	0,07	0,10	0,14
M9-227/1	0,12	0,12	0,37
Y23-241/20	0,03	0,09	0,20
Y23-278/1	0,03	0,07	0,28
Y23-57/11	0,09	0,08	0,12
Y28-55/7	0,05	0,07	0,11
Y28-136/3	0,15	0,08	0,13

Es wurden jedoch vereinzelt deutliche Schwankungen beobachtet, wie z.B. für die Mutante T32-21/11. Es ist deshalb sinnvoll, den qualitativen Absorptionsverlauf der Spektren als zusätzlichen Anhaltspunkt in Betracht zu ziehen. Für die qualitative Betrachtung der Kurven, wurden diese zur besseren Vergleichbarkeit normiert. Somit liegt das jeweilige Maximum der Graphen bei 1 und das jeweilige Minimum bei 0. In Abbildung 36 sind die Spektren der für die Transformation verwendeten Ausgangsstämme *cuco5* und *cuco5/7089* dargestellt.

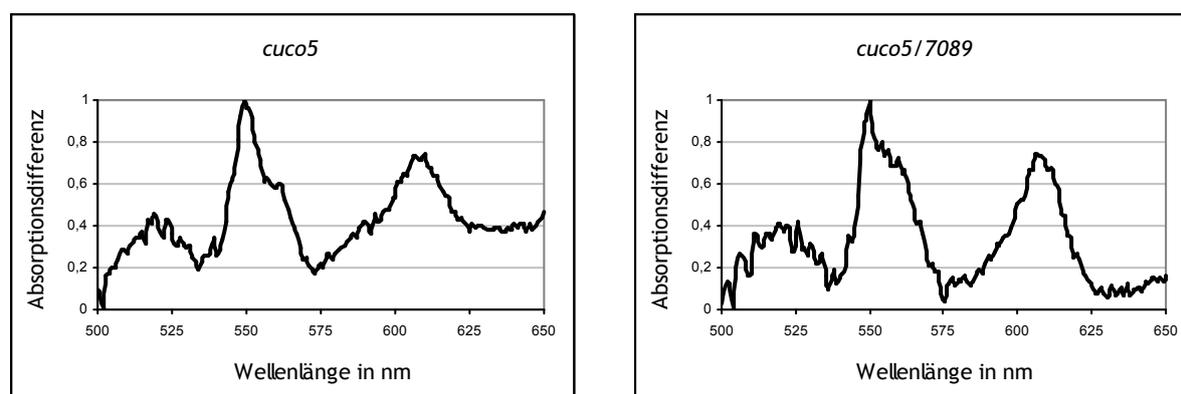
Abbildung 36: Differenzspektren der Referenzstämme *cuco5* und *cuco5/7089*.

Abbildung 37 und 38 zeigen, dass die Spektren der zwölf ausgewählten Klone dem Absorptionsverlauf der Referenzstämmen *cuco5* und *cuco5/7089* entsprechen.

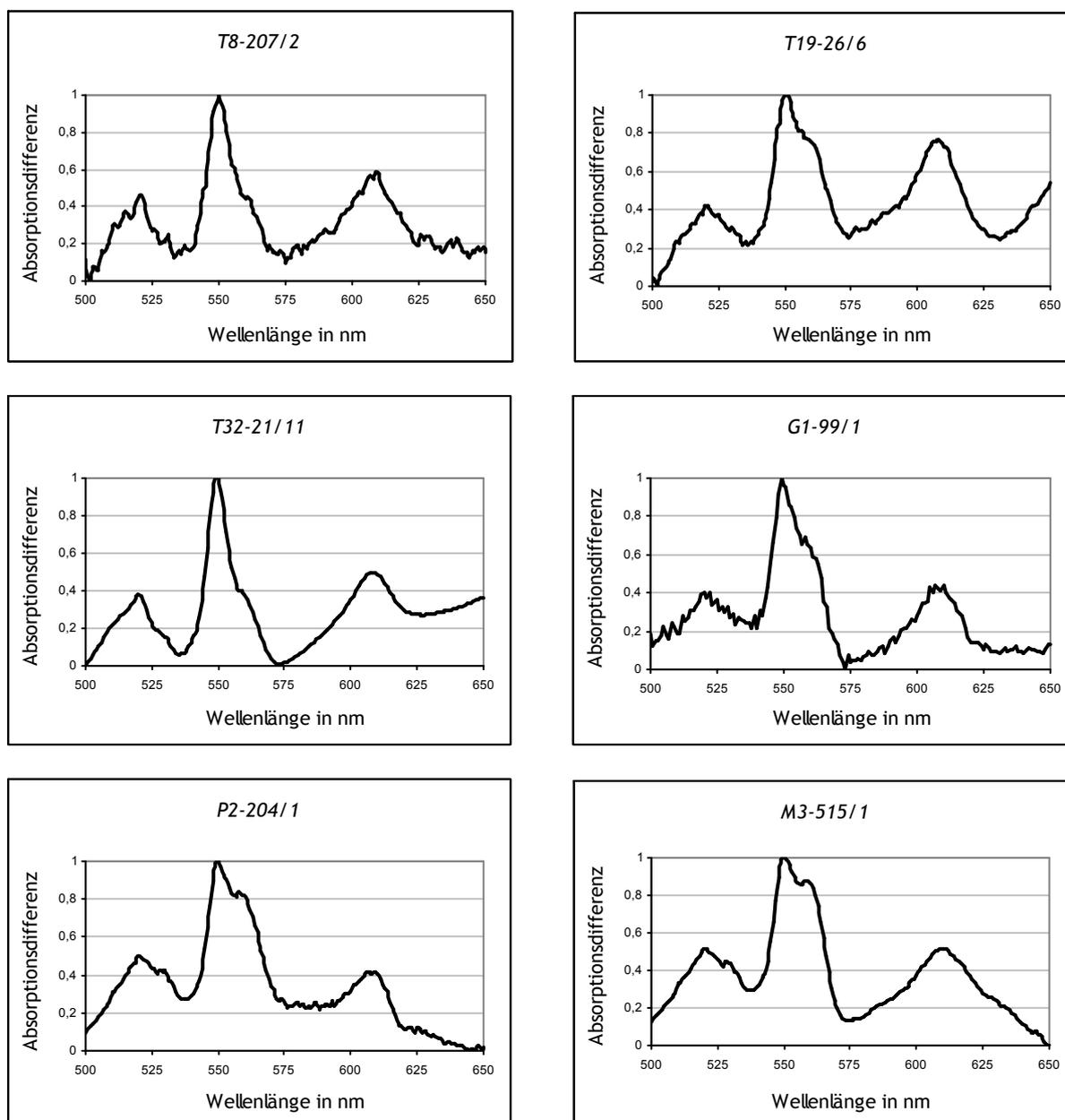


Abbildung 37: Differenzspektren der Mutanten aus Makrokonidien.

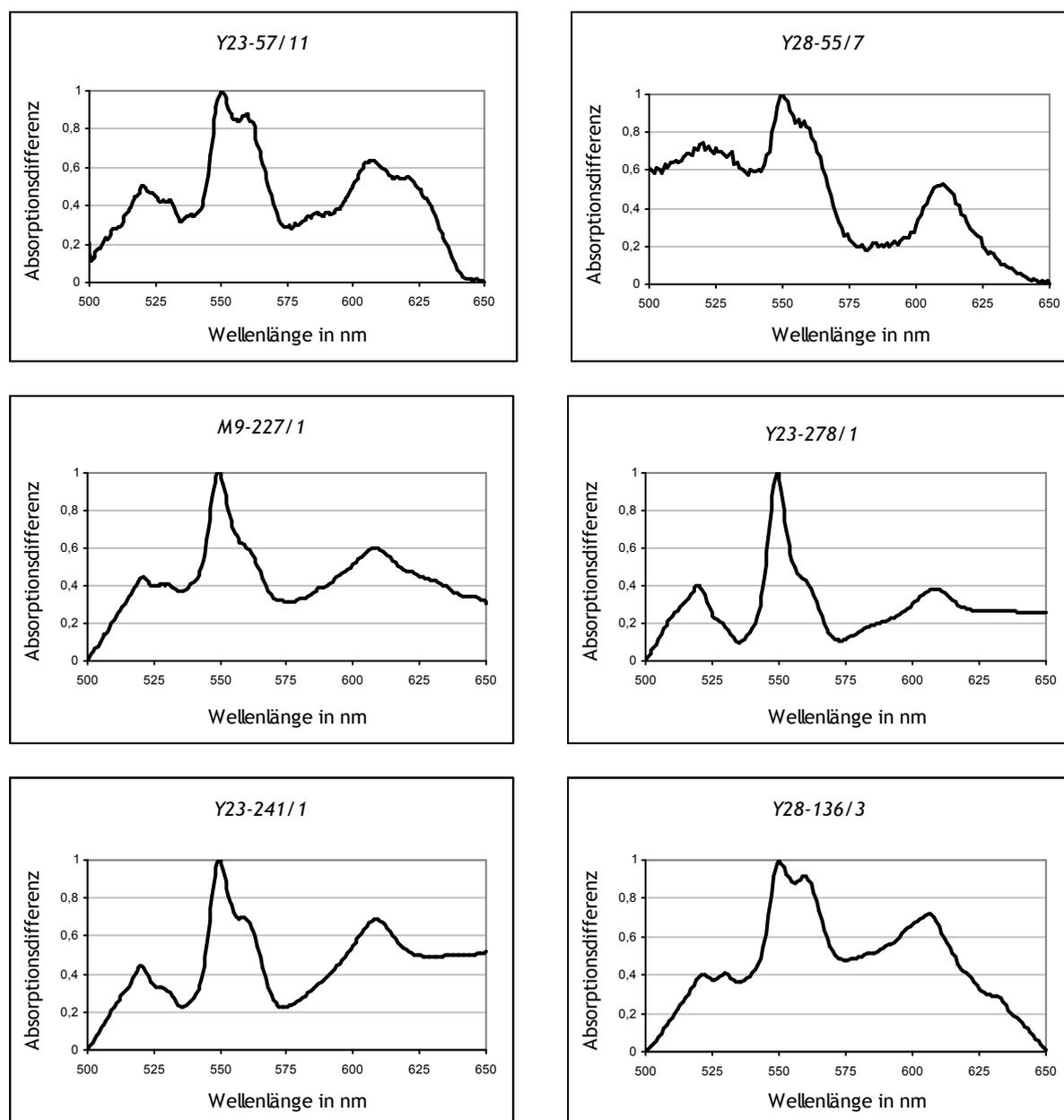


Abbildung 38: Differenzspektren der Mutanten aus Mikrokonidien.

Zusammenfassend kann, auf Grund des charakteristischen Absorptionsverlaufs bezüglich der Maxima und „Schultern“ sowie dem zu den Referenzstämmen vergleichbaren Gehalt an Cytochromen, auf die intakten Atmungskettenkomplexe III und IV geschlossen werden.

#### 4.4 Identifizierung der Insertionsstellen durch PCR

Die Insertionsstellen des *bar*-Gens wurden in zwölf selektierten Klonen mittels PCR bestimmt. Dazu wurde in dieser Arbeit neben der Vektorette-PCR als Alternative die Splinkerette-PCR angewendet, um eine mögliche Verbesserung der Identifizierung längerer DNA-Fragmente zu erreichen. Bei beiden Methoden wird die genomische DNA der potentiellen Komplex I-Klone mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend mit der Vektorette- bzw. Splinkerette-Einheit ligiert. Zur spezifischen Amplifizierung der Insertionsstelle muss eine Kombination aus Primern für das 5'- bzw. das 3'-Ende des *bar*-Gens und Primern für die Vektorette- bzw. Splinkerette-Einheit verwendet werden. Dabei ist zu beachten, dass die Schnittstelle der eingesetzten Restriktionsendonukleasen nicht zwischen der Primerbindestelle und der benachbarten genomischen DNA lokalisiert sein darf.

Bei der Vektorette-PCR wurde die genomische DNA der potentiellen Komplex I-Klone mit den Restriktionsendonukleasen *AfaI*, *AluI*, *HaeIII* und *HincII* geschnitten, welche glatte Enden erzeugen. *AfaI* kann dabei nur mit Primern des 5'-Endes kombiniert werden, während die anderen drei Restriktionsenzyme nur mit Primern des 3'-Endes kombinierbar sind (Abbildung 39).

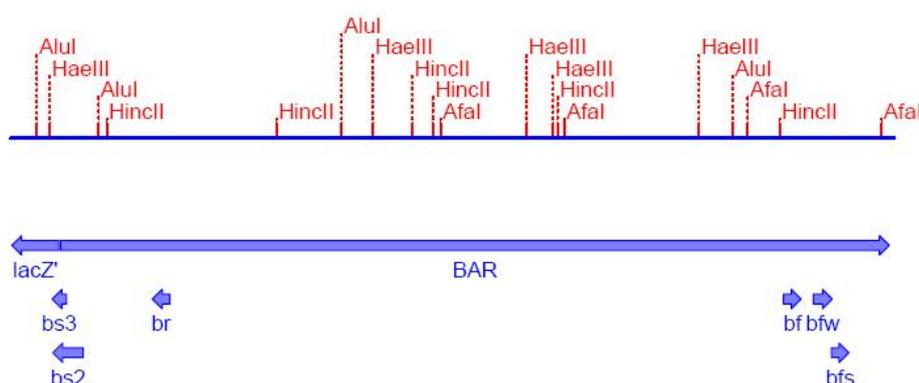


Abbildung 39: *bar*-Gen für die Vektorette-PCR mit Bindestellen der *bar*-Primer und Restriktionschnittstellen der Enzyme *AluI*, *AfaI*, *HaeIII* und *HincII*. Abkürzungen für die verwendeten Primer: *barrev* (*br*), *barseq2-2005* (*bs2*), *barseq3-2005* (*bs3*), *barforneu* (*bf*), *barforw-2005* (*bfw*) und *barforseq-2005* (*bfs*).

Für die Splinkerette-PCR wird die genomische DNA mit den Restriktionsendonukleasen HindIII, EcoRI, XbaI und XmaI geschnitten. Diese Enzyme erzeugen überhängende Enden, die mit der Splinkerette-Einheit ligiert werden können. Da XbaI im Bereich der Primerbindestelle für das 5'-Ende schneidet, können für dieses Enzym lediglich Primer für das 3'-Ende verwendet werden. EcoRI und XmaI haben keine Schnittstelle im *bar*-Gen und stehen somit ebenso für beide Richtungen zur Verfügung wie HindIII, welches das *bar*-Gen mittig schneidet (Abbildung 40).

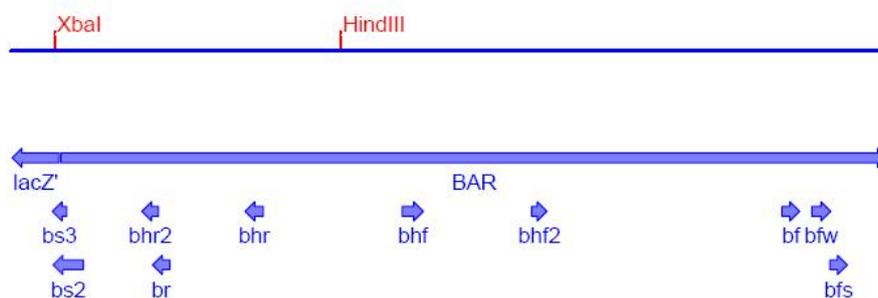


Abbildung 40: *bar*-Gen für die Splinkerette-PCR mit Bindestelle der *bar*-Primer und Restriktionschnittstellen der Enzyme XbaI und HindIII. Abkürzungen für die verwendeten Primer: barrev (br), barseq2-2005 (bs2), barseq3-2005 (bs3), barhindrev (bhr), barhindrev2 (bhr2), barhindfor (bhf), barhindfor2 (bhf2), barforneu (bf), barforw-2005 (bfw) und barforseq-2005 (bfs).

Für den ersten PCR-Durchgang wurden die Primerkombinationen für das 3'-Ende und 5'-Ende entsprechend der verwendeten Restriktionsenzymen gewählt. Zur Bestätigung des ersten PCR-Durchgangs und Erzeugung der für eine Sequenzierung notwendigen DNA-Menge wurde in einem zweiten Durchgang mittels weiter innen liegender Primer amplifiziert (Fernau, 2005). Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurde jeweils ein dritter noch weiter innen liegender Primer verwendet.

Die erhaltene Sequenz setzt sich im Erfolgsfall aus drei unterschiedlichen Bereichen zusammen: der dem Sequenzierungsprimer folgende Teil des *bar*-Gens, der anschließenden genomischen DNA bis zur erzeugten Schnittstelle und der Vektorette- bzw. Splinkerette-Einheit. Der Übergang zwischen *bar*-Gen und genomischer DNA sollte bei Transformanden aus PCR-Produkt die Bar3 bzw. pUC5-Bindestelle und für Transformanden aus den Restriktionsfragmenten die BamHI bzw. BssHII-Schnittstelle aufweisen. Die Zuordnung der erhaltenen Sequenzen und die anschließende Identifizierung der Gene erfolgte unter Verwendung der MIPS

*Neurospora crassa* Database<sup>d</sup> und der *Neurospora crassa* Database am Broad Institute<sup>e</sup> (Mewes et al., 2002; Galagan et al., 2003).

Die identifizierten Insertionsstellen lassen sich in drei Gruppen unterteilen: die Insertion in Gene, welche bekannte Untereinheiten von Komplex I kodieren, Insertionen die mehrfach in verschiedenen Mutanten auftreten, sowie einmalig auftretende Insertionsstellen. Im Folgenden ist eine Zusammenfassung und Erläuterung der Sequenzierungsergebnisse gegeben. Für jede Insertionsstelle ist neben der betroffenen Mutante und der zur Transformation eingesetzten Plasmid-DNA das verwendete Restriktionsenzym, die PCR-Methode und die Richtung der vom *bar*-Gen ausgehenden Sequenzierung aufgeführt.

#### 4.4.1 Gene für Untereinheiten von Komplex I

In den Mutanten Y28-136/3, Y23-57/11 und T8-207/2 erfolgte die Insertion in Gene, die Untereinheiten von Komplex I kodieren. Es handelt sich dabei um die 78, 21.3b und 20.9 kDa-Untereinheiten. In allen drei Fällen wurde die Insertionsstelle mittels Splinkerette-PCR amplifiziert. Tabelle 24 fasst die Daten für die Charakterisierung der Insertionsstellen zusammen.

**Tabelle 24: Übersicht für die Insertion in Gene für bekannte Untereinheiten**

Identifiziertes Gen	Kodierte Untereinheit	Mutantenstamm	In Transformation eingesetztes Plasmid	Restriktionsenzym	Sequenzierungsrichtung
b17c10_090	78 kDa	Y28-136/3	PCR-Produkt	HindIII	3'-Seite
b13d24_010	21.3b kDa	Y23-57/11	PCR-Produkt	XmaI	5'-Seite
1nc307_040	20.9 kDa	T8-207/2	Restriktion mit BamHI	XmaI	5'-Seite

#### Gen b17c10\_090

Die Sequenzierung der Insertionsstelle in Mutante Y28-136/3 zeigte, dass das Gen b17c10\_090 direkt betroffen ist. Dieses Gen kodiert für die 78 kDa-Untereinheit des peripheren Arms von Komplex I. Die erhaltene Sequenz entspricht den Basen 26.915 bis 25.942 des Contigs b17c10 der Genomsequenz, so dass zumindest die letzten 2.218 Bp des Gens vorhanden sind. Da eine Sequenzierung zum 5'-Ende des *bar*-

<sup>d</sup> MNCDB: MIPS *Neurospora crassa* Database (<http://mips.gsf.de/projects/fungi/neurospora>)

<sup>e</sup> Broad Institut *Neurospora crassa* Database ([www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora](http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora))

Gens noch aussteht, kann keine Aussage über den Verbleib der ersten 484 Bp des Gens getroffen werden. Der Übergang am 3'-Ende erfolgt wie erwartet an der Bar3-Primerbindestelle bei Position 1.759 des Plasmids pKSbar2. Abbildung 41 zeigt die schematische Darstellung der Insertion unter der Annahme, dass keine Basenpaare des betroffenen Gens deletiert wurden.

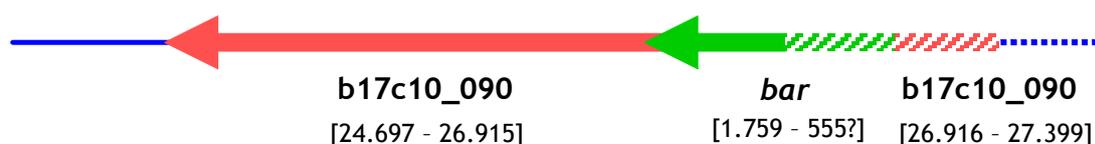


Abbildung 41: Insertionsstelle in Mutante Y28-136/3 (Erläuterung im Text).

In dieser sowie den folgenden Abbildungen ist die genomische DNA als blaue Linie und die jeweiligen kodierenden Gene in Transkriptionsrichtung als roter Pfeil dargestellt. Im Fall einer Trennung des Gens durch Insertion wird die Anfangssequenz als roter Kasten abgebildet. Das *bar*-Gen wird durch den grünen Pfeil symbolisiert, wobei die Pfeilspitze für das 3'-Ende steht. Die jeweilige Sequenz in Basenpaaren ist unter der Bezeichnung in Klammern angegeben, dabei beziehen sich die Zahlen des Inserts auf die Stelle im Plasmid (vgl. Abbildung 11). Postulierte Bereiche, die nicht durch eine Sequenzierung bestätigt wurden, sind schraffiert dargestellt.

#### Gen b13d24\_010

Die Insertion in Mutante Y23-57/11 erfolgte in das Gen b13d24\_010, das für die 21.3b kDa-Untereinheit des Komplex I kodiert. Der Bereich 3.602 bis 3.397 Bp wurde sequenziert, so dass die ersten 303 Bp wahrscheinlich intakt sind. Das Vorhandensein der letzten 656 Bp kann auf Grund der noch ausstehenden Sequenzierung in 3'-Richtung nur angenommen werden. Der Übergang von Plasmid-DNA auf genomische DNA erfolgt nicht wie erwartet an der pUC5-Primerbindestelle (Position 555 von pKSbar2), sondern etwa 150 Bp später (Abbildung 42).



Abbildung 42: 1. Insertionsstelle in Mutante Y23-57/11.

### Gen 1nc307\_040

Das Sequenzierungsergebnis zeigt nur ein Fragment des mit BamHI linearisierten Plasmids. Der sequenzierte Bereich von 11.411 bis 11.772 Bp liegt zwischen den Genen 1nc307\_040 und 1nc307\_050. 1nc307\_040 kodiert für die 20.9 kDa-Untereinheit des Komplex I, während 1nc307\_050 für ein konserviertes hypothetisches Protein mit einer Mitochondrienimportsequenz kodiert. Durch direkte PCR mit zwei spezifischen Primern und eine anschließende Sequenzierung wurde gezeigt, dass nur die ersten 590 Bp des Gens 1nc307\_040 vorhanden sind. Der Übergang erfolgt allerdings nicht direkt von der genomischen DNA zu der Plasmidsequenz, sondern über eine Vektorsequenz unbekannter Herkunft (Abbildung 43).

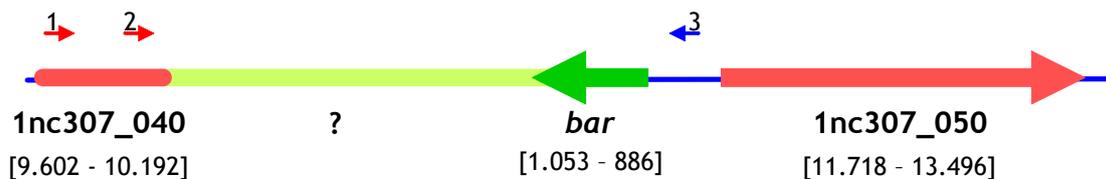


Abbildung 43: 1. Insertionsstelle in Mutante T8-207/2. Die unbekannte Vektorsequenz (?) ist hellgrün gekennzeichnet. Die direkte PCR erfolgte mit den Primern Not20.9A (1) und contig3.83-1 (3). Für die Sequenzierung wurde der Primer contig3.83-2bi (2) verwendet.

Das inserierte *bar*-Gen weist lediglich 167 Bp auf und zeigt somit die für BamHI bereits erwähnte willkürliche Fragmentierung. Es ist davon auszugehen, dass durch diese Insertion keine Basta-Resistenz vermittelt wurde.

#### 4.4.2 Bevorzugte Insertionsstellen

Die Insertion des *bar*-Gens in die Gene *b8g12\_390* und *b10c3\_130* wurde in mehreren Mutanten nachgewiesen. *b8g12\_390* kodiert für ein konserviertes hypothetisches Protein mit einer Mitochondrienimportsequenz und *b10c3\_130* wahrscheinlich für eine Glutathion-Reduktase. Im Folgenden sind die Ergebnisse für die einzelnen Gene zusammengefasst.

##### Gen *b8g12\_390*

In den Mutanten T19-26/6, T32-21/11 und M3-515/3 lag eine Insertion in das Gen *b8g12\_390* vor. Tabelle 25 zeigt die verschiedenen Sequenzierungsvorgänge.

Tabelle 25: Übersicht für die Insertion in das Gen *b8g12\_390*

Mutantenstamm	In Transformation eingesetztes Plasmid	Restriktionsenzym	PCR-Methode	Sequenzrichtung	Position der Integration
T19-26/6	BamHI/BssHII-Restriktion	HaeIII	Vektorette	3'-Seite	118.165 - 118.169
T32-21/11	BamHI/BssHII-Restriktion	AluI	Vektorette	3'-Seite	118.165 - 118.272
T32-21/11	BamHI/BssHII-Restriktion	EcoRI	Splinkerette	5'-Seite	
M3-515/3	BamHI/BssHII-Restriktion	XmaI	Splinkerette	3'-Seite	118.165 - 118.166

In Abbildung 44 ist schematische die Insertion des *bar*-Gens in der Mutante T19-26/6 dargestellt.

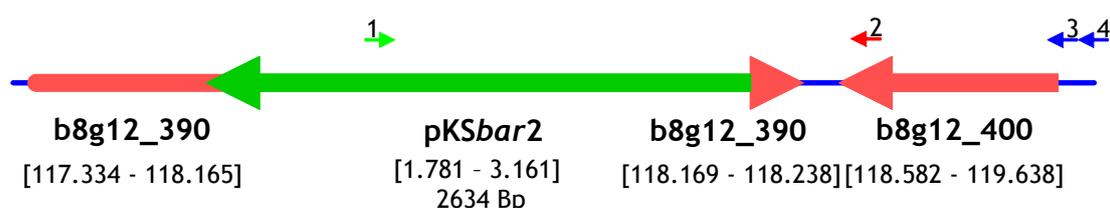


Abbildung 44: Insertionsstelle des *bar*-Gens in *b8g12\_390* in der Mutante T19-26/6. Als Primer für direkte PCR wurden *barhindrev* (1) und T19-hyp0 (4) verwendet. Für die Sequenzierung der 5'-Seite wurden die Primer T19-hyp1seq (2) und T19-hyp1 (3) verwendet.

In der Mutante T19-26/6 erfolgte der Übergang am 3'-Ende von der BamHI-Schnittstelle des Plasmids auf die genomische Sequenz 118.165 - 117.302. Durch direkte PCR mit den Primern *barhindrev* (1) und T19-hyp1 (3) und einer anschließenden Sequenzierung mit T19-hyp1seq (2) wurde am 5'-Ende des Plasmids

der Übergang auf die letzten 70 Bp des Gens gezeigt. Das inserierte Plasmid ist dabei um etwa 1.500 Bp länger als erwartet. Da drei Basenpaare des Gens durch die Insertion deletiert wurden, kann das Gen bis auf die letzten 73 bp (118.166 - 118.238) korrekt abgelesen werden.

Die Sequenzierungsergebnisse für T32-21/11 zeigen den gleichen Übergang an der 3'-Seite von der BamHI-Schnittstelle zur genomischen DNA. An der 5'-Seite fehlen die letzten 73 Bp des Gens sowie weitere 34 Bp der nachfolgenden, nicht-kodierenden DNA. Das inserierte Plasmid ist dabei um etwa 200 Bp länger als erwartet.

Für M3-515/1 wurde ebenfalls der Übergang der BamHI-Schnittstelle des Plasmids auf das Gen am Basenpaar 118.165 identifiziert. PCR mit den Primern barhindrev (1) und T19-hyp0 (4) und anschließende Sequenzierung mit T19-hyp1 (3) zeigte, dass die Insertion ohne Basenpaarverlust der genomischen DNA erfolgt war. Die inserierte Plasmidsequenz ist dabei identisch zu der von Mutante T19-26/6.

### Gen b10c3\_130

Die Mutanten Y23-57/11, M9-227/1 und Y23-278/1 wurden entsprechend Tabelle 26 untersucht und weisen alle eine Insertion in das Gen b10c3\_130 auf.

**Tabelle 26: Übersicht für die Insertion in das Gen b10c3\_130**

Mutantenstamm	In Transformation eingesetztes Plasmid	Restriktionsenzym	PCR-Methode	Sequenzrichtung	Position der Integration
M9-227/1	PCR-Produkt	XmaI	Splinkerette	3'-Seite	51.241 - 52.912
Y23-278/1	PCR-Produkt	XmaI	Splinkerette	3'-Seite	
Y23-57/11	PCR-Produkt	XmaI	Splinkerette	3'-Seite	
Y23-57/11	PCR-Produkt	HindIII	Splinkerette	5'-Seite	

Die Insertionsstellen zeigen bei allen Mutanten den identischen Übergang an der 3'-Seite des PCR-Produkts auf die genomische DNA im Sequenzbereich 51.241 bis 50.348. In Abbildung 45 werden die Insertionen in das Gen mittels Vergleich zum Wildtyp erläutert.

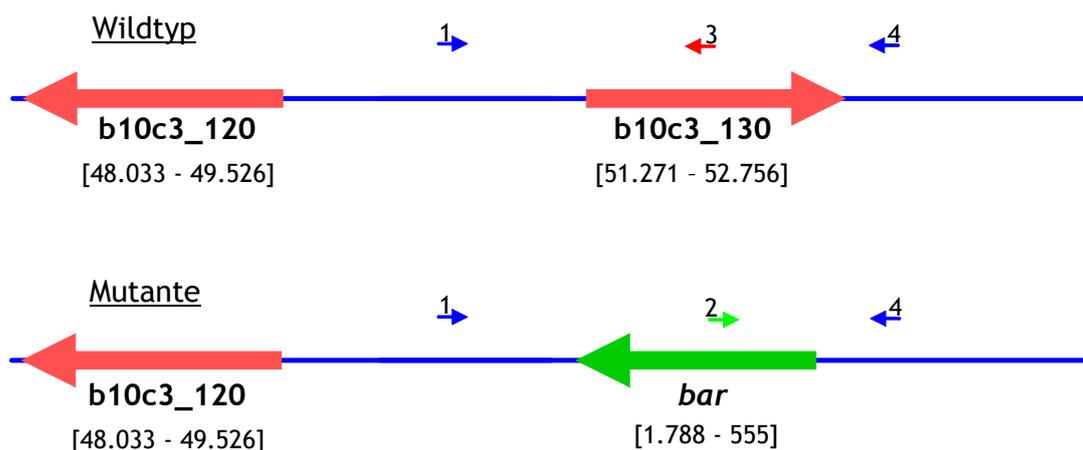


Abbildung 45: Insertionsstelle des *bar*-Gens in *b10c3\_130* im Vergleich zum Wildtyp. Die direkte PCR erfolgte mit den Primern *b10c3-1* (1), *barhindrev* (2), *b10c3-2* (3) und *b10c3-4* (4).

Der sequenzierte Bereich liegt genau 30 Bp vor dem Gen *b10c3\_130*. Für Y23-57/11 wurde gezeigt, dass das Gen gänzlich deletiert wurde. Der 5'-Übergang des Plasmids erfolgte auf die genomische DNA am Basenpaar 52.912, d.h. 166 Bp nach dem Ende des Gens. Durch direkte PCR mit verschiedenen Primern wurde auch für die anderen Mutanten nachgewiesen, dass das Gen direkt betroffen wurde (Tabelle 27).

Tabelle 27: Charakterisierung der Insertionsstelle in *b10c3\_130*

Primer 1	Primer 2	Wildtyp	M9-227/1	Y23-278/1	Y23-57/11
<i>b10c3-1</i>	<i>b10c3-2</i>	1.485 Bp	-	-	-
<i>b10c3-4</i>	<i>barhindrev</i>	-	1.200 Bp	1.200 Bp	1.200 Bp

Für den Fall einer verlustfreien Insertion hätte durch die Primerkombination *b10c3-4* und *barhindrev* ein PCR-Produkt mit einer Länge von 2.900 Bp erhalten werden müssen. Erstaunlicherweise ergibt sich für alle Mutante die gleiche Fragmentgröße, so dass von einer nahezu identischen Inserierung auszugehen ist. Neben der Deletion des Gens *b10c3\_130* kann die Beeinträchtigung der Promotorregion des Gens *b10c3\_120*, welches für ein konserviertes hypothetisches Protein kodiert, nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.4.3 Einfach auftretende Insertionsstellen

Im Folgenden werden Insertionsstellen erläutert, die nur einmal bei der Untersuchung der Mutanten aufgetreten sind. Dabei wurde für T8-207/2, T32-21/11 und Y23-57/11 je eine weitere Insertionsstelle identifiziert. Die Mutanten G1-99/3, P2-204/1 und Y28-55/7 weisen lediglich eine einmalige Insertion in die genomische DNA auf. Für Mutante Y23-241/20 erfolgte bisher keine eindeutige Sequenzierung.

Tabelle 28: Übersicht für die einmalig erfolgten Insertionen

Identifizierte Stelle in der genomischen DNA	Mutantenstamm	Restriktionsenzym	PCR-Methode	Sequenzrichtung
b11h7_100 - b11h7_090	T8-207/2	HaeIII	Vektorette	3'-Seite
b11e5_140-b11e5_150	T32-21/11	EcoRI	Splinkerette	3'-Seite
7nc448_190	Y23-57/11	HaeIII	Vektorette	3'-Seite
b22k18_190	P2-204/1	HaeIII	Vektorette	3'-Seite
b22k18_190	P2-204/1	AfaI	Vektorette	5'-Seite
1nc425_020	G1-99/3	HincII	Vektorette	5'-Seite
ncu10033.1	Y28-55/7	HindIII	Splinkerette	5'-Seite

#### DNA-Sequenz zwischen b11h7\_100 und b11h7\_090

Für die Mutagenese wurde mit BamHI linearisierte Plasmid-DNA verwendet. In der Sequenzierung erfolgt der Übergang von Plasmid auf genomische DNA nicht wie erwartet an der BamHI-Schnittstelle sondern etwa 2.300 Bp davon entfernt. Das 5'-Ende des Inserts konnte nicht identifiziert werden. Das 3'-Ende liegt, für den Fall der einfachen Insertion ohne Basenpaarverlust, 4.991 Bp von dem Gen b11h7\_090, welches für eine mögliche Glutamin-Synthetase kodiert, und nur 778 Bp von dem für ein konserviertes hypothetisches Protein kodierende Gen b11h7\_100 entfernt. Auf Grund der in Abbildung 46 dargestellten Lage des pKSbar2-Plasmids kann sowohl das Gen b11h7\_100 direkt als auch die Promotor-Region des Gens b11h7\_090 betroffen sein.

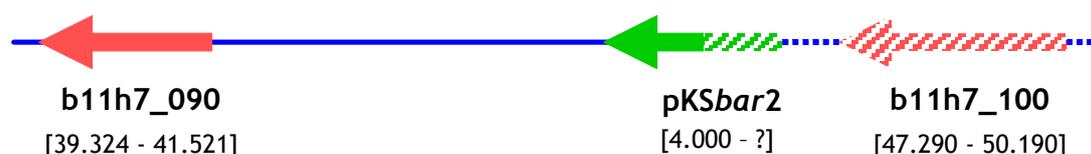


Abbildung 46: 2. Insertionsstelle des *bar*-Gens in T8-207/2.

### DNA-Sequenz zwischen b11e5\_140 und b11e5\_150

Für die Restriktion des Plasmids wurden die Enzyme BamHI und BssHII verwendet. Die Sequenzierung zeigt, dass der Übergang vom Plasmid zur genomischen DNA bei 1.685 Bp erfolgt. Das Plasmid bricht also ca. 100 Bp vor der BamHI-Schnittstelle ab. Das 3'-Ende des Inserts liegt dabei 1.977 Bp von dem für ein konserviertes hypothetisches Protein kodierende Gen b11e5\_140 und 2.449 Bp von b11e5\_150 entfernt, welches für ein mit dem Transkriptionsaktivator Mut3p verwandtes Protein kodiert (Abbildung 47).

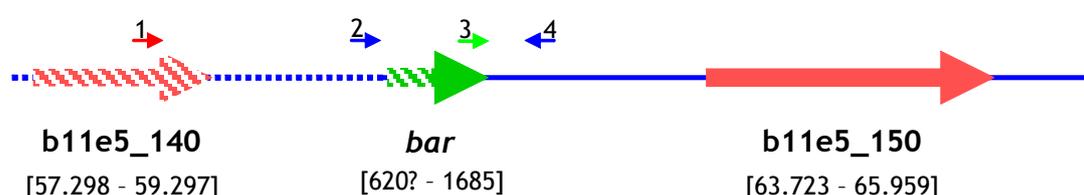


Abbildung 47: 2. Insertionsstelle des *bar*-Gens in T32-21/11. Die direkte PCR wurde mit den Primern b11e5-0 (1), b11e5-1 (2), barforneu (3) und b11e5-2 (4) durchgeführt.

Auch hierbei wurde der Fall einer einfachen Insertion ohne Basenpaarverlust der genomischen DNA bei erfolgreicher Restriktion des Plasmids an der BssHII-Schnittstelle angenommen. Durch direkte PCR wurde versucht die Insertionsstelle auf der 5'-Seite des *bar*-Gens zu charakterisieren. Dazu wurden die in Tabelle 29 zusammengefassten Primerkombinationen verwendet.

Tabelle 29: Direkte PCR auf das Gen b11e5\_140

Primer 1	Primer 2	Wildtyp	T32-21/11
barforneu	b11e5-2	-	773 Bp
b11e5-0	b11e5-2	3.483 Bp	-
b11e5-1	b11e5-2	907 Bp	-

Da nur der Primer barforneu ein PCR-Produkt mit dem genspezifischen Primer b11e5-2 bildet, ist von einer Deletion der beiden anderen Primerbindestellen auszugehen. Der Primer b11e5-0 bindet im Gen b11e5\_140, so dass dieses Gen offensichtlich betroffen ist. Zusätzlich ist eine Beeinträchtigung der Promotorregion des Gens b11e5\_150 nicht auszuschließen.

Gen 7nc448\_190

Die Sequenzierung zeigt, dass die Insertionsstelle in der Mitte des Gens 7nc448\_190 liegt. Das Gen kodiert wahrscheinlich einen Elongationsfaktor. Zur Mutagenese wurde dabei das mit pUC5 und Bar3 erstellte PCR-Produkt verwendet. Der Übergang auf die genomische DNA erfolgt am 3'-Ende wie erwartet nach der Bar3-Primerbindestelle. Da bislang keine Sequenzierung der 5'-Seite durchgeführt wurde, stellt Abbildung 48 den Fall für die verlustfreie Insertion des PCR-Produktes dar.

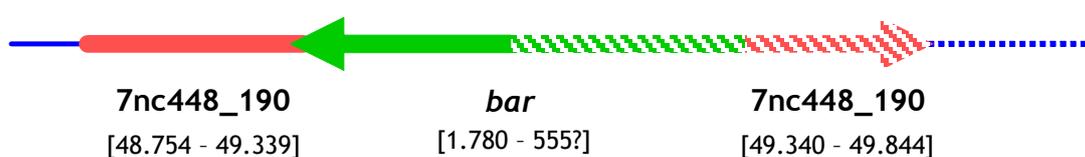


Abbildung 48: 2. Insertionsstelle des *bar*-Gens in Y23-57/11.

Gen b22k18\_190

Durch Sequenzierung in beide Richtungen wurde die Insertion des Restriktionsprodukts aus BamHI und BssHII in das Gen charakterisiert. Eine anschließende direkte PCR bestätigt, dass durch die Insertion die ersten 72 Bp des für ein wahrscheinlich ribosomales Protein kodierenden Gens b22k18\_190 deletiert wurden. Zwischen *bar*-Gen und genomischer DNA wurden weitere Fragmente des Plasmids inseriert. Dabei wurde am 3'-Ende die Plasmidsequenz 2.910 - 3.130 Bp und am 5'-Ende die Plasmidsequenz 3.666 - 619 Bp identifiziert. Da weitere 62 Bp der auf das Gen folgenden nicht-kodierenden DNA fehlen, ist eine Beeinträchtigung des Promotorbereichs für das 425 Bp entfernte Gen b22k18\_200, welches ebenfalls für ein ribosomales Protein kodiert, nicht auszuschließen (Abbildung 49).

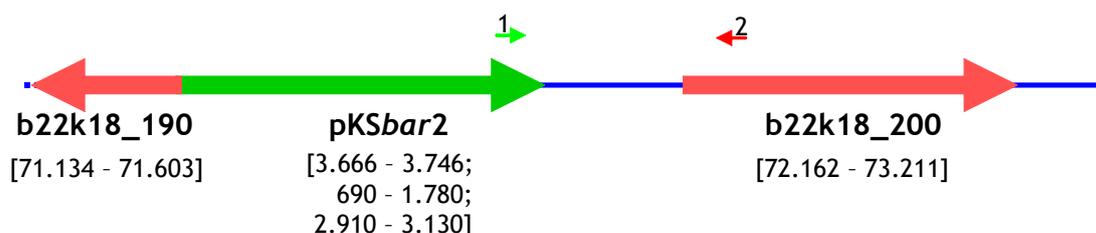


Abbildung 49: Insertionsstelle des *bar*-Gens in P2-204/1. Die direkte PCR erfolgte mit den Primern barforw-2005 (1) und ribprim (2).

Gen 1nc425\_020

Das Sequenzierungsergebnis zeigte bereits, dass das Gen direkt betroffen ist. 1nc425\_020 kodiert für ein konserviertes hypothetisches Protein. Durch direkte PCR wurde bestätigt, dass die Insertion des aus der Restriktion mit BamHI und BssHII stammenden Plasmids das Gen teilt. Der Übergang erfolgt (Abbildung 50).

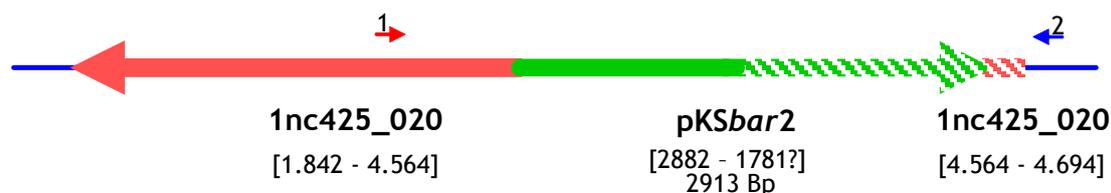


Abbildung 50: Insertion des *bar*-Gens in G1-99/1. Es wurden die Primer G1-hyp1 (1) und G1-hyp2 (2) verwendet. Für den Wildtyp wurde eine PCR-Fragment von 1.107 Bp erwartet. Für die Mutante wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 4.020 amplifiziert.

Der 3'-Übergang des inserierten *bar*-Gens konnte bisher noch nicht sequenziert werden. Allerdings konnte durch die direkte PCR ein im Vergleich zum Wildtyp um 2.900 Bp größeres Fragment amplifiziert werden. Das Plasmid weist vermutlich den erwarteten Übergang auf der 3'-Seite an der BamHI-Schnittstelle auf. Die Insertion ist damit wahrscheinlich ohne Verlust von genomischer DNA erfolgt.

Gen ncu10033.1

In der Mutante Y28-55/7 wurde mittels degenerierter Primer erzeugtes PCR-Produkt integriert. Das Sequenzierungsergebnis zeigt die für das PCR-Produkt erwartete pUC5-Bindestelle am 5'-Ende. Anschließend folgt eine nicht kodierende Sequenz die 802 bp vor dem offenen Leseraster (ORF) ncu10033.1 liegt (Abbildung 51).

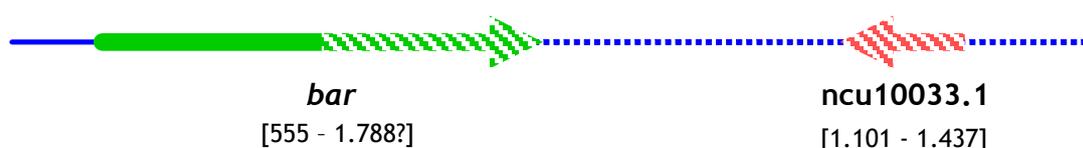


Abbildung 51: Insertion des *bar*-Gens in Y28-55/7.

In Tabelle 30 ist eine Auflistung aller identifizierten Insertionsstellen gegeben, wobei zwischen direkt betroffenen Genen und der möglichen Beeinträchtigung einer Promotorregion unterschieden wird. Die mit \* gekennzeichneten Bereiche können auf Grund fehlender Daten nur vermutet werden.

**Tabelle 30: Übersicht der Insertionsstellen<sup>f</sup>**

Gen	Beschreibung mit TargetP	Bereich
b17c10_090	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 78K chain precursor	direkt
b13d24_010	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) 21.3K chain	direkt
1nc307_040	NADH-ubiquinone oxidoreductase 21 kDa subunit	direkt
1nc307_050	conserved hypothetical protein, Mitochondrion RC=3	Promotor
b8g12_390	hypothetical protein, Mitochondrion RC=5	direkt
b10c3_130	probable glutathione reductase, NADPH	direkt
b10c3_120	conserved hypothetical protein	Promotor
b11h7_100	conserved hypothetical protein	direkt*
b11h7_090	probable glutamine synthetase	Promotor
b11e5_140	hypothetical protein	direkt
b11e5_150	related to transcriptional activator Mut3p	Promotor
7nc448_190	probable translation elongation factor eEF-1 beta chain, Secretory pathway RC = 5	direkt
7nc448_200	hypothetical protein	Promotor*
b22k18_190	probable ribosomal protein S25.e.c7	direkt
b22k18_200	probable 40S ribosomal protein S5	Promotor
1nc425-020	conserved hypothetical protein	direkt
ncu10033.1	questionable orf	direkt*

65 % der identifizierten Insertionen erfolgten direkt in ein Gen und für 35 % wird die Beeinträchtigung einer Promotorregion angenommen.

## 4.5 Untersuchung von Knockout-Mutanten

Auf Grund der beobachteten Mehrfachinsertion in einzelnen Mutanten, kann das Vorhandensein weitere unentdeckter Insertionsstellen nicht ausgeschlossen werden. Zur Verifizierung der identifizierten Insertionsstellen als Ursache für den Komplex I-Defekt ist daher die Untersuchung von Knockout-Mutanten notwendig. Dabei handelt es sich um Stämme von *N. crassa*, bei denen Gene gezielt durch homologe Rekombination ausgeschaltet wurden (Colot et al., 2006). Über das

<sup>f</sup> TargetP ist ein Programm zur Bestimmung der Lokalisation von eukaryotischen Proteinen aufgrund ihrer N-terminalen Sequenz. Dabei gibt RC (reliability class) die Zuverlässigkeit der Vorhersage von 1 bis 5 nach dem Schulnotenprinzip an (Emanuelsson et al. 2007).

Fungal Genetic Stock Center besteht die Möglichkeit solche Knockout-Stämme zu beziehen, da im Rahmen des Neurospora Genome Project alle Gene ausgeschaltet werden sollen. Auf Grund der Fülle liegen zum jetzigen Zeitpunkt allerdings nicht für alle Gene entsprechende Stämme vor.

Von den 14 zu untersuchenden Genen wurden für zwei bereits Knockout-Stämmen untersucht. Dabei handelt es sich um die Gene *b11e5\_150*, welches mit dem Transkriptionsaktivator Mut3p verwandt ist, und *1nc307\_050*, welches für ein konserviertes hypothetisches Protein mit Mitochondrienimportsequenz kodiert. Für beide Gene wurde keine direkte Insertion gefunden, sondern lediglich eine mögliche Beeinträchtigung der Promotorregion vermutet. Im enzymatischen Test wiesen die Knockout-Mutanten der Gene den charakteristischen Kurvenverlauf eines intakten Komplex I auf (Abbildung 52).

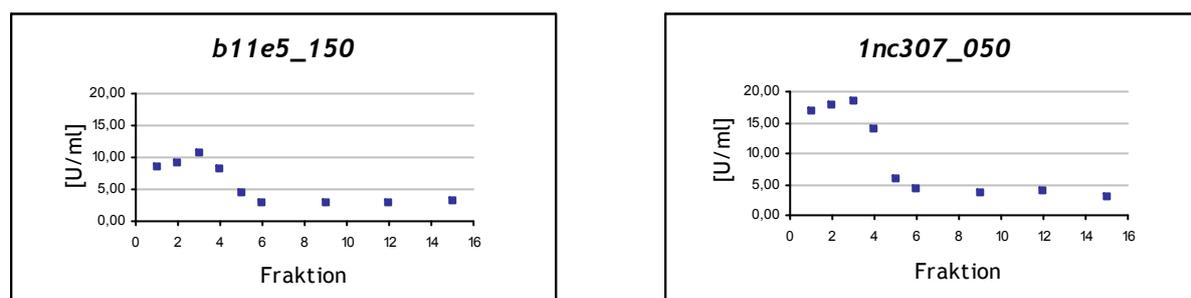


Abbildung 52: Elutionsprofile der Knockout-Mutanten.

Damit sind beide Gene nachweislich nicht für den beobachteten Komplex I-Defekt verantwortlich.

## 5 Diskussion

### 5.1 Erzeugung von Komplex I-Mutanten

In dieser Arbeit wurde die Methode der Insertionsmutagenese zur Erzeugung von Komplex I-Mutanten angewendet. Diese Methode ist im Vergleich zur weit verbreiteten UV-Mutagenese relativ aufwendig. Zum einen wird eine hohe Ausgangszahl an Konidien benötigt und zum anderen sind die einzelnen Schritte sowohl arbeits- als auch zeitintensiver. Dafür besteht auf Grund der Insertion eines Selektionsmarkers, die Möglichkeit der gezielten Anzucht von erfolgreich transformierten Mutanten. Im Vergleich zur Mutagenese mit UV-Strahlung ist somit ein erster Selektionsschritt in die Methode integriert. Die nachfolgende Bestimmung der Insertionsstellen durch verschiedene PCR-Varianten auf genomische und inserierte DNA stellt dabei den eigentlichen Vorteil dieses Verfahrens dar.

Das zu inserierende *bar*-Gen wurde im Laufe der Arbeit auf unterschiedliche Weise, Restriktion oder Amplifizierung mittels PCR, präpariert. Die Linearisierung mit dem Enzym BamHI führte vermutlich auf Grund der Länge von 4.014 Bp zur Insertion unterschiedlich verkürzter Fragmente des pKS*bar*2-Plasmids, was durch die identifizierten Insertionsstellen in Mutante T8-207/2 belegbar ist. Keine der beiden Plasmidsequenzen wies die erwartete BamHI-Schnittstelle als Übergang auf. Zur Optimierung wurde das Plasmid zusätzlich zu dem Enzym BamHI mit BssHII geschnitten. Dabei verbleibt das *bar*-Gen in einem Fragment von 1.162 Bp. Die Basta-Resistenz wird nur bei einem weitgehend intakten *bar*-Gen vermittelt, so dass durch die Kultivierung auf Basta-haltigem Medium eine Selektion auf weitgehend intakt inserierte Fragmente erfolgen sollte. Auf Grund der bereits bei Restriktion mit BamHI beobachteten Mehrfachinsertion verschiedener Plasmid-Fragmente kann die Resistenz allerdings unabhängig von dem beobachteten Komplex I-Defekt vermittelt werden. In der mit BamHI/BssHII-Fragmenten transformierten Mutante T32-21/11 wurden zwei Insertionsstellen gefunden. Arbeiten von Marco Bauer zeigten zudem komplex zusammengesetzte Plasmidfragmente, die in die genomische DNA inseriert wurden. Es wurde

postuliert, dass diese Konstrukte durch mehrfache Insertion an der gleichen Stelle im Genom entstanden sind (Bauer, 2006). Diese Sekundärinsertionen wurden durch die hier untersuchten Insertionsstellen bestätigt, wie am Beispiel der Mutante P2-204/1 gezeigt wurde. Falls diese willkürlichen Plasmid-Fragmente nicht in direkter Nähe zum *bar*-Gen inserieren, bleiben diese auf Grund der Identifizierungsmethodik unentdeckt. Wenn der beobachtete Komplex I-Defekt durch eine solche Insertion verursacht wird, würde dieser fälschlicherweise mit einem identifizierbaren, aber für Komplex I irrelevanten Gen in Verbindung gebracht. In jeder durch Restriktionsprodukt erzeugten Mutante wurden entweder Sekundärinsertionen oder eine willkürliche Fragmentierung beobachtet. Durch geeignete Primerwahl besteht die Möglichkeit auch andere inserierte Fragmente zu identifizieren, was jedoch mit einem erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand verbunden wäre. Eine Isolierung des *bar*-Fragments aus dem Restriktionsgemisch, um ausschließlich das *bar*-Gen enthaltende Fragmente für die Transformation einzusetzen, ist gleichermaßen umständlich. Die Präparation des Plasmids durch Restriktion wirkt somit dem Vorteil der Insertionsmutagenese entgegen.

Zur Vermeidung der Insertion von willkürlichen und dadurch unidentifizierbaren Fragmenten wurde das *bar*-Gen mittels geeigneter Primer amplifiziert. Bei Einsatz von 2 ng Plasmid wurde nach erfolgreicher PCR eine etwa 2.500-fache Menge an PCR-Produkt erhalten, so dass die Inserierung des Ausgangsplasmids zu vernachlässigen ist. Sekundärinsertionen wurden hier nicht beobachtet, allerdings wurden bei zwei von sieben Insertionen ein um 150 Bp verlängertes und ein um 100 Bp verkürztes PCR-Produkte gefunden. Da diese Abweichungen keinerlei Einfluss auf die Identifizierbarkeit der Insertionsstellen hatten, ist die Verwendung von PCR-Produkt, auch unter Einbezug der Ergebnisse von Marco Bauer, eine deutliche Verbesserung.

Die charakterisierten Insertionsstellen von PCR- sowie Restriktionsfragmenten deuten auf eine bevorzugte Inserierung des *bar*-Gens auf Grund von homologer Rekombination hin, da in den beobachteten Fällen jeweils kurze Sequenzübereinstimmungen von Plasmid und genomischer DNA an den Insertionsstellen vorlagen. Um eine Quantifizierung dieses Effekts zu erreichen, wurden von Niklas

Fernau willkürlich ausgesuchte Transformanden einer Vektorette-PCR unterzogen (Fernau, 2005). Dabei wurden für 75 % der Mutanten häufig auftretende Bandenmuster erhalten. An Hand dieser Erkenntnisse wurde postuliert, dass nur etwa 25 % der Insertionen willkürlich erfolgt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen unabhängig von der Präparationsmethode eine bevorzugte Insertion der DNA bei 40 % der Fälle. Da die Wahrscheinlichkeit einer Komplex I-Mutation durch bevorzugte Insertion verringert wird, musste eine Alternative zur Unterdrückung dieses Effektes gefunden werden. Der Einsatz von degenerierten Primern bei der Amplifizierung des *bar*-Gens führt zu variablen Basenabfolgen an beiden Enden, so dass eine bevorzugte Insertion durch homologe Rekombination vermutlich vermindert wird. Bislang wurden etwa 500 Mutanten auf diese Weise erzeugt und ein Mutante mit Komplex I-Defekt identifiziert, so dass zu diesem Zeitpunkt keine experimentelle Bestätigung dieser Annahme möglich ist.

Obwohl die Menge der zur Transformation eingesetzten *bar*-Gen-Fragmente bei Verwendung von Restriktionsfragmenten bzw. PCR-Produkten gleich groß war, wurden in Transformationsansätzen mit PCR-Produkten deutlich höhere und gleichmäßigere Transformationszahlen erreicht. Mit einer Überlebensrate von 97 % ist der Einsatz von degenerierten Primern zudem mit Abstand die erfolgreichste Methode zur Inserierung des *bar*-Gens mittels Elektroporation.

## 5.2 Selektion der Komplex I-Mutanten

Für die Untersuchung der hohen Anzahl der Transformanden ist ein geeignetes und zeitlich vertretbares Anreicherungsverfahren notwendig, um die Zahl der Mutanten die dem spezifischen, aber auch aufwendigen enzymatischen Test zu unterziehen sind, auf wenige potentielle Klone zu reduzieren. Dazu wurde in dieser Arbeit das Selektionsverfahren entwickelt, welches auf der Chinasäureabhängigkeit des Wachstumsverhaltens der regulierbaren Komplex III-Mutante *cuco5* basiert. Diese Mutante war in einer vorgehenden Doktorarbeit von Wasiliki Tsalastra zu diesem Zweck konstruiert worden. Wie Vortests zeigten, wird die Chinasäureabhängigkeit von *cuco5* durch einen zusätzlichen Defekt in Komplex I deutlich verstärkt. Die

Möglichkeit Komplex I/III-Doppelmutanten anhand ihrer Chinasäureabhängigkeit zu selektieren wurde durch eine Testreihe mit einem 1:1-Gemisch der beiden Stämme *cuco5* und *nuo20.9/cuco5* gezeigt. Nach Durchführung der einzelnen Selektionsschritte ergab sich eine klare Trennung beider Stämme.

Das Selektionsverfahren setzt sich aus drei Stufen zusammen: der Präselektion, der Selektion und der Postselektion. Dieses Selektionsverfahren hat sich, wie gezeigt wurde, als eine geeignete Methode zur Reduzierung der Transformanden auf wenige potentielle Komplex I-Klone bewährt. Da es sich bei dieser Methode um eine subjektive Bewertung des chinasäureabhängigen Wachstumsverhaltens handelt, ist die Selektion jedoch stark vom jeweiligen Experimentator abhängig. So besteht die Möglichkeit, dass Komplex I-Mutanten fälschlicherweise nicht erkannt und daher aussortiert wurden. Es bietet sich an, uneindeutige Mutanten in den ersten Selektionsschritten bestehen zu lassen, um erst in der abschließenden Postselektion nur noch eindeutige Kolonien auszuwählen. Die Reduzierung der Transformanden durch die Präselektion auf durchschnittlich 18 % ist so effektiv, dass die weniger strikte Auslese in den ersten Schritten vertretbar ist.

Zur zeitlichen und qualitativen Optimierung wurde die ursprüngliche Postselektion durch einen erneuten direkten Vergleich des Wachstumsverhaltens ersetzt. Die Effizienz des Selektionsverfahrens wurde sowohl von den zur Transformation eingesetzten Zellen, als auch von der verwendeten DNA maßgeblich beeinflusst.

### 5.2.1 Transformation der Makrokonidien *cuco5*

Durch Insertionsmutagenese in Makrokonidien wurden 11.015 Klone erhalten. Dabei wurde ausschließlich das *bar*-Gen aus der Restriktion mit BamHI bzw. BamHI und BssHII eingesetzt. Trotz der Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme wies die Bilanz bis einschließlich Postselektion nur geringe Unterschiede auf. Durch die Präselektion wurde die Anzahl der Transformanden auf 12,5 % verringert. Durch die folgende Selektion wurden diese auf 4,4 % und durch die Postselektion auf 1,1 % der anfänglichen Transformandenzahl reduziert. Nach der Durchführung des enzymatischen Tests wurden nur vier der selektierten 126 Klone als Komplex I-Mutanten eingestuft, wobei nur eine aus der Transformation mit BamHI-

Restriktionsprodukt resultierte. Obwohl die geringen Fallzahlen eine statistische Auswertung einschränkt, scheint die Verwendung von BamHI und BssHII zur Restriktion mehr Komplex I-Mutanten zu ergeben.

In einem Test zur Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde eine NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität bei Mutanten beobachtet, die im ersten Durchgang des enzymatischen Tests inaktiv waren. Als Ursache für diese wechselhaften Ergebnisse wurde ein Kompensationseffekt auf Grund der Multinuklearität der Makrokonidien postuliert. Zur Überprüfung dieser Annahme sowie der Optimierung des Verfahrens wurden aus diesen Klonen homokaryonte Mikrokonidien erzeugt. Die Komplex I-Aktivitäten der erhaltenen Klone wurden am Beispiel der Mutante T8-207 untersucht. Von vier isolierten homokaryonten Klonen wies die Hälfte eine ausgeprägte Chinasäureabhängigkeit auf. Die Komplex I-Aktivität korrelierte eindeutig mit dem Wachstumsverhalten. Klone mit ausgeprägter Chinasäureabhängigkeit wiesen keine Komplex I-Aktivität auf und vice versa. Damit ist der postulierte Kompensationseffekt durch dominante, intakte Allele in den anderen Kernen bestätigt. Dieser Effekt beeinträchtigt ein wachstumsbasierendes Selektionsverfahren erheblich. Um die Einsetzbarkeit des in dieser entwickelten Verfahrens zu gewährleisten, ist daher die Transformation in Mikrokonidien unumgänglich.

### 5.2.2 Erzeugung des Mikrokonidienstamms *cuco5/7089*

Die Erzeugung von Mikrokonidien durch spezielle Anzuchtbedingungen ist zwar generell für alle Stämme möglich, allerdings ist die Ausbeute der erhaltenen Konidien stark schwankend und die Auskeimungsrate deutlich reduziert. Die für eine erfolgreiche Transformation benötigte Zahl an Konidien kann auf diese Weise nicht mit vertretbarem Aufwand erzeugt werden. Die Bildung einer großen Zahl von Mikrokonidien in Flüssigmedien macht den Einsatz von speziellen Stämmen notwendig, die bevorzugt Mikrokonidien erzeugen. Der *N. crassa*-Stamm 7089 erzeugt in Flüssigkulturen auf Grund einer Mutation im *mcm*-Gen mit einem geringen Zeitaufwand eine deutlich höhere sowie konstante Konzentration an Mikrokonidien (Maheshwari, 1991). Für die Anwendbarkeit des Selektionsverfahrens ist allerdings die Anwesenheit des regulierbaren Komplex III-Defektes von *cuco5*

notwendig. Zur Kombination beider Genotypen wurde eine Kreuzung der Stämme *cuco5* und *nuo20.9/7089* durchgeführt. Letzterer wurde verwendet, da er den notwendigen zu *cuco5* komplementären Paarungstyp aufwies. Die Kreuzungsmutanten wurden mittels der Benomyl-Resistenz des *cuco5*-Stammes sowie der Hygromycin-Resistenz des *nuo20.9*-Stammes selektiert. Der erhaltene Stamm *cuco5/7089* ermöglicht die effektive Erzeugung von Mikrokonidien mit einem Makrokonidienanteil von weniger als 10 % nach Filtration. Diese Verunreinigung durch heterokaryonte Konidien ist auf Grund der leichten Handhabbarkeit der Anzucht in Flüssigmedium sowie der drastischen Reduzierung der zu untersuchenden Klone nach der Präselektion vertretbar.

### 5.2.3 Transformation der Mikrokonidien *cuco5/7089*

Nach Transformation des Mikrokonidienstammes *cuco5/7089* wurden 9.145 Klone isoliert und untersucht. Diese wurden durch das Selektionsverfahren um 97,5 % reduziert. Die Bilanz der einzelnen Schritte zeigt, dass bei der Selektion eine höhere Ausbeute an potentiellen Komplex I-Mutanten erzielt wurde. Es zeigte sich, dass auch bei Transformation in Mikrokonidien keine Garantie auf homokaryonte Klone gegeben ist. Als Hauptursache für die unerwartete Multinuklearität wurde die manuelle Isolierung der erzeugten Transformanden vom Plattenmedium auf die Kultivierungsröhrchen vermutet. Wahrscheinlich wurde auf Grund des überlagerten Wachstums der einzelnen Klone eine Mischung von unterschiedlichen homokaryonten Kolonien isoliert. Die Selektionsbilanz deutet auf die Durchsetzungsfähigkeit des Komplex I-Phänotyps bei den isolierten Mischungen über den für das Selektionsverfahren notwendigen Zeitraum hin. Der Kompensationseffekt kommt offensichtlich im Vergleich zu Makrokonidien erst später zum Tragen. Für die Erhaltung von zuverlässigen und eindeutigen Ergebnissen ist die nachfolgende Erzeugung von homokaryonten Kernen dennoch unumgänglich. Alle im Selektionsverfahren auffälligen Mikrokonidien wurden nach Isolierung und Vereinzelung zweimal auf ihre Chinasäureabhängigkeit hin überprüft. Es wurden nur diejenigen Klone weiter verwendet, welche das entsprechende Wachstumsverhalten aufwiesen.

In Tabelle 31 ist eine Zusammenfassung der Transformationen in Mikro- und Makrokonidien wiedergegeben, welche die bessere Eignung von Mikrokonidien belegt.

**Tabelle 31: Zusammenfassung der Transformationen in Makro- und Mikrokonidien**

Selektionsschritte	Makrokonidien	%	Mikrokonidien	%	Gesamt	%
isolierte Transformanden	16436	149,2	11248	123,0	27684	137,3
gewachsene Transformanden	11015	100,0	9145	100,0	20160	100,0
Präselektion bestanden	1390	12,6	2279	24,9	3669	18,2
Selektion bestanden	489	4,4	860	9,4	1349	6,7
Postselektion bestanden	126	1,1	225	2,5	351	1,7
Enzymatischen Test bestanden	4	0,04	8	0,09	12	0,06

### 5.3 Charakterisierung der Komplex I-Mutanten

Zur Charakterisierung der zwölf erhaltenen Klone, wurden diese einem enzymatischen Test im großen Maßstab unterzogen. Dabei wurde die achtfache Proteinmenge eingesetzt. Die Ergebnisse wurden für acht Klone eindeutig reproduziert. Vier Klone wiesen eine im Vergleich zum Ausgangsstamm verringerte aber dennoch erkennbare Komplex I-Aktivität auf. Dabei handelte es sich jeweils um zwei aus Makro- und Mikrokonidien erhaltene Stämme. Alle zwölf Kolonien wurden zur weiteren Charakterisierung untersucht.

#### 5.3.1 Charakterisierung der Assemblierungsintermediate

Die Western-Blot-Analyse stellt eine geeignete Methode zur Bestätigung und besseren Charakterisierung von potentiellen Komplex I-Mutanten dar. Durch das charakteristische Sedimentationsverhalten von Komplex I werden durch Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen Untereinheiten des Membranarms sowie des peripheren Arms mögliche Assemblierungsintermediate identifiziert. Die acht Mutanten, welche bereits im großen Maßstab des enzymatischen Tests inaktiv waren, wiesen ein zum Wildtyp deutlich verändertes Bandenmuster auf. Neben der Bestätigung des Komplex I-Defektes erlauben die Bandenmuster bereits Vermutungen über die Art des Defektes. Für drei Mutanten waren auf Grund der Bandenmuster keine Aussagen zu Assemblierungsintermediaten möglich. Zwei

weitere Mutanten wiesen einen Defekt im peripheren Arm auf, der zu einer reduzierten Assemblierung des intakten Komplex I führt. Von den restlichen drei Mutanten können zwei den kompletten peripheren und eine den kompletten membranständigen Arm bilden. Die vier Mutanten, welche eine geringe Komplex I-Aktivität im großen Maßstab aufwiesen, zeigten kein auffälliges Bandenmuster in der Western-Blot-Analyse. Für diese ist eine Verringerung der Komplex I-Assemblierung anzunehmen.

### 5.3.2 Überprüfung der Komplex I-Spezifität

Die Bestimmung des Gehalts der Cytochrome a, b und c zeigte, dass durch die Insertionsmutagenese der untersuchten zwölf Mutanten ausschließlich Komplex I betroffen wurde. Der Vergleich der absoluten Cytochromgehalte mit den Ausgangsstämmen *cuco5* und *cuco5/7089* ergab für die meisten Mutanten eine weitgehende Übereinstimmung. Auf Grund von einigen Abweichungen wurde neben der quantitativen Cytochrombestimmung der für intakte Atmungskettenkomplexe III und IV charakteristische Absorptionsverlauf zur Charakterisierung hinzugezogen. Durch diesen qualitativen Vergleich ist eine weitgehend unbeeinträchtigte Bildung dieser beiden Komplexe anzunehmen. Dieses Ergebnis ist für das angewendete Selektionsverfahren nicht überraschend, da sich eine Kombination von Defekten in Komplex I und Komplex III oder IV letal auf den Pilz auswirken würde.

## 5.4 Identifizierung der betroffenen Gene

Zur Identifizierung der Insertionsstellen wurden die Methoden der Vektorette- sowie der Splinkerette-PCR angewendet. Mittels der Vektorette-PCR wurden sechs und mit Hilfe der Splinkerette-PCR elf Insertionsstellen erfolgreich bestimmt. Durch die Amplifizierung mittels der letzteren Methode wurden allerdings eindeutiger Produkte erhalten. Zudem besteht auf Grund der anderen Restriktionsmöglichkeiten im Plasmid eine höhere Primerauswahl. Da die Splinkerette-PCR auch für größere DNA-Fragmente geeignet ist, stellt sie die Methode der Wahl dar. Für den Fall einer erfolglosen Anwendung der Splinkerette-PCR steht die Vektorette-PCR als sinnvolle Alternative zur Verfügung. Die zur weiteren Charakterisierung eingesetzte

Methode der direkten PCR ist bei erfolgreicher Anwendung einer der beiden oben beschriebenen Methoden zur Verifizierung der erfolgten Insertion geeignet.

Es wurden insgesamt elf unterschiedliche Gene für 15 Insertionsstellen gefunden. Neben der Insertion in bekannte Gene, welche Untereinheiten von Komplex I kodieren, wurde die bevorzugte Insertion in zwei sowie die einfache Insertion in sechs weiteren Genen nachgewiesen.

Die drei bekannten Gene kodieren die Komplex I-Untereinheiten 78, 21.3b und 20.9 kDa. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den entsprechenden Western-Blot-Analysen der Mutanten ist weitgehend übereinstimmend. So erkennt man für Mutante Y28-136/3 die für einen Defekt in der 78 kDa-Untereinheit erwartete schwächere Assemblierung des peripheren sowie eine Anhäufung des membranständigen Arms. Für die 20.9-Deletionsmutante T8-207/2 ist das Fehlen der großen Membranarmvorstufe bei gleichzeitiger Anreicherung des peripheren Arms sowie der kleinen Membranarmvorstufe feststellbar. Abweichend stellt sich lediglich der Western-Blot von Mutante Y23-57/11 dar. Bei dieser 21.3b-Deletionsmutante wurde ein vollständig assemblierter Komplex I ohne die betroffene Untereinheit erwartet, während lediglich eine Teilassemblierung beobachtet werden kann. Mögliche Ursache dafür können die zwei weiteren Insertionsstellen in der Mutante sein.

Durch die Identifizierung dieser drei Komplex I-Insertionsstellen ist der Erfolg des in dieser Arbeit entwickelten Verfahrens, ausgehend von der Erzeugung durch ungezielte Insertionsmutagenese über das Selektionsverfahren zur Reduzierung auf wenige potentielle Komplex I-Mutanten und deren Identifizierung und Charakterisierung, eindeutig bewiesen. Das Verfahren ist nachweislich sowohl für Defekte im peripheren- als auch im membranständigen Arm tauglich.

Zwei Gene wurden, in Abhängigkeit der zur Transformation eingesetzten DNA, als bevorzugte Insertionsstellen identifiziert. Von den sechs Komplex I-Mutanten, die durch Transformation mit dem Restriktionsprodukt von BamHI und BssHII erzeugt wurden, wiesen drei eine bevorzugte Insertion in das Gen b8g12\_390 auf. Dabei liegt für alle Mutanten die Insertionsstelle am Basenpaar 118.165, während die

Größe des inserierten Plasmids sowie die Anzahl der deletierten Basenpaare trotz gleicher Behandlung stark variiert. In einem Fall ist eine verlustfreie Insertion erfolgt während in den anderen beiden Fällen einmal nur 3 und einmal 107 Bp deletiert wurden.

Drei der fünf durch PCR-Produkt mit den Primern pUC5 und Bar3 transformierten Mutanten wiesen die Insertion in das Gen b10c3\_130 auf. Dabei wurde durch direkte PCR gezeigt, dass in allen Mutanten mit großer Wahrscheinlichkeit das gesamte Gen deletiert wurde. Insgesamt fehlen bei allen drei Mutanten etwa 1.700 Bp der genomischen DNA.

Von den sechs einfach auftretenden Insertionsstellen wurden drei Insertionsstellen in beide Richtungen eindeutig charakterisiert. Dabei wurde die oben bereits erwähnte, variable Deletion beobachtet. Während eine der Insertionen nahezu verlustfrei erfolgte, wurden einmal 134 und bei einer weiteren Insertion etwa 2.500 Bp deletiert. Ob die Deletion willkürlich oder systematisch erfolgt, kann an Hand der wenigen bisher charakterisierten Insertionsstellen nicht geklärt werden. Es ist allerdings auffällig, dass für die Insertionen des PCR-Produktes eine identische Deletion erfolgte. Dies ist möglicherweise auf die einheitlichere Erzeugung der Plasmid-Fragmente durch PCR zurückzuführen, da bei der Restriktion willkürliche Fragmentierung sowie das Auftreten von Sekundärinsertionen beobachtet wurden.

Es wurde gezeigt, dass acht Gene direkt und nur in drei Fällen intergenische Bereiche betroffen wurden. Für sechs Insertionen ist die Beeinträchtigung der Promotorregion des benachbarten Gens nicht auszuschliessen. Somit sind, nach Abzug der bereits bekannten drei Gene für die Komplex I-Untereinheiten, insgesamt 14 mögliche Kandidaten für die Kodierung eines an der Assemblierung beteiligten Hilfsproteins identifiziert worden. Da wie bereits beschrieben der direkte Zusammenhang zwischen identifiziertem Gen und Komplex I-Defekt auf Grund einer möglichen Mehrfachinsertion fraglich ist, müssen zur endgültigen Bestätigung Knockout-Stämme dieser Gene durch gezielte Inaktivierung erzeugt werden. Da dieses Verfahren mit einem enormen zeitlichen Aufwand verbunden ist,

wird auf das Fungal Genetic Stock Centre zurückgegriffen. Im Rahmen des *Neurospora Crassa* Genome Project sollen von alle 10.000 Genen Knockout-Mutanten erzeugt werden. Da von den 14 identifizierten Kandidaten bislang nur zwei zur Verfügung stehen, konnten lediglich diese untersucht werden. Die Knockout-Stämme der Gene b11e5\_150 und 1nc307\_050 zeigten die für einen intakten Komplex I charakteristische NADH/Ferricyanid-Redoxaktivität. Der in dieser Arbeit beobachtete Defekt wurde somit nicht durch diese Gene verursacht. In den erzeugten Klonen T8-207/2 und T32-21/11 sind neben den jeweiligen Nachbargenen zudem weitere Insertionsstellen gefunden worden, so dass der beobachtete Defekt auf eines dieser Gene zurückzuführen ist. Im Fall der Mutante T8-207/2 wurde das für die 20.9 kDa-Untereinheit kodierende Gen 1nc307\_040 deletiert, so dass durch dieses Gen ein Komplex I-Defekt verursacht wird. Ungeachtet dessen können die Gene b11h7\_090 und b11h7\_100 ebenfalls einen Komplex I-Defekt verursachen. Aus diesem Grund ist die Bestätigung durch Knockout-Stämme die einzige Möglichkeit eine eindeutige Aussage zu treffen. In Mutante T32-21/11 muss, unter der Annahme keiner weiteren bislang unentdeckten Insertionsstellen, der Defekt durch das Nachbargen b11e5\_140 oder das Gen b8g12\_390 hervorgerufen werden. Da es sich bei Letzterem um eine bevorzugte Insertionsstelle handelt, die in zwei weiteren Mutanten aufgetreten ist, besteht eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Involvierung in die Komplex I-Assemblierung. Laut Information durch das Fungal Genetic Stock Center konnte für das als bevorzugte Insertionsstelle identifizierte Gen b8g12\_390 bisher keine lebensfähige homokaryonte Knockout-Mutante erzeugt werden. Vermutlich sind die Mutationen bei den in dieser Arbeit erzeugten Mutanten nicht letal, da nur jeweils die letzten 74 Bp dieses Gens betroffen sind.

## 5.5 Statistische Betrachtung

Unter der Annahme, dass der Hyphenpilz *N. crassa* mindestens zehn spezifische Hilfsproteine für den Komplex I besitzt, besagt die in 2.8.2 aufgestellte Statistik, dass jeder 400. Klon nach einer ungezielten Mutagenese eine Komplex I-Mutation enthalten sollte. Verschiedene Faktoren haben Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit.

So zeigen vier der bekannten Untereinheiten mit Komplex I-Defekt kaum einen Unterschied hinsichtlich des Aktivitätstest zum Wildtyp und würden somit nicht als Komplex I-Mutante erkannt werden. Damit würde sich die Wahrscheinlichkeit einer Komplex I-Mutante auf jeden 450. untersuchten Klon reduzieren, da von 35 statt 39 relevanten Untereinheiten ausgegangen werden muss. Unter der Annahme, dass nur 25 - 60 % der Insertionen willkürlich erfolgt, kann mindestens bei jeder 1.800ten Mutante von einem Komplex I-Klon ausgegangen werden. Wie in der Arbeit bereits dargelegt, ist auf Grund der enormen Komplexität der Assemblierungsprozesse sowie der für die Atmungskette einzigartigen Größe von Komplex I auch eine deutlich höhere Zahl an Hilfsproteinen vorstellbar. In dieser Arbeit lässt sich der Komplex I-Defekt nur für drei Mutanten eindeutig auf bekannte Untereinheiten zurückführen, was einer Wahrscheinlichkeit von 25 % entspricht. Unter der Annahme von nur zehn Hilfsproteinen war eine Wahrscheinlichkeit von 75 % zu erwarten. Bei Untersuchungen von Komplex I-Defekten in Menschen wurde für 50 % der Fälle eine Störung von Hilfsproteinen postuliert (Dunning et al., 2007), so dass die Existenz von mehr als zehn Hilfsproteinen nahe liegend ist. Für den Fall von 30 Hilfsproteinen würde jede 300te - 1.200te Mutante einen Komplex I-Defekt aufweisen. Durch den Einsatz von degenerierten Primern für die Erzeugung des Insertionsproduktes soll der Effekt einer bevorzugten Insertion vermindert werden. Da bislang nur eine Insertionsstelle für degenerierte Primer gefunden wurde, kann dazu noch keine Aussage getroffen werden. Allerdings zeigt das Verhältnis von einer Mutante auf 522 Transformanden das die Plasmidpräparation mittels degenerierter Primer mindestens so gute Ergebnisse liefert wie die PCR mit den nicht-degenerierten Primern.

Die beiden berechneten Werte von 300 bzw. 1.800 stellen also Extremwerte der statistischen Betrachtung dar. In dieser Arbeit wurden insgesamt 20.160 Transformanden untersucht und davon zwölf auffällige Mutanten identifiziert. In dieser Zusammenfassung sind die eingeführten Verbesserungen nicht gewichtet, so dass die gefundene Mutantenzahl eine Untergrenze darstellt. Unter Berücksichtigung der bevorzugten Insertion wurden nach der oben genannten Statistik 11 - 18 Mutanten erwartet, so dass das Verfahren dem theoretischen Erfolg entspricht.

## 5.6 Ausblick

Die Isolierung des *bar*-Gens durch PCR mittels degenerierter Primer und die nachgelagerte Transformation in Mikrokonidien stellt die beste Methode zur Erzeugung von Komplex I-Mutanten dar. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Verwendung des *bar*-Gens aus alternativen Präparationsmethoden keine statistische Insertion vorliegt, sondern bevorzugte Stellen betroffen sind. Die Ergebnisse durch den Einsatz von degenerierten Primern geben einen positiven Ausblick auf die Identifizierung weiterer bislang unbekannter Hilfsproteine. Um mehr Klarheit über die Häufigkeit der Insertionen zu bekommen, bietet es sich an mittels einer *bar*-spezifischen Sonde eine Southern-Blot-Analyse durchzuführen.

Alternativ zur ungezielten Mutagenese wird bereits das Verfahren der bioinformatischen Analyse zur Identifizierung von Hilfsproteinen genutzt. Dieses Verfahren beruht auf dem Genomvergleich von verschiedenen Organismen mit und ohne Komplex I (Ogilvie et al., 2005). Durch die notwendige Einschränkung der Suche mittels Auswahlkriterien werden bestimmte Proteinfamilien ausgeschlossen. Somit würden Proteine welche z.B. wie ACP (9.6 kDa Untereinheit von Komplex I) eine Doppelfunktion ausüben durch das Suchraster fallen. Durch diese Methode wird dennoch eine gute Vorauswahl von Komplex I-spezifischen Proteine getroffen, ohne allerdings alle potentiellen Hilfsproteine zu erfassen. Nach der Identifizierung eines potentiellen Hilfsproteins müsste ebenfalls durch gezielte Mutagenese die Involvierung an der Assemblierung untersucht werden.

Mit Ausnahme der bekannten Untereinheiten wären die in dieser Arbeit gefundenen Gene durch diese Methode nicht entdeckt worden, da sie zu Proteinfamilien zugeordnet werden, welche auch in Hefen ohne Komplex I vorkommen. Außnahmen bilden hierbei nur die Gene b11e5\_140 und b8g12\_390, welche nicht eindeutig einer Proteinfamilie zugeordnet werden können. Eine Kombination gezielter und ungezielter Mutagenese stellt die optimale Grundlage zur effizienten Suche nach neuen Hilfsproteinen und damit zur Aufklärung der Assemblierung des größten und kompliziertesten Atmungskettenenzym dar.

Die verbleibenden elf Knockout-Mutanten müssen nach Verfügbarkeit bestellt und untersucht werden. Gene, die durch die Untersuchung der Knockout-Mutanten nachweislich für einen Komplex I-Defekt verantwortlich sind, müssen anschließend weiter charakterisiert werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Abdrakhmanova, A., V. Zickermann, et al. (2004). "Subunit composition of mitochondrial complex I from the yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim Biophys Acta* **1658**(1-2): 148-56.
- [2] Abrahams, J. P., A. G. Leslie, et al. (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria." *Nature* **370**(6491): 621-8.
- [3] Acin-Perez, R., M. P. Bayona-Bafaluy, et al. (2004). "Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria." *Mol Cell* **13**(6): 805-15.
- [4] Akins, R. A. and A. M. Lambowitz (1985). "General method for cloning *Neurospora crassa* nuclear genes by complementation of mutants." *Mol Cell Biol* **5**(9): 2272-8.
- [5] Al-Samarrai, T. H. and J. Schmid (2000). "A simple method for extraction of fungal genomic DNA." *Lett Appl Microbiol* **30**(1): 53-6.
- [6] Almeida, T., M. Duarte, et al. (1999). "The 24-kDa iron-sulphur subunit of complex I is required for enzyme activity." *Eur J Biochem* **265**(1): 86-93.
- [7] Alves, P. C. and A. Videira (1994). "Disruption of the gene coding for the 21.3-kDa subunit of the peripheral arm of complex I from *Neurospora crassa*." *J Biol Chem* **269**(10): 7777-84.
- [8] Antonicka, H., I. Ogilvie, et al. (2003). "Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency." *J Biol Chem* **278**(44): 43081-8.
- [9] Arnold, I., K. Pfeiffer, et al. (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *Embo J* **17**(24): 7170-8.
- [10] Avalos, J., R. F. Geever, et al. (1989). "Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*." *Curr Genet* **16**(5-6): 369-72.
- [11] Balaban, R. S., S. Nemoto, et al. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging." *Cell* **120**(4): 483-95.
- [12] Barrientos, A., A. Zambrano, et al. (2004). "Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* **23**(17): 3472-82.
- [13] Barros, M. H., C. G. Carlson, et al. (2001). "Involvement of mitochondrial ferredoxin and Cox15p in hydroxylation of heme O." *FEBS Lett* **492**(1-2): 133-8.

- [14] Bauer, M. (2006). "Störung der Biogenese des Atmungskettenkomplex I in *Neurospora crassa* durch ungerichtete Mutagenese." *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*.
- [15] Beadle, G. W. and E. L. Tatum (1941). "Gentic control of biochemical reactions in *Neurospora*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **27**: 499-506.
- [16] Beisenherz, G., H. J. Boltze, et al. (1953). "Diphosphofruuctose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang." *Z Naturforsch* **8b**: 555-577.
- [17] Berry, E. A. and B. L. Trumpower (1985). "Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes." *J Biol Chem* **260**(4): 2458-67.
- [18] Böttcher, B., D. Scheide, et al. (2002). "A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Biol Chem* **277**(20): 17970-7.
- [19] Boyer, P. D. (2001). "Toward an adequate scheme for the ATP synthase catalysis." *Biochemistry (Mosc)* **66**(10): 1058-66.
- [20] Brandt, U. (2006). "Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I)." *Annu Rev Biochem* **75**: 69-92.
- [21] Budde, S. M., L. P. van den Heuvel, et al. (2000). "Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene." *Biochem Biophys Res Commun* **275**(1): 63-8.
- [22] Cardol, P., F. Vanrobaeys, et al. (2004). "Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes." *Biochim Biophys Acta* **1658**(3): 212-24.
- [23] Carneiro, P., M. Duarte, et al. (2004). "The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1608**(1): 45-52.
- [24] Carneiro, P., M. Duarte, et al. (2007). "The external alternative NAD(P)H dehydrogenase NDE3 is localized both in the mitochondria and in the cytoplasm of *Neurospora crassa*." *J Mol Biol* **368**(4): 1114-21.
- [25] Carr, H. S., A. B. Maxfield, et al. (2005). "Functional analysis of the domains in Cox11." *J Biol Chem* **280**(24): 22664-9.
- [26] Carroll, J., I. M. Fearnley, et al. (2003). "Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria." *Mol Cell Proteomics* **2**(2): 117-26.

- [27] Chacinska, A. and M. Boguta (2000). "Coupling of mitochondrial translation with the formation of respiratory complexes in yeast mitochondria." *Acta Biochim Pol* **47**(4): 973-91.
- [28] Chakraborty, B. N. and M. Kapoor (1990). "Transformation of filamentous fungi by electroporation." *Nucleic Acids Res* **18**(22): 6737.
- [29] Chazotte, B. and C. R. Hackenbrock (1988). "The multicollisional, obstructed, long-range diffusional nature of mitochondrial electron transport." *J Biol Chem* **263**(28): 14359-67.
- [30] Chen, R., I. M. Fearnley, et al. (2004). "The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria." *J Biol Chem* **279**(25): 26036-45.
- [31] Church, C., B. Goehring, et al. (2005). "A role for Pet100p in the assembly of yeast cytochrome c oxidase: interaction with a subassembly that accumulates in a pet100 mutant." *J Biol Chem* **280**(3): 1854-63.
- [32] Colot, H. V., G. Park, et al. (2006). "A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10352-7.
- [33] Cruciat, C. M., S. Brunner, et al. (2000). "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria." *J Biol Chem* **275**(24): 18093-8.
- [34] Davis, R. H. (2000). Neurospora: Contributions of a model organism. Oxford, Oxford University Press.
- [35] Davis, R. H. and F. J. de Serres (1970). "Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*." *Methods Enzymol* **17A**: 79-143.
- [36] Davis, R. H. and D. D. Perkins (2002). "Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes." *Nat Rev Genet* **3**(5): 397-403.
- [37] de Vries, S. and L. A. Grivell (1988). "Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* **176**(2): 377-84.
- [38] DeCorby, A., D. Gaskova, et al. (2007). "Expression of Ndi1p, an alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase, increases mitochondrial membrane potential in a *C. elegans* model of mitochondrial disease." *Biochim Biophys Acta* **1767**(9): 1157-63.
- [39] Devon, R. S., D. J. Porteous, et al. (1995). "Splinkerettes--improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking." *Nucleic Acids Res* **23**(9): 1644-5.

- [40] Diaz, F., H. Fukui, et al. (2006). "Cytochrome c oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts." *Mol Cell Biol* **26**(13): 4872-81.
- [41] Dickinson, E. K., D. L. Adams, et al. (2000). "A human SCO2 mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway." *J Biol Chem* **275**(35): 26780-5.
- [42] Djafarzadeh, R., S. Kerscher, et al. (2000). "Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*." *Biochim Biophys Acta* **1459**(1): 230-8.
- [43] Douce, R. and M. Neuburger (1989). "The uniqueness of plant mitochondria." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 371-414.
- [44] Duarte, M., M. Peters, et al. (2003). "The internal alternative NADH dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria." *Biochem J* **371**(Pt 3): 1005-11.
- [45] Dudkina, N. V., H. Eubel, et al. (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(9): 3225-9.
- [46] Dunning, C. J., M. McKenzie, et al. (2007). "Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease." *Embo J* **26**(13): 3227-37.
- [47] Ebbole, D. J. and M. S. Sachs (1990). "A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryonts using microconidia." *Fungal Genet Newsl.* **37**: 17-18.
- [48] Emanuelsson, O., S. Brunak, et al. (2007). "Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools." *Nat Protoc* **2**(4): 953-71.
- [49] Escobar, M. A., K. A. Franklin, et al. (2004). "Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type II NAD(P)H dehydrogenase genes." *Plant Physiol* **136**(1): 2710-21.
- [50] Eubel, H., J. Heinemeyer, et al. (2004). "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." *Plant Physiol* **134**(4): 1450-9.
- [51] Fearnley, I. M. and J. E. Walker (1992). "Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins." *Biochim Biophys Acta* **1140**(2): 105-34.

- [52] Fecke, W., V. D. Sled, et al. (1994). "Disruption of the gene encoding the NADH-binding subunit of NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulphur cluster N-3." *Eur J Biochem* **220**(2): 551-8.
- [53] Fernau, N. S. (2005). "Ungerichtete Mutagenese des Atmungskettenkomplex I in *Neurospora crassa* durch Transformation." *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*.
- [54] Fernie, A. R., F. Carrari, et al. (2004). "Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport." *Curr Opin Plant Biol* **7**(3): 254-61.
- [55] Ferreira, F., M. Duarte, et al. (1999). "Effects of disrupting the 21 kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*." *Biochem J* **342 Pt 3**: 551-4.
- [56] Fincham, J. R. S., P. R. Day, et al. (1979). Fungal Genetics (Botanical Monographs). Oxford, Blackwell.
- [57] Finnegan, P. M., J. Whelan, et al. (1997). "Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase." *Plant Physiol* **114**(2): 455-66.
- [58] Fontanesi, F., I. C. Soto, et al. (2006). "Assembly of mitochondrial cytochrome c-oxidase, a complicated and highly regulated cellular process." *Am J Physiol Cell Physiol* **291**(6): C1129-47.
- [59] Forsha, D., C. Church, et al. (2001). "Structure and function of Pet100p, a molecular chaperone required for the assembly of cytochrome c oxidase in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochem Soc Trans* **29**(Pt 4): 436-41.
- [60] Friedrich, T. (2001). "Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump?" *J Bioenerg Biomembr* **33**(3): 169-77.
- [61] Friedrich, T., B. Brors, et al. (2000). "Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3): 305-9.
- [62] Friedrich, T., G. Hofhaus, et al. (1989). "A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*." *Eur J Biochem* **180**(1): 173-80.
- [63] Friedrich, T., T. Ohnishi, et al. (1994). "Two binding sites for naturally occurring inhibitors in mitochondrial and bacterial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Biochem Soc Trans* **22**(1): 226-30.
- [64] Friedrich, T., M. Strohdeicher, et al. (1990). "The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase." *FEBS Lett* **265**(1-2): 37-40.

- [65] Friedrich, T. and H. Weiss (1997). "Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules." *J Theor Biol* **187**(4): 529-40.
- [66] Gabaldon, T., D. Rainey, et al. (2005). "Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I)." *J Mol Biol* **348**(4): 857-70.
- [67] Galagan, J. E., S. E. Calvo, et al. (2003). "The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*." *Nature* **422**(6934): 859-68.
- [68] Genova, M. L., C. Bianchi, et al. (2003). "Structural organization of the mitochondrial respiratory chain." *Ital J Biochem* **52**(1): 58-61.
- [69] Giles, N. H., R. F. Geever, et al. (1991). "The Wilhelmine E. Key 1989 invitational lecture. Organization and regulation of the qa (quinic acid) genes in *Neurospora crassa* and other fungi." *J Hered* **82**(1): 1-7.
- [70] Glerum, D. M., A. Shtanko, et al. (1996). "Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase." *J Biol Chem* **271**(24): 14504-9.
- [71] Golestani, Y. (2004). "Selektion von Mutanten des Hyphenpilzes *Neurospora crassa* mit Defekten im Atmungskettenkomplex I." *Diplomarbeit, Universität Düsseldorf*.
- [72] Grivell, L. A., M. Artal-Sanz, et al. (1999). "Mitochondrial assembly in yeast." *FEBS Lett* **452**(1-2): 57-60.
- [73] Guenebaut, V., A. Schlitt, et al. (1998). "Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Mol Biol* **276**(1): 105-12.
- [74] Guenebaut, V., R. Vincentelli, et al. (1997). "Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction." *J Mol Biol* **265**(4): 409-18.
- [75] Gutman, M., T. P. Singer, et al. (1972). "Relation of the respiratory chain-linked reduced nicotinamide--adenine dinucleotide dehydrogenase to energy-coupling site 1." *Biochemistry* **11**(4): 556-62.
- [76] Hackenbrock, C. R., B. Chazotte, et al. (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." *J Bioenerg Biomembr* **18**(5): 331-68.
- [77] Hagiwara, K. and C. C. Harris (1996). "'Long distance sequencer' method; a novel strategy for large DNA sequencing projects." *Nucleic Acids Res* **24**(12): 2460-1.

- [78] Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- [79] Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." *Annu Rev Biochem* **54**: 1015-69.
- [80] Hinchliffe, P., J. Carroll, et al. (2006). "Identification of a novel subunit of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*." *Biochemistry* **45**(14): 4413-20.
- [81] Hinchliffe, P. and L. A. Sazanov (2005). "Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I." *Science* **309**(5735): 771-4.
- [82] Hirst, J., J. Carroll, et al. (2003). "The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1604**(3): 135-50.
- [83] Hofhaus, G., H. Weiss, et al. (1991). "Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I)." *J Mol Biol* **221**(3): 1027-43.
- [84] Huebschmann, C. (1952). "A method of varying the average number of nuclei in the conidia of *Neurospora crassa*." *Mycologia*. **44**: 599-604.
- [85] Hui, E. K., P. C. Wang, et al. (1998). "Strategies for cloning unknown cellular flanking DNA sequences from foreign integrants." *Cell Mol Life Sci* **54**(12): 1403-11.
- [86] Hunte, C., J. Koepke, et al. (2000). "Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc(1) complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment." *Structure* **8**(6): 669-84.
- [87] Iwata, S., J. W. Lee, et al. (1998). "Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex." *Science* **281**(5373): 64-71.
- [88] Iwata, S., C. Ostermeier, et al. (1995). "Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*." *Nature* **376**(6542): 660-9.
- [89] Janssen, R., J. Smeitink, et al. (2002). "CIA30 complex I assembly factor: a candidate for human complex I deficiency?" *Hum Genet* **110**(3): 264-70.
- [90] Kashani-Poor, N., K. Zwicker, et al. (2001). "A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I." *J Biol Chem* **276**(26): 24082-7.
- [91] Kerscher, S. J. (2000). "Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases." *Biochim Biophys Acta* **1459**(2-3): 274-83.

- [92] Kerscher, S. J., J. G. Okun, et al. (1999). "A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*." *J Cell Sci* **112** ( Pt 14): 2347-54.
- [93] Krause, F., N. H. Reifschneider, et al. (2004). "'Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." *J Biol Chem* **279**(46): 48369-75.
- [94] Küffner, R., A. Rohr, et al. (1998). "Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Mol Biol* **283**(2): 409-17.
- [95] Lazarou, M., M. McKenzie, et al. (2007). "Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I." *Mol Cell Biol* **27**(12): 4228-37.
- [96] Li, Y., M. D'Aurelio, et al. (2007). "An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria." *J Biol Chem* **282**(24): 17557-62.
- [97] Lindegren, C. C. and G. Lindgren (1941). "X-ray and ultra-violet induced mutations in *Neurospora*." *J Hered* **32**: 405-412.
- [98] Lowry, R. J., T. L. Durkee, et al. (1967). "Ultrastructural studies of microconidium formation in *Neurospora crassa*." *J Bacteriol* **94**(5): 1757-63.
- [99] Maheshwari, R. (1991). "Microcycle conidiation and its genetic basis in *Neurospora crassa*." *J Gen Microbiol* **137**(9): 2103-15.
- [100] Maheshwari, R. (1991). "A new genotype of *Neurospora crassa* that selectively produces abundant microconidia in submerged shake culture." *Experimental Mycology* **15**: 346-350.
- [101] Maheshwari, R. (1999). "Microconidia of *Neurospora crassa*." *Fungal Genet Biol* **26**(1): 1-18.
- [102] Malling, H. V. (1965). "Identification of the genetic alterations in nitrous acid-induced ad-3 mutants of *Neurospora crassa*." *Mutat Res* **2**(4): 320-7.
- [103] Marques, I., M. Duarte, et al. (2005). "Composition of complex I from *Neurospora crassa* and disruption of two "accessory" subunits." *Biochim Biophys Acta* **1707**(2-3): 211-20.
- [104] Marques, I., M. Duarte, et al. (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.

- [105] Marques, I., A. V. Ushakova, et al. (2007). "Role of the conserved cysteine residues of the 11.5 kDa subunit in complex I catalytic properties." *J Biochem (Tokyo)* **141**(4): 489-93.
- [106] Mashkevich, G., B. Repetto, et al. (1997). "SHY1, the yeast homolog of the mammalian SURF-1 gene, encodes a mitochondrial protein required for respiration." *J Biol Chem* **272**(22): 14356-64.
- [107] Mathiesen, C. and C. Hagerhall (2003). "The 'antiporter module' of respiratory chain complex I includes the MrpC/NuoK subunit -- a revision of the modular evolution scheme." *FEBS Lett* **549**(1-3): 7-13.
- [108] McKenzie, M., M. Lazarou, et al. (2006). "Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients." *J Mol Biol* **361**(3): 462-9.
- [109] Meier, T., P. Polzer, et al. (2005). "Structure of the rotor ring of F-Type Na<sup>+</sup>-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*." *Science* **308**(5722): 659-62.
- [110] Melo, A. M., T. M. Bandejas, et al. (2004). "New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases." *Microbiol Mol Biol Rev* **68**(4): 603-16.
- [111] Melo, A. M., M. Duarte, et al. (2001). "The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria." *J Biol Chem* **276**(6): 3947-51.
- [112] Melo, A. M., M. Duarte, et al. (1999). "Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1412**(3): 282-7.
- [113] Mewes, H. W., D. Frishman, et al. (2002). "MIPS: a database for genomes and protein sequences." *Nucleic Acids Res* **30**(1): 31-4.
- [114] Michalecka, A. M., A. S. Svensson, et al. (2003). "Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light." *Plant Physiol* **133**(2): 642-52.
- [115] Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." *Nature* **191**: 144-8.
- [116] Moller, I. M. (2001). "PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**: 561-591.
- [117] Nakamaru-Ogiso, E., T. Yano, et al. (2005). "Characterization of the iron-sulfur cluster N7 (N1c) in the subunit NuoG of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase from *Escherichia coli*." *J Biol Chem* **280**(1): 301-7.

- [118] Nehls, U., T. Friedrich, et al. (1992). "Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora* mitochondria by gene disruption." *J Mol Biol* **227**(4): 1032-42.
- [119] Niebisch, A. and M. Bott (2003). "Purification of a cytochrome bc-aa3 supercomplex with quinol oxidase activity from *Corynebacterium glutamicum*. Identification of a fourth subunit of cytochrome aa3 oxidase and mutational analysis of diheme cytochrome c1." *J Biol Chem* **278**(6): 4339-46.
- [120] Ogilvie, I., N. G. Kennaway, et al. (2005). "A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy." *J Clin Invest* **115**(10): 2784-92.
- [121] Ohnishi, T. (1998). "Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I." *Biochim Biophys Acta* **1364**(2): 186-206.
- [122] Ohnishi, T. and J. C. Salerno (2005). "Conformation-driven and semiquinone-gated proton-pump mechanism in the NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *FEBS Lett* **579**(21): 4555-61.
- [123] Paietta, J. V. and G. A. Marzluf (1985). "Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*." *Mol Cell Biol* **5**(7): 1554-9.
- [124] Pandit, A. and R. Maheshwari (1993). "A simple method of obtaining pure microconidia in *Neurospora crassa*." *Fungal Genet Newsl.* **40**: 64-65.
- [125] Park, J. S., Y. F. Li, et al. (2007). "Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation." *Biochim Biophys Acta* **1772**(5): 533-42.
- [126] Paumard, P., J. Vaillier, et al. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." *Embo J* **21**(3): 221-30.
- [127] Perez-Martinez, X., S. A. Broadley, et al. (2003). "Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p." *Embo J* **22**(21): 5951-61.
- [128] Perkins, D. D. and R. H. Davis (2000). "Evidence for safety of *Neurospora* species for academic and commercial uses." *Appl Environ Microbiol* **66**(12): 5107-9.
- [129] Raghavendra, A. S. and K. Padmasree (2003). "Beneficial interactions of mitochondrial metabolism with photosynthetic carbon assimilation." *Trends Plant Sci* **8**(11): 546-53.

- [130] Rasmussen, T., D. Scheide, et al. (2001). "Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Biochemistry* **40**(20): 6124-31.
- [131] Rich, P. R. (1984). "Electron and proton transfers through quinones and cytochrome bc complexes." *Biochim Biophys Acta* **768**(1): 53-79.
- [132] Riley, J., R. Butler, et al. (1990). "A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones." *Nucleic Acids Res* **18**(10): 2887-90.
- [133] Robinson, B. H. (1998). "The role of manganese superoxide dismutase in health and disease." *J Inherit Metab Dis* **21**(5): 598-603.
- [134] Sazanov, L. A. (2007). "Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain." *Biochemistry* **46**(9): 2275-88.
- [135] Sazanov, L. A., J. Carroll, et al. (2003). "A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the Escherichia coli NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Biol Chem* **278**(21): 19483-91.
- [136] Sazanov, L. A. and P. Hinchliffe (2006). "Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*." *Science* **311**(5766): 1430-6.
- [137] Scacco, S., R. Vergari, et al. (2000). "cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures." *J Biol Chem* **275**(23): 17578-82.
- [138] Schagger, H., R. de Coo, et al. (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **279**(35): 36349-53.
- [139] Schagger, H. and K. Pfeiffer (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *Embo J* **19**(8): 1777-83.
- [140] Schapira, A. H. (1999). "Mitochondrial disorders." *Biochim Biophys Acta* **1410**(2): 99-102.
- [141] Schapira, A. H. (2006). "Etiology of Parkinson's disease." *Neurology* **66**(10 Suppl 4): S10-23.
- [142] Schilling, B., R. Aggeler, et al. (2005). "Mass spectrometric identification of a novel phosphorylation site in subunit NDUFA10 of bovine mitochondrial complex I." *FEBS Lett* **579**(11): 2485-90.

- [143] Schneider, R., M. Massow, et al. (1995). "Different respiratory-defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein." *Curr Genet* **29**(1): 10-7.
- [144] Schulte, U. (2001). "Biogenesis of respiratory complex I." *J Bioenerg Biomembr* **33**(3): 205-12.
- [145] Schulte, U., A. Abelmann, et al. (1998). "Search for novel redox groups in mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) by diode array UV/VIS spectroscopy." *Biofactors* **8**(3-4): 177-86.
- [146] Schulte, U., I. Becker, et al. (2002). "Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*." *J Biotechnol* **94**(1): 3-13.
- [147] Schulte, U., W. Fecke, et al. (1994). "In vivo dissection of the mitochondrial respiratory NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *Biochim Biophys Acta* **1187**(2): 121-4.
- [148] Schulte, U., V. Haupt, et al. (1999). "A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex." *J Mol Biol* **292**(3): 569-80.
- [149] Schwitzguébel, J. P. and J. M. Palmer (1982). "Properties of mitochondria as a function of the growth stages of *Neurospora crassa*." *J Bacteriol* **149**(2): 612-9.
- [150] Sebald, W., W. Neupert, et al. (1979). "Preparation of *Neurospora crassa* mitochondria." *Methods Enzymol* **55**: 144-8.
- [151] Seo, B. B., E. Nakamaru-Ogiso, et al. (2006). "In vivo complementation of complex I by the yeast Ndi1 enzyme. Possible application for treatment of Parkinson disease." *J Biol Chem* **281**(20): 14250-5.
- [152] Sherman, F. (1964). "Mutants of Yeast Deficient in Cytochrome C." *Genetics* **49**: 39-48.
- [153] Simons, B. H., F. F. Millenaar, et al. (1999). "Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of *Arabidopsis* with *Pseudomonas syringae* pv tomato." *Plant Physiol* **120**(2): 529-38.
- [154] Smeitink, J., L. van den Heuvel, et al. (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." *Nat Rev Genet* **2**(5): 342-52.
- [155] Sone, N., M. Sekimachi, et al. (1987). "Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a bc1 complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium PS3." *J Biol Chem* **262**(32): 15386-91.

- [156] Stiburek, L., H. Hansikova, et al. (2006). "Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase." *Physiol Res* **55 Suppl 2**: S27-41.
- [157] Stroh, A., O. Anderka, et al. (2004). "Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*." *J Biol Chem* **279**(6): 5000-7.
- [158] Suzuki, C. K., M. Rep, et al. (1997). "ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis." *Trends Biochem Sci* **22**(4): 118-23.
- [159] Svensson, A. S. and A. G. Rasmusson (2001). "Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves." *Plant J* **28**(1): 73-82.
- [160] Thorburn, D. R., C. Sugiana, et al. (2004). "Biochemical and molecular diagnosis of mitochondrial respiratory chain disorders." *Biochim Biophys Acta* **1659**(2-3): 121-8.
- [161] Triepels, R. H., L. P. Van Den Heuvel, et al. (2001). "Respiratory chain complex I deficiency." *Am J Med Genet* **106**(1): 37-45.
- [162] Tsalastra, W. (2004). "Verfahren zur Isolierung ungezielt erzeugter NADH:Ubichinon Oxidoreduktase Mutanten von *Neurospora crassa*." *Dissertation, Universität Düsseldorf*.
- [163] Tsukihara, T., H. Aoyama, et al. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." *Science* **272**(5265): 1136-44.
- [164] Tuschen, G., U. Sackmann, et al. (1990). "Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits." *J Mol Biol* **213**(4): 845-57.
- [165] Tzagoloff, A., M. Nobrega, et al. (1993). "On the functions of the yeast COX10 and COX11 gene products." *Biochem Mol Biol Int* **31**(3): 593-8.
- [166] Ugalde, C., R. Vogel, et al. (2004). "Human mitochondrial complex I assembles through the combination of evolutionary conserved modules: a framework to interpret complex I deficiencies." *Hum Mol Genet* **13**(20): 2461-72.
- [167] Uhlmann, M. and T. Friedrich (2005). "EPR signals assigned to Fe/S cluster N1c of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) derive from cluster N1a." *Biochemistry* **44**(5): 1653-8.
- [168] Ushakova, A. V., M. Duarte, et al. (2005). "The 29.9 kDa subunit of mitochondrial complex I is involved in the enzyme active/de-active transitions." *J Mol Biol* **351**(2): 327-33.

- [169] Vahsen, N., C. Cande, et al. (2004). "AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation." *Embo J* **23**(23): 4679-89.
- [170] Videira, A. (1998). "Complex I from the fungus *Neurospora crassa*." *Biochim Biophys Acta* **1364**(2): 89-100.
- [171] Vogel, H. J. (1956). "A convenient growth media for *Neurospora crassa*." *Microbiol Genet Bull* **13**: 42-47.
- [172] Vogel, R. O., C. E. Dieteren, et al. (2007). "Identification of mitochondrial complex I assembly intermediates by tracing tagged NDUFS3 demonstrates the entry point of mitochondrial subunits." *J Biol Chem* **282**(10): 7582-90.
- [173] Vogel, R. O., R. J. Janssen, et al. (2005). "Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUF1." *FEBS J* **272**(20): 5317-26.
- [174] Vogel, R. O., R. J. Janssen, et al. (2007). "Cytosolic signaling protein Ecsit also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUF1 and functions in complex I assembly." *Genes Dev* **21**(5): 615-24.
- [175] Vogel, R. O., J. A. Smeitink, et al. (2007). "Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process." *Biochim Biophys Acta* **1767**(10): 1215-27.
- [176] Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." *Annu Rev Genet* **39**: 359-407.
- [177] Wang, D. C., S. W. Meinhardt, et al. (1991). "The iron-sulfur clusters in the two related forms of mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase made by *Neurospora crassa*." *Eur J Biochem* **197**(1): 257-64.
- [178] Weiss, H. and T. Friedrich (1991). "Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone reductase (complex I)." *J Bioenerg Biomembr* **23**(5): 743-54.
- [179] Weiss, H., G. von Jagow, et al. (1970). "Characterization of *Neurospora crassa* mitochondria prepared with a grind-mill." *Eur J Biochem* **14**(1): 75-82.
- [180] Westergaard, M. and H. K. Mitchell (1947). "Neurospora V. A synthetic medium favoring sexual reproduction." *Amer J Bot* **37**: 573-577.
- [181] Xia, D., C. A. Yu, et al. (1997). "Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria." *Science* **277**(5322): 60-6.
- [182] Yadava, N. and I. E. Scheffler (2004). "Import and orientation of the MWFE protein in mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase." *Mitochondrion* **4**(1): 1-12.

- [183] Yagi, T. and A. Matsuno-Yagi (2003). "The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked." *Biochemistry* **42**(8): 2266-74.
- [184] Yagi, T., B. B. Seo, et al. (2001). "NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine." *J Bioenerg Biomembr* **33**(3): 233-42.
- [185] Yano, T., V. D. Sled, et al. (1996). "Expression and characterization of the flavoprotein subcomplex composed of 50-kDa (NQO1) and 25-kDa (NQO2) subunits of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*." *J Biol Chem* **271**(10): 5907-13.
- [186] Zambrano, A., F. Fontanesi, et al. (2007). "Aberrant translation of cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA species in the absence of Mss51p in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Biol Cell* **18**(2): 523-35.
- [187] Zee, J. M. and D. M. Glerum (2006). "Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast." *Biochem Cell Biol* **84**(6): 859-69.
- [188] Zensen, R., H. Husmann, et al. (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**(2): 179-81.
- [189] Zhang, Z., L. Huang, et al. (1998). "Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1." *Nature* **392**(6677): 677-84.

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

An erster Stelle gilt mein Dank PD Dr. Ulrich Schulte, der mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat. Seine engagierte Betreuung und beruhigende Ausstrahlung haben mir geholfen mein Ziel niemals aus den Augen zu verlieren.

Meinem Koreferenten Prof. Dr. Hanns Weiss danke ich für seine stets aufmunternden Worte und Verbesserungsvorschläge in meinen Vorträgen.

Mein besonderer Dank gilt Wasiliki Tsalastra-Greul, die mir den Einstieg in die Materie erleichtert hat und Martina Wesemann, die mich als Seele der Arbeitsgruppe immer unterstützt hat. Unserem jüngsten Neuzugang Veronika Kemke möchte ich für die ständige Jagd nach dem spannendsten Paper danken. Alle drei sind mir sehr ans Herz gewachsen und über die Arbeit hinaus liebe Freundinnen geworden.

Für dieses Projekt konnte ich auch auf die tatkräftige Unterstützung von ausgezeichneten Diplomanden und Praktikanten zurückgreifen. Insbesondere möchte ich mich bei Marco, Garlef, Petra, Heike und Claudia für die gute und auch angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Meinen alten Kollegen Sven, Thorsten und Kathi sowie allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Lutz Schmitt danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für Ihre Unterstützung und Liebe.

Ganz besonders danke ich meiner großen Liebe Dirk, der immer für mich da war und mir mit Geduld und Verständnis stets Kraft gegeben hat.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Zitate wurden kenntlich gemacht.

Yasmin Golestani

Düsseldorf, den 10.12.2007