

**Untersuchungen zur Bedeutung der  
mitochondrialen Proteinqualitäts-  
kontrolle für Alterungsprozesse bei dem  
Ascomyceten *Podospora anserina***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe - Universität  
in Frankfurt am Main

von Andrea Christine Weil  
aus Mainz

Frankfurt am Main 2012  
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation  
angenommen

Dekanin: Prof. Dr. A Starzinski-Powitz

1. Gutachter: Prof. Dr. H. D. Osiewacz

2. Gutachter: Prof. Dr. U. Brandt

Datum der Disputation:

### Konventionen zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen

Für die vorliegende Arbeit gelten folgende Regelungen für die Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen:

- **Gene** werden kursiv geschrieben (z.B. *Iap*, *Yme1*). Wenn sie einer bestimmten Spezies zugeordnet werden, kürzen die ersten beiden Buchstaben den jeweiligen Artnamen ab (z.B. *Palap*, *ScYme1*).
- **Proteine** werden groß und nicht kursiv geschrieben (z.B. IAP, YME1). Bei der Bezeichnung von Proteinen bestimmter Spezies wird der Artnamen ebenfalls abgekürzt (z.B. PalAP, ScYME1).
- **Deletionsstämme** werden nach dem deletierten Gen benannt (z.B. *Palap*-Deletionsstamm) oder durch den dem Gennamen vorangestellten griechischen Buchstaben „Delta“ gekennzeichnet (z.B.  $\Delta$ *Palap*).
- **Expressionsstämme** werden nach dem exprimierten Gen benannt (z.B. *Palap*\_E540Q).

What is now proved was once only imagined.

William Blake (1757 - 1827)

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Altern und die Rolle der mitochondrialen Qualitätskontrolle	1
1.2	Mitochondriale ATP-abhängige Proteasen	6
1.3	Die Matrixproteasen LON und CLPX	7
1.4	Die membrangebundenen Proteasen	9
1.4.1	Die m-AAA Protease	10
1.4.2	Die i-AAA Protease	14
1.4.2.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
1.4.2.2	<i>Neurospora crassa</i>	19
1.4.2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i>	20
1.4.2.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	20
1.4.2.5	<i>Homo sapiens</i>	22
1.5	<i>Podospira anserina</i> als Modellorganismus der Altersforschung	24
<b>2</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1	Material	29
3.1.1	Geräte	29
3.1.2	Sonstige Materialien	30
3.1.3	Chemikalien und Stoffe	31
3.1.4	Anzuchtmedien	32
3.1.5	Lösungen und Puffer	33
3.1.6	Zusammensetzung der Proteingele	36
3.1.7	Kits	37
3.1.8	Verwendete Stämme	37
3.1.9	Größenstandards	37
3.1.10	Oligonukleotide	38
3.1.11	Plasmide	38
3.1.12	Sonden	39
3.1.13	Enzyme	39
3.1.14	Antikörper	39
3.1.15	Computerprogramme	40

3.2	Methoden	41
3.2.1	<i>E. coli</i> -spezifische Methoden	41
3.2.2	<i>P. anserina</i> -spezifische Methoden	42
3.2.3	Nukleinsäuren-spezifische Methoden	46
3.2.4	Protein-spezifische Methoden	52
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
4.1	Deletion der i-AAA Protease in <i>Podospora anserina</i>	61
4.1.1	Identifizierung der i-AAA und m-AAA Protease bei <i>Podospora anserina</i>	62
4.1.2	Einordnung von PalAP in die Proteinfamilie der i-AAA Proteasen	64
4.1.3	Verifizierung der Deletion von <i>Palap</i> im Deletionsstamm $\Delta$ <i>Palap</i>	65
4.1.4	Charakterisierung des <i>Palap</i> -Deletionsstamms unter Standardbedingungen	67
4.1.5	Charakterisierung des <i>Palap</i> -Deletionsstamms bei Hitzestress	73
4.1.6	Auswirkung der Deletion von <i>Palap</i> auf die Regulation der m-AAA Protease	76
4.1.7	Regulation von PalAP bei Hitze	77
4.1.8	Analyse des mitochondrialen Proteoms des <i>Palap</i> -Deletionsstamms	78
4.1.8.1	Auswirkung des Verlusts von PalAP auf Komponenten des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems	79
4.1.8.2	Auswirkung des Verlusts von PalAP auf Proteinmodifikationen des hitzestressen mitochondrialen Proteoms von <i>P. anserina</i>	80
4.1.8.3	Auswirkung des Verlusts von PalAP auf das mitochondriale Proteom von <i>P. anserina</i>	81
4.1.9	Auswirkung der Deletion von <i>Palap</i> auf die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe	86
4.2	Reversion der Deletion von <i>Palap</i>	94
4.2.1	Herstellung von <i>Palap</i> -Revertantenstämmen	94
4.2.2	Charakterisierung der <i>Palap</i> -Revertanten	97
4.3	Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP	98
4.3.1	Strategie zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP durch <i>in-vitro</i> -Mutagenese	98
4.3.2	<i>In-vitro</i> -Mutagenese zur Herstellung der Plasmide p <i>Palap</i> -E540Q und p <i>Palap</i> -E540QG	99
4.3.3	Einfluss der Mutationen auf die Struktur von PalAP	102
4.3.4	Herstellung von Stämmen mit proteolytisch inaktiver i-AAA Protease	104
4.3.5	Charakterisierung von <i>Palap</i> _E540QG und <i>Palap</i> _E540Q	105
4.4	Auswirkung der Deletion von <i>Palap</i> und <i>PaClpP</i>	107
4.4.1	Herstellung der <i>Palap</i> / <i>PaClpP</i> -Deletionsmutante	108

---

4.4.2	Charakterisierung der <i>Palap</i> / <i>PaClpP</i> -Deletionsmutante. . . . .	109
<b>5</b>	<b>Diskussion. . . . .</b>	<b>115</b>
5.1	Im Genom von <i>P. anserina</i> sind Homologe der i-AAA und m-AAA Protease kodiert . . . . .	115
5.2	Die Deletion von <i>Palap</i> ist unter Standardbedingungen positiv für <i>P. anserina</i> . . . . .	116
5.3	Der <i>Palap</i> -Deletionsstamm ist hitzesensitiv . . . . .	118
5.4	PaIAP ist an der Hitzestressantwort von <i>P. anserina</i> beteiligt . . . . .	119
5.5	Der Verlust von PaIAP beeinflusst andere Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle . . . . .	121
5.6	Die Deletion von <i>Palap</i> führt zur Reorganisation der Atmungskettenkomplexe. . . . .	123
5.7	Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf das mitochondriale Proteom . . . . .	125
5.8	Die proteolytische Aktivität von PaIAP begrenzt die Lebensspanne von <i>P. anserina</i> . . . . .	127
5.9	Die Funktionen von PaIAP und PaCLPP unterscheiden sich . . . . .	128
5.10	Die i-AAA Protease spielt eine wichtige Rolle bei der Alterung und der Hitzestressantwort von <i>P. anserina</i> . . . . .	130
<b>6</b>	<b>Ausblick. . . . .</b>	<b>133</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung. . . . .</b>	<b>135</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis. . . . .</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Anhang . . . . .</b>	<b>149</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	149
9.2	Abbildungen und Tabellen . . . . .	151
9.3	Abbildungsverzeichnis. . . . .	157
9.4	Tabellenverzeichnis . . . . .	159
<b>10</b>	<b>Danksagung . . . . .</b>	<b>161</b>
<b>11</b>	<b>Publikationsliste. . . . .</b>	<b>163</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf . . . . .</b>	<b>165</b>



# 1 Einleitung

In den letzten 100 Jahren ist die Lebenserwartung der Menschen in Deutschland um fast 30 Jahre gestiegen (Statistisches Bundesamt). Insgesamt leben die Menschen in der europäischen Region und auch weltweit heute länger als je zuvor (Weltgesundheitsorganisation - WHO). Gleichzeitig sinkt in vielen Ländern die Geburtenrate, sodass der Anteil der älteren Menschen immer weiter ansteigen wird. Dadurch müssen immer weniger junge Menschen die Versorgung von immer mehr älteren Menschen gewährleisten. Durch diesen demografischen Wandel ist die Notwendigkeit gesunden und aktiven Alterns als Grundlage für die zukünftige Nachhaltigkeit der Gesundheits- und Sozialsysteme deutlich gestiegen (WHO Europa).

Um die Bevölkerung weltweit auf diesen Trend aufmerksam zu machen, lautete das Motto der WHO für den Weltgesundheitstag 2012 „Altern und Gesundheit – Gesundheit erfüllt die Jahre mit Leben“ (WHO). Auch die Europäische Union hat das Jahr 2012 zum „Europäischen Jahr für aktives Altern und Solidarität zwischen den Generationen“ erklärt (Bundesvereinigung Prävention und Gesundheitsförderung e.V.). Dies soll zur Diskussion über die Frage anregen, wie die Menschen auch im Alter gesund und unabhängig bleiben können, und wie sich die Lebensqualität im Alter weiter verbessern lässt (WHO).

Dadurch kommt auch der experimentellen Altersforschung eine immer größere Bedeutung zu. Diese versucht unter anderem die molekularen und zellulären Ursachen des Alterns zu erklären und weiter aufzudecken und somit Ansätze zur Verminderung der gesundheitlichen Beeinträchtigungen zu liefern.

## 1.1 Altern und die Rolle der mitochondrialen Qualitätskontrolle

Altern ist ein phylogenetisch weit verbreiteter Vorgang, der zeitabhängig zu unter normalen Bedingungen irreversiblen physiologischen Funktionsverlusten führt (Kirkwood & Austad 2000). Dadurch nimmt die Anfälligkeit des betroffenen Organismus für Krankheiten und die Sterblichkeit zu, während die Fertilität meist abnimmt.

Altern ist hauptsächlich ein Phänomen geschützter Populationen, da z.B. wilde Tiere durch Gefahren der Umwelt wie Infektionen, Hunger, Trockenheit oder Kälte sterben oder von Räubern erlegt werden bevor sie altern (Kirkwood & Austad 2000). Nur in einer geschützten Umwelt können Tiere ihre maximale Lebensspanne erreichen (Holliday 2006). Der biologische Sinn des Erreichens einer post-reproduktiven Phase ist jedoch ebenfalls noch unklar (Kirkwood & Austad 2000).

Die inhärente Komplexität des Alterungsprozesses hat dazu geführt, dass es bereits mehr als 300 unterschiedliche Theorien und Hypothesen zum Altern gibt (Medvedev 1990; Kirkwood 2005). Dies deutet darauf hin, dass sich Altern nicht mit einer einzigen Theorie zufriedenstellend erklären lassen wird (Medvedev 1990). Letztlich beruht Altern auf dem zunehmenden Versagen der vielen Kontrollmecha-

nismen, die für die Erhaltung der Funktionen der Zellen, Gewebe und Organe eines Organismus verantwortlich sind (Holliday 2006). Demnach ist Altern ein multikausaler Vorgang, der zusätzlich noch durch zufällig auftretende extrinsische und intrinsische schädigende Prozesse beeinflusst wird (Hayflick 2007). Dies führt dazu, dass auch genetisch identische Individuen, wie z.B. eineiige Zwillinge, individuelle Unterschiede beim Altern und in der Lebensspanne aufweisen (Kirkwood & Austad 2000).

Eine wichtige Rolle beim Altern spielen zweifelsohne die Mitochondrien. So basiert auch eine der ersten Alternstheorien, die aus der freien Radikaltheorie des Alterns entstandene mitochondriale freie Radikaltheorie des Alterns (MFRTA), auf der besonderen Bedeutung der Mitochondrien (Harman 1956 und 1972). Diese besagt, dass durch den mitochondrialen Energiemetabolismus reaktive Sauerstoffspezies („*reactive oxygen species*“, ROS) entstehen, die Zellbestandteile wie Lipide, Proteine und Nukleinsäuren oxidieren können und diese dadurch strukturell und funktionell verändern. Die Entstehung von ROS findet dabei hauptsächlich in der Atmungskette an Komplex I und III statt (Kushnareva et al. 2002; Chen et al. 2003; Brand 2010; Dröse & Brandt 2012).

Während das Hyperoxid-Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) an Komplex I vor allem durch die Oxidation von reduziertem Flavin ( $FMNH_2$ ) oder Flavinsemichinon (FMN-Semichinon) und Reduktion von molekularem Sauerstoff generiert und in die Matrix freigesetzt wird (Galkin & Brandt 2005; Kussmaul & Hirst 2006), entsteht  $O_2^{\bullet-}$  an Komplex III vermutlich mit Ubichinon als Redoxmediator durch die Oxidation des reduzierten Häm  $b_L$  der Cytochrom  $b$ -Untereinheit und wird in die Matrix und den Intermembranraum abgegeben (Dröse & Brandt 2012).

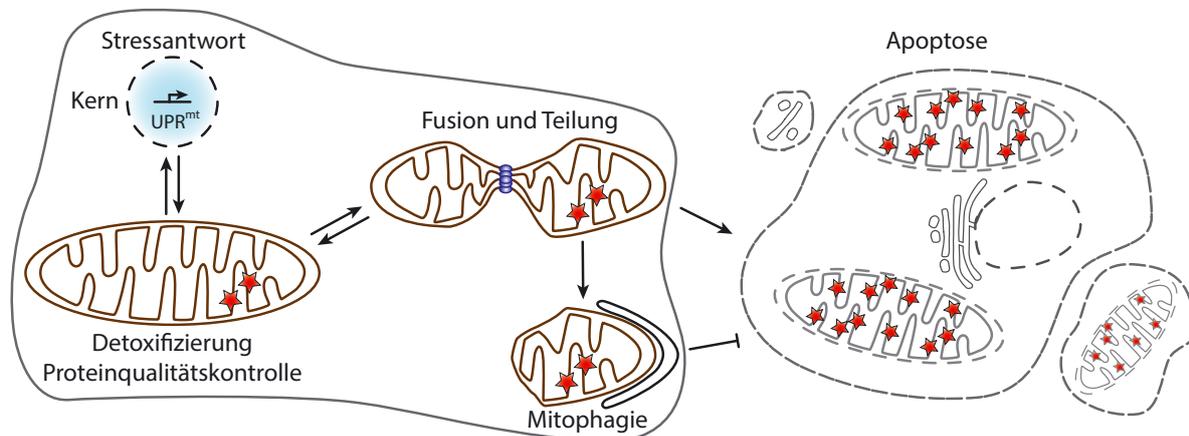
Aufgrund der räumlichen Nähe und der Redox-sensitiven Eisen-Schwefel-Zentren (Fe-S-Zentren) gehören die Atmungskettenkomplexe zu den ersten Proteinen, die von ROS geschädigt werden (Melov et al. 1999). Durch die zunehmende Akkumulation dieser Schäden in der Atmungskette wird der Elektronentransport während des Alterns immer mehr behindert, wodurch ein Rückstau der Elektronen hervorgerufen wird (Ferguson et al. 2005). Dieser steigert die Anfälligkeit der Komplexe zur Selbstoxidation, was wiederum die Aktivität reduziert und die ROS-Produktion fördert (Sohal & Sohal 1991). Darüber hinaus kommt es durch die ROS-Freisetzung zur Inaktivierung weiterer Proteine mit Fe-S-Zentren wie z.B. der Aconitase (Melov et al. 1999). Bei dieser führen die Oxidation des 4Fe-4S-Zentrums und die Freisetzung von  $Fe^{2+}$  zum Verlust der katalytischen Aktivität (Gardner 1997).

Nach der MFRTA ist die Produktion von mitochondrialen ROS die Ursache des Alterns. Dem widersprechen jedoch Befunde z.B. aus *Caenorhabditis elegans*, in dem die Bildung von ROS unter bestimmten Bedingungen zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (Schulz et al. 2007). Durch eine Verminderung der Verfügbarkeit von Glucose wird dabei die mitochondriale Atmung erhöht und die Bildung von ROS induziert. Dies führt wiederum zu einer Erhöhung der Schutzmechanismen und einer Verlängerung der Lebensspanne der Nematoden. Da der ROS-bedingte Stress mitochondrialen Ursprungs ist,

handelt es sich bei dieser Art der retrograden Antwort um mitochondriale Hormesis oder Mitohormesis (Schulz et al. 2007). Insgesamt werden positive Effekte auf das Altern, die durch zelluläre Antworten auf milden Stress hervorgerufen wurden, als Hormesis oder hormetische Effekte bezeichnet (Rattan 2001). Dieser und andere Befunde zeigen, dass ROS zwar zum Altern beiträgt, jedoch nicht unbedingt dessen Ursache sein muss (Lapointe & Hekimi 2010). So wäre es auch möglich, dass oxidativer Stress eine Folge des Alterns ist, z.B. durch den Verlust von Kontrollmechanismen.

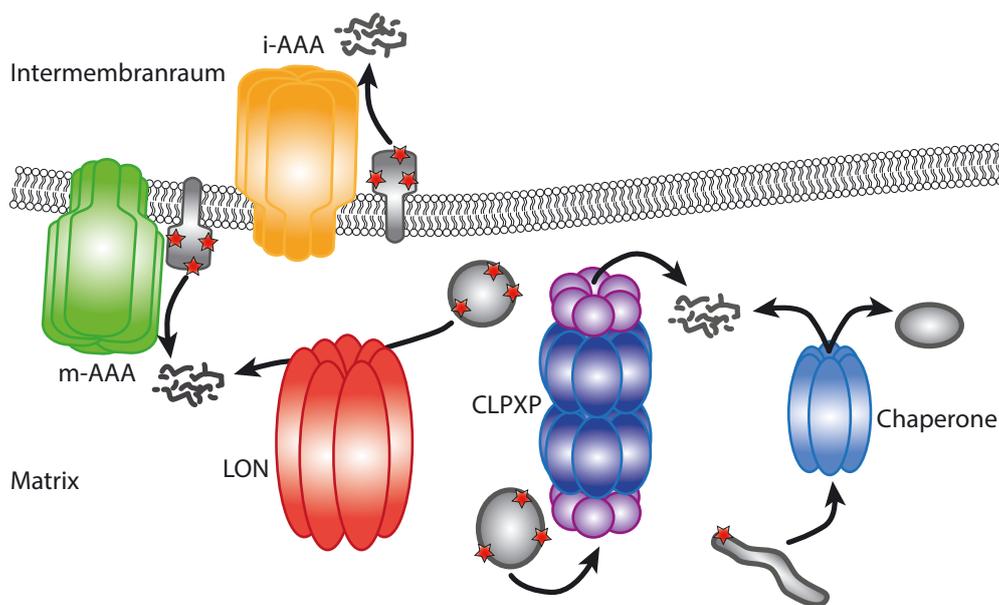
Neben der schädigenden Wirkung hat ROS auch essenzielle zelluläre Aufgaben, wozu z.B. Signalfunktionen gehören (Murphy et al. 2011). Ein Beispiel dafür ist der starke Anstieg der mitochondrialen ROS-Produktion, der bei Sauerstoffmangel (Hypoxie) in der Zelle beobachtet werden kann (Bell et al. 2007). Dies führt zur Aktivierung von HIF-1 („*hypoxia-inducible factor*“), einem heterodimeren Transkriptionsregulator, der die Anpassung der Zelle an Hypoxie erleichtert. So konnte in Säugerzellen gezeigt werden, dass HIF-1 bei verminderter Verfügbarkeit von Sauerstoff die Transkription der Gene der mitochondrialen LON-Protease und der Untereinheit COX4-2 von Komplex IV aktiviert (Fukuda et al. 2007). Durch den Abbau von COX4-1 durch die LON-Protease kommt es zum Austausch von COX4-1 und COX4-2 und zur Optimierung der Aktivität von Komplex IV bei Hypoxie.

Unter normalen Umständen werden die in den Zellen aerober Organismen freigesetzten ROS direkt detoxifiziert (Abb. 1). Dazu stehen den Organismen eine Vielzahl von Enzymen und Antioxidantien zur Verfügung, die miteinander interagieren und die entstandenen ROS in weniger reaktive bzw. unschädliche Substanzen umwandeln. Zu diesen Enzymen gehören unter anderem Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen und Peroxidasen (Halliwell 1996; Fischer et al. 2012).



**Abb. 1: Hierarchie der mitochondrialen Qualitätskontrolle.** Normalerweise werden die in den Mitochondrien freigesetzten ROS (rote Sterne) durch Enzyme und Antioxidantien detoxifiziert. Intramitochondriale Chaperone und Proteasen überwachen zusätzlich die Faltung bzw. Schädigung mitochondrialer Proteine und bauen diese bei Bedarf ab. Unter Stressbedingungen wird die mitochondriale ungefaltete Proteinantwort (UPR<sup>mt</sup>) im Kern ausgelöst, wodurch die Proteinmengen der Chaperone und Proteasen in den Mitochondrien erhöht werden. Durch Fusion und Teilung (blaue Kreise: Teilungsmaschinerie) der Mitochondrien kommt es zur Durchmischung des mitochondrialen Kompartiments, wodurch die mitochondriale Integrität erhalten werden kann. Bei größeren Schäden werden die dysfunktionalen Bereiche abgetrennt und durch Mitophagie abgebaut oder Apoptose eingeleitet (modifiziert nach Rugarli & Langer 2012).

Trotzdem werden immer wieder zufällig Biomoleküle wie z.B. Proteine durch ROS oxidiert und geschädigt. Um deren Akkumulation zu verhindern, müssen diese repariert oder bei irreversibler Schädigung abgebaut werden. In den Mitochondrien erfolgt diese Proteinqualitätskontrolle durch ein Netzwerk von Chaperonen und Proteasen (Abb. 2; Tatsuta & Langer 2008; Fischer et al. 2012). Die Chaperone überprüfen dabei die Konformation der Proteine und unterstützen ungefaltete Proteine bei der korrekten Faltung, sowie fehlgefalteten Proteinen bei der Rückfaltung. Darüber hinaus lösen sie aggregierte Proteine auf. Irreversibel geschädigte Proteine werden dagegen von meist energieabhängigen Proteasen abgebaut, um deren Aggregation zu verhindern. Als weitere Funktionen sind einige der Chaperone und Proteasen an der Assemblierung mitochondrialer Proteinkomplexe und dem selektiven Abbau nicht-assemblierter Untereinheiten beteiligt. Dadurch wird ein Ungleichgewicht in der Menge an Kern-kodierten und mitochondrial-kodierten Proteinen vermieden. Außerdem kann so auch die Menge regulatorischer Proteine kontrolliert werden. Aufgrund des endosymbiontischen Ursprungs der Mitochondrien sind diese Proteasen eng verwandt mit bakteriellen Proteasen und in eukaryotischen Zellen sehr konserviert (Koppen & Langer 2007).



**Abb. 2: Schematische Übersicht über die ATP-abhängigen Proteasen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle.** Chaperone überprüfen die Konformation mitochondrialer Proteine und unterstützen fehl- oder ungefaltete, sowie geschädigte (roter Stern) Proteine (grau) bei der Faltung. Bei irreversibler Schädigung oder Aggregation werden die Proteine z.B. von ATP-abhängigen Proteasen abgebaut.

Zusätzlich wird die mitochondriale Integrität durch die dynamische Natur des mitochondrialen Netzwerks geschützt. Durch die Fusion und anschließende Teilung von Mitochondrien kommt es zur Durchmischung des mitochondrialen Kompartiments, wodurch z.B. geschädigte mitochondriale DNA

(mtDNA) durch intakte ersetzt und so die Funktion und Homogenität der Mitochondrien reguliert werden kann (Chen & Chan 2009).

Jedes Mitochondrium besitzt mehrere hundert Kopien der mtDNA, von denen angenommen wird, dass sie durch die zunehmende ROS-Produktion immer mehr geschädigt werden, was wiederum die Funktion des Mitochondriums beeinträchtigt (Bandy & Davison 1990). Dagegen konnte kürzlich in einem *in-silico*-Modell gezeigt werden, dass gerade während des Alterns die Verminderung der mitochondrialen Dynamik die Ausbreitung molekularer Schäden verlangsamt, wodurch die zelluläre Funktion länger aufrechterhalten werden kann (Figge et al. 2012).

Sind die mitochondrialen Schäden zu groß, so wird die Fragmentierung der Mitochondrien ausgelöst, um die geschädigten Teile vom intakten Netzwerk abzusondern (Fischer et al. 2012). Dysfunktionale Mitochondrien werden durch Mitophagie selektiv abgebaut und die Abbauprodukte werden dem Stoffwechsel wieder zur Verfügung gestellt. Durch diesen zur Autophagie zählenden Prozess werden die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren und der dadurch ausgelöste Zelltod verhindert. Trotzdem nimmt die Integrität der Mitochondrien mit der Zeit immer weiter ab und trägt so zum Altern von Zellen, Geweben und letztlich dem Organismus bei.

Trotz der vielen ineinandergreifenden Kontrollmechanismen, welche die mitochondriale Homöostase aufrechterhalten, hat oft bereits der Ausfall eines Proteins gravierende Folgen für den betroffenen Organismus (Chen & Chan 2009). Besonders metabolisch aktive Zellen mit hohem Energieverbrauch wie im Herz, in den Muskeln, aber auch in Neuronen sind von der Integrität der Mitochondrien abhängig (Wallace 1999; Tatsuta & Langer 2008; Chen & Chan 2009). Deshalb sind durch mitochondriale Dysfunktion ausgelöste Erkrankungen meist mit einer neurodegenerativen Komponente verbunden. Dazu gehören sowohl Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, als auch verschiedene Formen der hereditären spastischen Paraplegie.

Bei der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) handelt es sich um eine große Gruppe erblicher neurologischer Funktionsstörungen. Diese sind charakterisiert durch eine zunehmende spastische Lähmung der unteren Gliedmaßen, was durch sukzessive Degeneration der Axone der kortikalen Motoneurone verursacht wird (Hansen et al. 2008). Dabei ist HSP eine klinisch und genetisch heterogene Krankheit, für die bisher mehr als 30 verschiedene Genloci identifiziert werden konnten. Interessanterweise konnten mehrere Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems mit HSP in Verbindung gebracht werden (Casari et al. 1998; Hansen et al. 2008). Mutationen im *Hspd1*-Gen, das für das mitochondriale Chaperonin HSP60 kodiert, führen zur autosomal dominanten Form SPG13 (Hansen et al. 2008). Durch die Mutation wird die Chaperonaktivität verringert, was zur Folge hat, dass die Proteinmengen der in der Matrix lokalisierten ATP-abhängigen Proteasen LON und CLPP, dem proteolytischen Teil der CLPXP-Protease, reduziert werden. Durch diese Abstimmung der Aktivitäten von

HSP60 sowie der LON- und der CLP-Protease wird vermutlich Substraten der drei Proteine ermöglicht mehrere Faltungsversuche zu durchlaufen, bevor sie abgebaut werden.

Zwei weitere Proteasen des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems sind die in der inneren Membran verankerten, ebenfalls ATP-abhängigen i-AAA und m-AAA Proteasen. Der Verlust bzw. die Mutation von Paraplegin, einer Untereinheit der menschlichen m-AAA Protease, führt zu einer autosomal rezessiven Form der hereditären spastischen Paraplegie, SPG7 (vgl. 1.4.1; Martinelli & Rugarli 2010). Durch die Mutation bzw. die Deletion kommt es zum Funktionsverlust von Paraplegin, welches normalerweise einen hetero-oligomeren Komplex mit AFG3L2 bildet. In *Paraplegin*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese besonders in den distalen Enden der langen Axone und den Synapsen große, morphologisch abnormale Mitochondrien aufweisen (Ferreirinha et al. 2004). Dies nimmt mit dem Alter zu. Durch die Akkumulation von Mitochondrien und Neurofilamenten schwellen die Axone zunehmend an und der anterograde axonale Transport wird behindert. Der anterograde Transport dient der Versorgung der Axonenden mit Proteinen und Lipiden, während durch den retrograden Transport altes und geschädigtes Material abgebaut und ersetzt wird (Rugarli & Langer 2006).

Dagegen konnte die zweite membrangebundene Protease, die i-AAA Protease, bisher nicht mit Krankheiten mitochondrialen Ursprungs in Verbindung gebracht werden (vgl. 1.4.2.5; Coenen et al. 2005). Insgesamt gibt es so gut wie keine Hinweise auf die Funktion der humanen i-AAA Protease (Stiburek et al. 2012).

## 1.2 Mitochondriale ATP-abhängige Proteasen

Die ATP-abhängigen Proteasen spielen eine Schlüsselrolle bei der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle. Sowohl die beiden Serinproteasen LON und CLPXP als auch die beiden zu den Metalloproteasen zählenden i-AAA und m-AAA Proteasen gehören zur Superfamilie der AAA<sup>+</sup>-Proteine („*ATPases associated with various cellular activities*“; Neuwald et al. 1999; Lupas & Martin 2002). Die meisten Proteine der AAA<sup>+</sup>-Familie assemblieren in homo- oder hetero-oligomere, hexamere ringförmige Komplexe, wobei auch andere oligomere Zustände nachgewiesen werden konnten (Hanson & Whiteheart 2005). Dabei befinden sich die proteolytisch aktiven Zentren der ATP-abhängigen Proteasen im Inneren der Komplexe. Die Proteine der AAA<sup>+</sup>-Familie zeichnen sich durch eine sehr konservierte ATPase-Domäne aus, die meist aus 200 - 250 Aminosäuren bestehende AAA-Domäne. Bei vielen Proteinen konnte bereits eine Chaperon-artige Funktion dieser Domäne gezeigt werden (Levchenko et al. 1995; Arlt et al. 1996; Leonhard et al. 1999). Die AAA-Domäne enthält zwei Motive, das Walker A-Motiv (GxxxxGKS/T, wobei x jede beliebige Aminosäure sein kann), welches direkt mit den Phosphaten des

ATP interagiert, und das Walker B-Motiv (hhhhDE, wobei h hydrophobe Aminosäurereste repräsentiert), das ebenfalls mit dem Nukleotid interagiert und dessen Aspartat (D) das katalytische  $Mg^{2+}$ -Ion koordiniert. Die AAA-Domäne der i-AAA und der m-AAA Protease weist darüber hinaus eine weitere konservierte Sequenz auf, die „*second region of homology*“ (SRH), wodurch die beiden Proteasen innerhalb der AAA<sup>+</sup>-Superfamilie der AAA-Familie zugeordnet werden können (Tomoyasu et al. 1993; Lupas & Martin 2002). Das SRH-Motiv enthält zwei spezifische strukturelle Elemente, Sensor-1 und einen oder zwei Arginin-Finger. Sensor-1 besteht aus einer polaren Aminosäure, die vermutlich mit dem  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen ATP interagiert (Hanson & Whiteheart 2005). AAA-Proteine besitzen zwei Arginin-Finger, die ebenfalls mit dem  $\gamma$ -Phosphat des in der Nachbaruntereinheit gebundenen ATP interagieren. Die polare Aminosäure von Sensor-1 und die Arginin-Finger sind essenziell für die ATP-Hydrolyse und somit für die Funktion des Proteins. Dabei wird die aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie von den Proteasen nicht zur Hydrolyse der Peptidbindung des Substrates benötigt, sondern für dessen Bindung und die Konformationsänderung des Komplexes während der Entfaltung des Substrates (Neuwald et al. 1999).

### 1.3 Die Matrixproteasen LON und CLPXP

Sowohl die LON- als auch die proteolytische Untereinheit CLPP der CLP-Protease bilden jeweils ringförmige, homo-heptamere Komplexe (Wang et al. 1997; Stahlberg et al. 1999). Während jedoch bei der LON-Protease die proteolytische Domäne C-terminal von der AAA-Domäne auf einem Polypeptid liegt, sind CLP-Proteasen aus zwei unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt (Hanson & Whiteheart 2005). Die Serinprotease CLPP bildet dabei die proteolytische Komponente, während regulatorische ATPase-Untereinheiten wie CLPX (oder CLPA) als Chaperone dem Komplex Substratspezifität verleihen (Wang et al. 1997). Die native Protease CLPP besteht aus zwei Heptameren, die sich zum tetradekameren CLPP-Zylinder zusammenlagern, sowie den hexameren, ringförmigen ATPase-Untereinheiten, die auf beiden Seiten mit dem Zylinder interagieren. Dabei hat die Protease CLPP auch in Abwesenheit der CLP-ATPasen geringe proteolytische Aktivität und kann kleine Peptide abbauen. Der Abbau nativer Peptide erfolgt jedoch nur in Anwesenheit der ATPasen.

Die Aufgaben der LON-Protease sind sehr vielfältig. So ist sie am Abbau fehlgefalteter, nicht-assemblierter und oxidativ geschädigter Proteine beteiligt (Bota & Davies 2002; Major et al. 2006). Dabei spielt die Integrität der prosthetischen Gruppen der Proteine, wie z.B. die der Fe-S-Zentren, und deren Effekt auf die Tertiärstruktur der Proteine eine wichtige Rolle für den Abbau durch die LON-Protease. Darüber hinaus ist die LON-Protease durch ihre Chaperonaktivität an der Assemblierung mitochondrialer Proteinkomplexe beteiligt (Rep et al. 1996). Außerdem reguliert sie die Expression mitochondrialer Gene

und trägt zur Integrität der mtDNA bei, weshalb der Verlust von *Pim1*, des Homologs der LON-Protease in *Saccharomyces cerevisiae*, zu einem atemungsdefizienten Phänotyp führt (Suzuki et al. 1994; van Dyck et al. 1998).

Dagegen ist über die biologische Funktion der eukaryotischen CLPXP-Protease relativ wenig bekannt. In Säugern und in *C. elegans* ist die CLPXP-Protease an der mitochondrialen ungefalteten Proteinantwort („*mitochondrial unfolded protein response*“, UPR<sup>mt</sup>) beteiligt (Zhao et al. 2002; Haynes et al. 2007).

Bei der UPR<sup>mt</sup> handelt es sich um eine Stressantwort, die durch das zunehmende Ungleichgewicht zwischen fehlgefalteten Proteinen und der Menge an Chaperonen und Proteasen ausgelöst wird (Haynes et al. 2007). Dies führt zur verstärkten Expression der Chaperone und Proteasen, wodurch die mitochondriale Homöostase wiederhergestellt wird.

Dabei baut die CLPXP-Protease vermutlich ungefaltete, akkumulierte Proteine in der mitochondrialen Matrix ab und generiert so Signalpeptide, die durch einen Peptid-Transporter aus den Mitochondrien ins Cytosol gelangen und als Signal für den Zellkern dienen (Haynes et al. 2007). Darüber hinaus wurde die CLPP-Protease mit den neurodegenerativen Erkrankungen HSP13 (vgl. 1.1) und Friedreich-Ataxie (FRDA) in Verbindung gebracht (Hansen et al. 2008; Guillon et al. 2009).

FRDA ist eine autosomal rezessive neurodegenerative Erkrankung, die durch eine fortschreitende Störung der Bewegungskoordination (Ataxie), Kardiomyopathien und einer zunehmenden Diabetezhäufigkeit charakterisiert ist (Puccio & Koenig 2002).

FRDA wird durch stark verminderte Mengen des mitochondrialen Proteins Frataxin hervorgerufen, welches als Eisen-Donor an der Biosynthese von Fe-S-Zentren beteiligt ist (Martelli et al. 2007; Guillon et al. 2009). In einem FRDA-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Deletion von Frataxin zu einer progressiven Zunahme der Proteinmengen der LON- und der CLPP-Protease, sowie deren Aktivitäten in den Mitochondrien der Mäuse führt (Guillon et al. 2009). Da bei der CLPP-Protease die mRNA-Menge unverändert bleibt, scheint die zunehmende Proteinmenge anders als bei der UPR<sup>mt</sup> post-translational reguliert zu werden. Gleichzeitig nimmt die Menge an mitochondrialen Fe-S-Proteinen immer weiter ab. Bereits in *Chlamydomonas reinhardtii* konnte gezeigt werden, dass das Rieske-Protein des an der Photosynthese beteiligten Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplexes ein potenzielles Substrat der CLPP-Protease der Chloroplasten darstellt (Majeran et al. 2000). Da das Rieske-Protein, welches auch Bestandteil des homologen Cytochrom *bc<sub>1</sub>*-Komplexes (Komplex III) der mitochondrialen Atmungskette ist, ebenfalls ein 2Fe-2S-Zentrum besitzt, wäre es denkbar, dass Fe-S-Proteine mögliche Substrate der LON- und CLPP-Protease darstellen (Guillon et al. 2009).

## 1.4 Die membrangebundenen Proteasen

Die in der inneren Mitochondrienmembran verankerten i-AAA und m-AAA Proteasen sind homolog zu bakteriellen AAA-Proteasen wie FtsH aus *Escherichia coli* (Juhola et al. 2000). Sowohl FtsH aus dem thermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* als auch die m-AAA Protease aus *S. cerevisiae* bilden ringförmige, hexamere Komplexe, sodass eine solche Struktur auch für die i-AAA Protease angenommen werden kann (Bieniossek et al. 2006; Lee et al. 2011). Wie auch bei der LON-Protease befindet sich die proteolytische Domäne C-terminal von der AAA-Domäne auf demselben Polypeptid (Leonhard et al. 1996; Hanson & Whiteheart 2005). Dabei weist die proteolytische Domäne die für Zink-abhängige Metallopeptidasen typische Sequenz HExxH auf, wobei x jede Aminosäure sein kann (Rawlings & Barrett 1993; Leonhard et al. 1996). Während die beiden Histidinreste (H) das Zink-Ion ( $Zn^{2+}$ ) koordinieren, ist der Glutaminsäurerest (E) für die proteolytische Funktion zuständig (Bieniossek et al. 2006). Der Austausch von Glutaminsäure gegen Glutamin (Q) führt zur Inaktivierung der Proteaseaktivität (Arlt et al. 1996; Guélin et al. 1996).

In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die durch Chelatoren inhibierte proteolytische Aktivität der m-AAA Protease in Gegenwart von zweiwertigen Ionen wie  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Mg^{2+}$  fast vollständig wiederhergestellt werden kann (Pajic et al. 1994). Dagegen erreichte die m-AAA Protease unter den Versuchsbedingungen nach Zugabe von  $Zn^{2+}$  nur etwa die Hälfte der möglichen Aktivität verglichen mit der Kontrolle. Mit  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  war so gut wie keine proteolytische Aktivität messbar. Dies zeigt, dass zweiwertige Metallionen in der Matrix vorhanden sein müssen.

Die N-terminale Domäne der i-AAA und m-AAA Protease ist dagegen nur gering konserviert und enthält eine oder zwei transmembrane Bereiche (Leonhard et al. 1996). Dadurch unterscheiden sich die AAA-Proteasen in ihrer Topologie in den Mitochondrien. Bei der i-AAA Protease ragt der N-Terminus in die Matrix, während sich der C-terminale Bereich mit der AAA- und der proteolytischen Domäne im Intermembranraum befindet (Leonhard et al. 1996). Dagegen besitzen die m-AAA Protease und FtsH zwei transmembrane Domänen, wodurch sowohl der N- als auch der C-Terminus in der Matrix bzw. im Zellinneren lokalisiert sind (Tomoyasu et al. 1993; Arlt et al. 1996).

AAA-Proteasen spielen eine bedeutende Rolle beim Abbau membrangebundener Proteine (Langer 2000). Der Abbau von Membranproteinen ist ein wichtiger, jedoch energetisch ungünstiger Prozess, da die Proteolyse der hydrophoben Bereiche der Proteine in einem hydrophilen Umfeld erfolgt (Lilley et al. 2003). Bei Membranproteinen, bei denen Teile auf beiden Seiten auch außerhalb der Membran in verschiedenen Kompartimenten vorliegen, tritt zusätzlich ein topologisches Problem auf, da die hydrophilen Bereiche des Proteins ebenfalls die Membran durchqueren müssen, um abgebaut zu werden (Langer 2000). Mit Hilfe von Modellproteinen konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass die i-AAA und die m-AAA Protease teilweise überlappende Substratspezifitäten aufweisen (Leonhard et

al. 2000). Durch die Chaperon-ähnlichen Eigenschaften der beiden AAA-Proteasen können diese den Faltungszustand der hydrophilen Domänen der Membranproteine erkennen. Liegen diese auf beiden Seiten der Membran ungefaltet vor, so können die beiden AAA-Proteasen die transmembrane Domäne sowie die hydrophilen Proteinteile durch die Lipiddoppelschicht transportieren und abbauen. Die Topologie des Membranproteins entscheidet, von welcher Protease es abgebaut wird. Damit die beiden Proteasen ihre Substrate binden können, benötigen sie jedoch ein Segment von mindestens 20 Aminosäuren, das aus der Membran herausragt, da die i-AAA und die m-AAA Protease ihre Substratproteine nahe der Membranoberfläche erkennen und binden. Wie genau die Proteine die innere Mitochondrienmembran durchqueren ist jedoch noch unklar.

Die Deletion beider Proteasen ist in *S. cerevisiae* nicht möglich, was darauf hindeutet, dass auch *in-vivo* Substrate existieren, die sowohl von der i-AAA als auch von der m-AAA Protease abgebaut werden können (Lemaire et al. 2000; Leonhard et al. 2000). Möglicherweise führt der fehlende Abbau dieser Substrate zu deren Akkumulation, die für die Zellen tödlich ist.

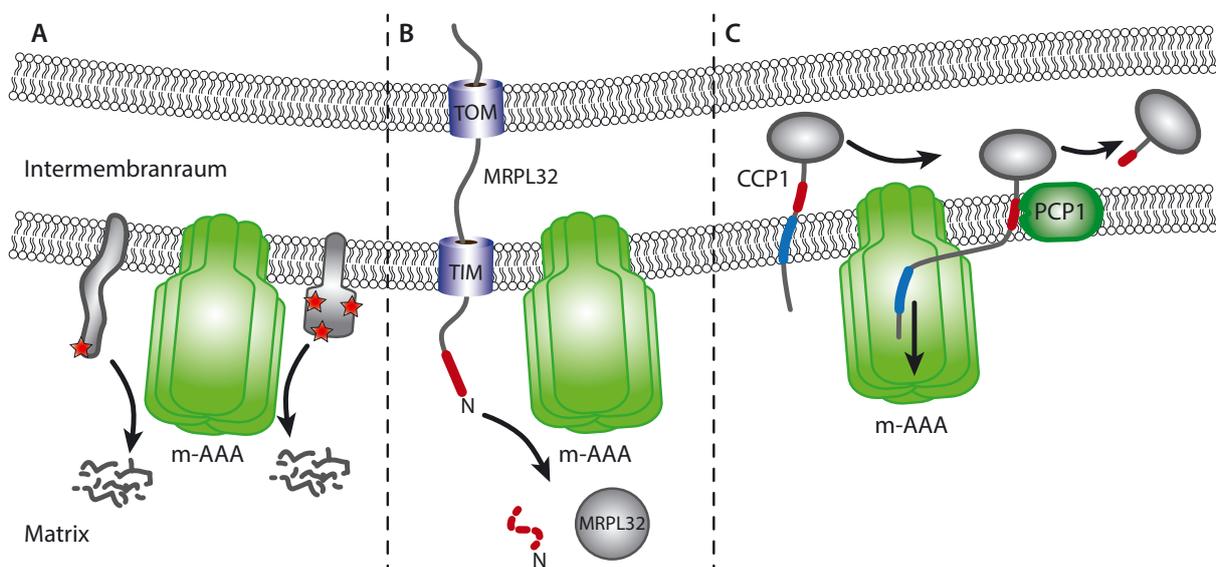
Die Peptide, die durch die Proteolyse der beiden AAA-Proteasen generiert werden, werden aus den Mitochondrien freigesetzt und ermöglichen die Kommunikation der Mitochondrien mit ihrer zellulären Umgebung (Young et al. 2001). Die von der m-AAA Protease freigesetzten Peptide können durch den ABC-Transporter MDL1 aktiv durch die innere Membran in den Intermembranraum transportiert werden. Von dort können die Peptide aus der Matrix sowie die von der i-AAA Protease abgebauten Peptide, die sich bereits im Intermembranraum befinden, die äußere Membran vermutlich durch passive Diffusion durch den Anionenkanal Porin oder den TOM-Komplex durchqueren (Young et al. 2001).

#### **1.4.1 Die m-AAA Protease**

In *S. cerevisiae* besteht die m-AAA Protease aus einem hetero-oligomeren Komplex zweier nah verwandter Proteine, YTA10 (AFG3) und YTA12 (RCA1), deren Assemblierung ATP-abhängig ist (Arlt et al. 1996). Dieser Komplex assembliert wiederum mit den Prohibitinen PHB1 und PHB2 zu einem hochmolekularen Komplex, dessen proteolytische Aktivität durch die Prohibitine reguliert wird (Steglich et al. 1999). Der Verlust einer der beiden Proteaseuntereinheiten bzw. die Expression proteolytisch inaktiver Varianten der beiden Untereinheiten führt zu ähnlichen Phänotypen (Guélin et al. 1994; Tauer et al. 1994; Tzagoloff et al. 1994; Paul & Tzagoloff 1995; Arlt et al. 1998). Dazu gehören verlangsamtes Wachstum, der Verlust der respiratorischen Kompetenz, der Mangel an assemblierten Atmungskettenkomplexen und die verzögerte Assemblierung der  $F_1$ -ATPase. Der YTA10-YTA12-Komplex ist am Abbau nicht- oder unvollständig assemblierter mitochondrialer Proteine beteiligt (Abb. 3A), zu denen die Untereinheit COB von Komplex III, die Untereinheiten COX1 und COX3 von Komplex IV, sowie die

Untereinheiten SU6, SU8 und SU9 der  $F_0$ -ATPase gehören (Pajic et al. 1994; Arlt et al. 1996; Guélin et al. 1996).

Ein Grund für die mangelnde Assemblierung von Komplex III und IV beim Verlust von YTA10 oder YTA12 ist deren Bedeutung für die Expression der Intron-enthaltenden mitochondrialen Gene *Cox1* und *Cob* (Arlt et al. 1998). Die Mengen der reifen *Cox1*- und *Cob*-Transkripte sind in Abwesenheit der m-AAA Protease deutlich reduziert. Das Spleißen dieser Introns hängt von RNA-Maturasen ab, die in den Introns kodiert sind, und von der mitochondrialen Translation, an deren Regulation die m-AAA Protease ebenfalls beteiligt ist (Nolden et al. 2005). Neben der Funktion der Qualitätskontrolle konnte gezeigt werden, dass der YTA10-YTA12-Komplex an der Prozessierung des Kern-kodierten Proteins MRPL32, einer Untereinheit der 54S-Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen, beteiligt ist (Abb. 3B). Das Vorläuferprotein wird durch den YTA10-YTA12-Komplex zum reifen Protein prozessiert, welches in den Ribosomenkomplex assembliert werden kann. Der komplette Abbau von MRPL32 wird dabei durch eine eng gefaltete, Cystein-reiche Domäne innerhalb des Proteins unterbrochen (Bonn et al. 2011). Somit ist die mitochondriale Proteinsynthese unter der proteolytischen Kontrolle der m-AAA Protease (Nolden et al. 2005).



**Abb. 3: Aufgaben der m-AAA Protease YTA10-YTA12.** (A) Fehlgefaltete bzw. geschädigte (roter Stern) Membranproteine (grau) werden nach deren Dislokation aus der inneren Membran von der m-AAA Protease abgebaut. (B) Die m-AAA Protease vermittelt die Prozessierung von neu importiertem MRPL32, einer Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen, und ermöglicht so dessen Assemblierung ins Ribosom. (C) Die m-AAA Protease ist an der Reifung des Radikalfängers CCP1 beteiligt. CCP1 wird durch ein hydrophobes Sortiersignal (blau) in die innere Membran eingefügt. Die m-AAA Protease kann dieses hydrophobe Segment unter ATP-Verbrauch aus der Membran entfernen, wodurch die Prozessierung durch PCP1 ermöglicht wird (modifiziert nach Nolden et al. 2005 und Tatsuta et al. 2007).

Darüber hinaus ist der YTA10-YTA12-Komplex an der Reifung der Cytochrom *c*-Peroxidase (CCP1) beteiligt, einem Häm-bindenden Radikalfänger im Intermembranraum (Esser et al. 2002; Tatsuta et al. 2007). CCP1 besitzt eine zweigeteilte Signalsequenz, die aus einem hydrophoben Sortiersignal und einem Prozessierungssignal besteht (Abb. 3C). Durch das hydrophobe Sortiersignal wird der N-terminale Bereich von neu importiertem CCP1 in die innere Mitochondrienmembran eingefügt. Die m-AAA Protease vermittelt daraufhin die ATP-abhängige Dislokation des hydrophoben Segments aus der Membran, wodurch das Prozessierungssignal für die Rhomboid-Protease PCP1 zugänglich wird (Tatsuta et al. 2007). Anders als bei MRPL32 ist die Reifung von CCP1 unabhängig von der proteolytischen Funktion der m-AAA Protease. Die ATPase-Aktivität der m-AAA Protease ist dagegen unerlässlich, da die Dislokation von CCP1 aus der Membran zusätzlichen ATP-Verbrauch erfordert.

Gegenüber der m-AAA Protease aus Hefe ist über die aus *Neurospora crassa* bisher nicht viel bekannt. Sie besteht aus einem homo-oligomeren Komplex aus MAP-1-Untereinheiten und bildet einen zur Matrix orientierten hochmolekularen Komplex in der inneren Membran (Klanner et al. 2001).

Auch in Pflanzen wurden ebenfalls m-AAA Protease-Komplexe identifiziert (Kolodziejczak et al. 2007). In *Arabidopsis thaliana* existieren zwei Untereinheiten der m-AAA Protease, AtFtsH3 und AtFtsH10 (Kolodziejczak et al. 2007). Diese können sowohl homo- als auch hetero-oligomere Komplexe bilden, die mit Prohibitinen assemblieren und von diesen stabilisiert werden (Piechota et al. 2010). Der Verlust von AtFtsH3 oder AtFtsH10 beeinflusst die Atmungskettenkomplexe und führt zu reduzierten Aktivitäten und Proteinmengen von Komplex I und V (Kolodziejczak et al. 2007). Dies deutet darauf hin, dass die m-AAA Protease an der Assemblierung bzw. Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe beteiligt ist. Dementsprechend führt die Expression von AtFtsH3 oder AtFtsH10 in *Yta10*- und/oder *Yta12*-defizienten Hefezellen zur Wiederherstellung der Atmungskompetenz der Hefezellen (Piechota et al. 2010).

In Säugern konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sowohl die humane als auch die murine m-AAA Protease aus homo- oder hetero-oligomeren Komplexen besteht (Koppen et al. 2007). Während die homo-oligomeren Komplexe aus AFG3L2 und AFG3L1 bestehen, sind die hetero-oligomeren Komplexe aus Paraplegin und AFG3L2 oder AFG3L1 zusammengesetzt. AFG3L1 konnte bisher nur in murinen Mitochondrien nachgewiesen werden und stellt im Menschen ein Pseudogen dar (Kremmidiotis et al. 2001).

Obwohl viele Funktionen der m-AAA Protease sehr konserviert sind, hat der Verlust von Paraplegin gewebespezifische Konsequenzen und führt zu einer Form von hereditärer spastischer Paraplegie, SPG7 (vgl. 1.1). Normalerweise existieren in Mitochondrien des Gehirns von Wildtyp-Mäusen zwei unterschiedliche Komplexe der m-AAA Protease, der AFG3L2-Paraplegin-Komplex und weniger abun-

dante Komplexe aus AFG3L1, die AFG3L2, Paraplegin oder beides enthalten (Koppen et al. 2007). In *Paraplegin*-defizienten Mäusen (*Spg7*<sup>-/-</sup>) sind dagegen hauptsächlich AFG3L2- und seltener AFG3L1-AFG3L2-Komplexe nachweisbar. Der Verlust von Paraplegin führt somit zu einer Änderung des Aufbaus der m-AAA Protease. Dementsprechend konnten in Fibroblasten von SPG7-Patienten homo-oligomere AFG3L2-Komplexe nachgewiesen werden. Diese haben möglicherweise andere Substratspezifitäten als Paraplegin-haltige Komplexe, wodurch die Funktion der Mitochondrien gewebespezifisch gestört und die Degeneration des Axons ausgelöst wird (Nolden et al. 2005).

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch der Funktionsverlust von AFG3L2 zu einer autosomal dominanten neurodegenerativen Erkrankung führt, der spinozerebellären Ataxie (SCA; Cagnoli et al. 2006; Di Bella et al. 2010).

Autosomal dominante spinozerebelläre Ataxien (SCAs) sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe von neurologischen Funktionsstörungen, die durch die progressive Degeneration des Cerebellums durch den Verlust der Purkinje-Zellen, der größten Neuronen des Cerebellums, hervorgerufen werden. Das Cerebellum ist für die unbewusste Koordination von Bewegungen zuständig, weshalb dessen Degeneration mit Störungen der Bewegungskoordination (Ataxie), abnormalen Hand- und Augenbewegungen und Sprachschwierigkeiten begleitet wird.

Dabei wurden in einer Familie fünf „*missense*“-Mutationen identifiziert, die die proteolytische Aktivität der m-AAA Protease beeinflussen und zu SCA28 führen (Di Bella et al. 2010). Im humanen und im murinen Cerebellum werden *Afg3l2* und *Paraplegin* hauptsächlich in Purkinje-Zellen exprimiert. In Motoneuronen überwiegt die Expression von *Paraplegin* relativ zu der von *Afg3l2*. Obwohl die Proteinmengen von AFG3L2 und Paraplegin in Lymphoblasten der betroffenen Patienten unverändert sind und auch Komplexe bilden können, haben die Mutationen vermutlich Auswirkungen auf die Struktur des Komplexes der m-AAA Protease. Da sich die Stärke des Einflusses der verschiedenen Mutationen unterscheidet, führt die Assemblierung der verschiedenen AFG3L2-Varianten mit normalem AFG3L2 bzw. Paraplegin zu unterschiedlich starken Ausprägungen der Effekte der Mutation, was sich in der variablen Penetranz und Expressivität in der betroffenen Familie spiegelt.

Insgesamt unterstützen die Beobachtungen die Hypothese, dass sich die Substratspezifität homo- und hetero-oligomerer AFG3L2-Komplexe unterscheidet (Koppen et al. 2007; Di Bella et al. 2010). Darüber hinaus sind auch die unterschiedlichen Phänotypen von SCA28 und SPG7 mit der unterschiedlichen Verteilung von AFG3L2 und Paraplegin vereinbar. Während bei SCA28 durch die Mutation von AFG3L2 hauptsächlich das Cerebellum betroffen ist, führt der Funktionsverlust von Paraplegin zur Degeneration der Motoneurone.

Anders als beim Menschen hat die Mutation von *Afg3l2* bei zwei zufällig entdeckten Mausmodellen einen deutlich schwereren Phänotyp (Maltecca et al. 2008; Di Bella et al. 2010). Während sich heterozygote Mäuse im Aussehen nicht vom Wildtyp unterscheiden, sind ihre homozygoten Geschwister bereits eine Woche nach der Geburt deutlich kleiner. Durch die beeinträchtigte Entwicklung der Axone und die reduzierte Myelinisierung haben die homozygoten Mäuse zunehmend Schwierigkeiten bei der Koordination der Bewegung. Dies beginnt bei den Hinterbeinen und setzt sich weiter fort. Insgesamt werden sie selten älter als 16 Tage und sind zuletzt komplett paralysiert. Anders als bei SCA28 ist AFG3L2 in den beiden Modellen jedoch komplett inaktiviert. Der Phänotyp dieser Mäuse sowie das Fehlen von AFG3L1 beim Menschen lassen vermuten, dass der Verlust von AFG3L2 beim Menschen embryonal letal ist (Di Bella et al. 2010). Allerdings unterstreichen diese Beobachtungen die große Bedeutung der m-AAA Protease in Neuronen.

#### **1.4.2 Die i-AAA Protease**

Obwohl der Verlust der i-AAA Protease in den bisher untersuchten Organismen eine Vielzahl an Phänotypen verursacht, ist ihre zelluläre Funktion bisher kaum verstanden. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten Befunde zu i-AAA Proteasen in den bisher untersuchten Organismen und die Auswirkungen des Verlusts bzw. der Herunterregulierung der i-AAA Protease.

##### **1.4.2.1 *Saccharomyces cerevisiae***

Die i-AAA Protease aus *S. cerevisiae* stellt die bisher am besten untersuchte i-AAA Protease dar. Der Komplex besteht aus homo-oligomeren Untereinheiten von YME1 („*yeast mitochondrial DNA escape*“; YTA11; OSD1), die mit den Adapterproteinen MGR1 und MGR3 interagieren (Thorsness & Fox 1993; Nakai et al. 1995; Leonhard et al. 1999; Dunn et al. 2006; Dunn et al. 2008). MGR1 und MGR3 bilden dabei einen Adapterkomplex, der vermutlich für die Bindung der i-AAA Protease an ihre Substrate notwendig ist. Auch bei der i-AAA Protease treten bei Verlust der proteolytischen Aktivität ähnliche Phänotypen auf wie bei der Deletion des Gens (Weber et al. 1996).

Der Verlust von *Yme1* führt zu pleiotropen Phänotypen, die auf eine gestörte mitochondriale Funktion hindeuten. Das Wachstum *Yme1*-defizienter Stämme ist mtDNA-abhängig und wird durch deren Verlust bzw. Deletion erheblich beeinträchtigt (Thorsness et al. 1993). Darüber hinaus weisen die Stämme bei Hitze eine verminderte respiratorische Aktivität auf und können bei Kälte auf fermentierbaren Medien nur langsam wachsen (Thorsness & Fox 1993). Der Verlust von YME1 wirkt sich auch auf die Morphologie der Mitochondrien aus (Campbell et al. 1994). Statt eines filamentösen Netzwerks enthalten die Zellen stark verkürzte, globuläre Mitochondrien. Diese befinden sich häufig in der Nähe der

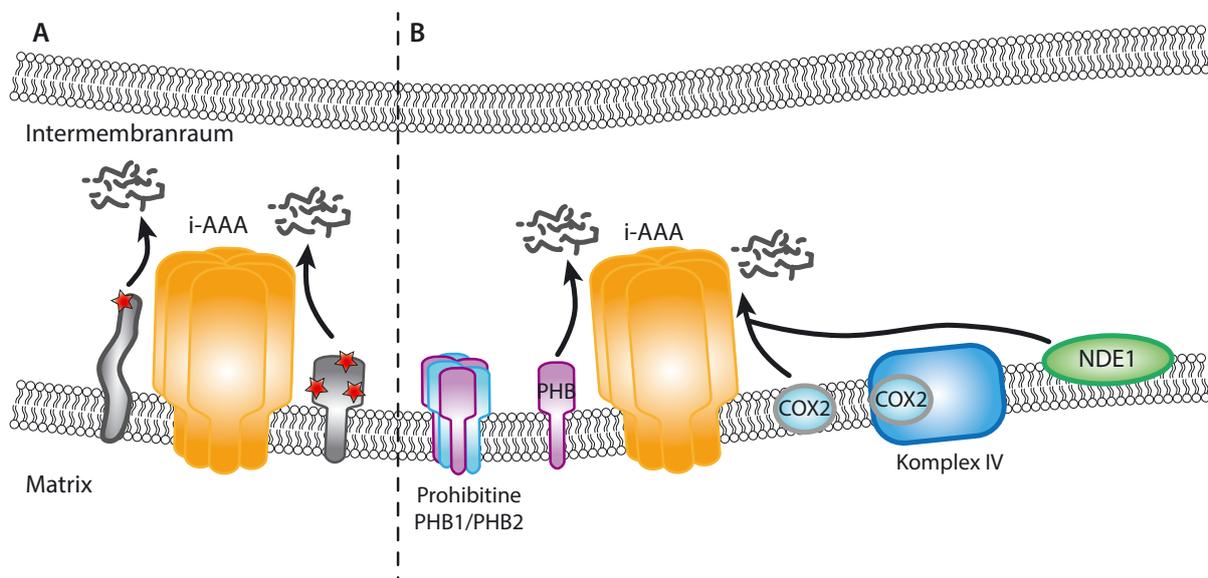
**Tabelle 1: Auswirkungen des Verlusts der i-AAA Protease.** Übersicht über die Folgen des Verlusts bzw. der Herunterregulierung der i-AAA Protease für den betroffenen Organismus.

	<i>S. cerevisiae</i>		<i>N. crassa</i>		<i>C. elegans</i>		<i>A. thaliana</i>		<i>H. sapiens</i>	
Name	YME1, YTA11, OSD1	IAP-1	YME1-1	AtFtsH4	YME1L, YME1L1	homo-oligomer	homo-oligomer	homo-oligomer	homo-oligomer	
Komplex	homo-oligomer	homo-oligomer	-	-	-	SB: normal 40°C: respiratorisches Wachstum reduziert 12°C: normal Wachstum	LT: normal KT: Veränderungen in Morphologie und Ent- wicklung	am höchsten in Samen KT: steigt mit Alter an LT: bleibt konstant	reduziert	
Wachstum	SB: normal (mtDNA- abhängig) 37°C: kein respiratorisches Wachstum 14°C: kein fermentatives Wachstum	SB: normal 40°C: respiratorisches Wachstum reduziert 12°C: normal Wachstum	-	-	-	-	-	-	-	
Transkription der i-AAA Protease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Einfluss von Stress auf Expression der i-AAA Protease	42°C <sup>4</sup> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	
Chaperonaktivität	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	
UPR <sup>mt</sup>	-	-	nicht beteiligt	-	-	-	-	-	Promotorelemente vor- handen	
Lebensspanne	verkürzt	-	-	-	-	-	-	-	-	
mtDNA-Verlust	ja	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mitochondrienmorpho- logie	fragmentiert	filamentös	-	-	-	-	-	-	erhöhte Konnektivität, dann Fragmentierung	
Cristae-Morphologie	deutlich aufgequollenes Kompartiment	-	-	-	-	-	-	-	unstrukturiert	
Mitophagie	erhöht	-	-	-	-	-	-	-	-	
Atmungskettenkomplexe	Aktivitäten reduziert	-	-	-	-	-	-	-	Komplex I-Aktivität ver- mindert	
Auswirkung auf andere Proteine	COX2 <sup>1</sup> , PHB1 <sup>1</sup> , PBH2 <sup>1</sup> , NDE1 <sup>1</sup> TAZ1, ATP4, ATP5, ATP6, ATP7, ATP17, MCR1, MPM1	ScCOX2 <sup>4</sup> , ScPHB1 <sup>4</sup>	-	-	-	KT: ATP6 <sup>2</sup> , βF <sub>1</sub> <sup>2</sup> , PHB <sup>3</sup> , HSP70 <sup>6</sup> , POR <sup>3</sup> LT: ATP6 <sup>4</sup> , HSP70 <sup>3</sup> , PHB <sup>3</sup>	NDUF6 <sup>1</sup> , ND1 <sup>1</sup> , COX2 <sup>4</sup> , COX4 <sup>1</sup> , OPA1-UE, PARP <sup>1</sup> , PHB1 <sup>4</sup>			
Auswirkung auf Transkrip- tion	vor allem Gene der mito- chondrialen Genexpres- sion <sup>1</sup>	-	-	-	-	KT: <i>Atp6</i> <sup>1</sup> , <i>Phb2</i> <sup>3</sup> , <i>Phb3</i> <sup>3</sup> , <i>Phb6</i> <sup>3</sup>	<i>Atp6</i> <sup>1</sup>			
Carbonylierung	-	-	-	-	-	KT: erhöht LT: unverändert	nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Zugabe erhöht			

SB Standardbedingungen    LT Langtag    KT Kurztag    <sup>1</sup> erhöht    <sup>2</sup> reduziert    <sup>3</sup> unter bestimmten Bedingungen erhöht    <sup>4</sup> nicht verändert    - nicht untersucht

Vakuolen, was auf eine erhöhte Mitophagie hindeutet (Campbell & Thorsness 1998; Tolkovsky 2009). Eine erhöhte Mitophagierate *Yme1*-defizienter Stämme konnte besonders beim Wachstum auf nicht-fermentierbaren Medien gezeigt werden, bei dem der Vakuolen-abhängige mitochondriale Abbau deutlich höher ist als beim Wildstamm (Campbell & Thorsness 1998). Interessanterweise wird gleichzeitig auch der Transfer von mtDNA in den Kern erhöht, was vermutlich durch den gesteigerten Abbau der Mitochondrien ausgelöst wird (Thorsness et al. 1993; Campbell & Thorsness 1998). Darüber hinaus hat der Verlust von YME1 Einfluss auf die chronologische Lebensspanne der Zellen und verkürzt diese verglichen mit dem Wildstamm (Francis et al. 2007; Palermo et al. 2007).

Die Vielzahl der mit dem Verlust von *Yme1* verknüpften Phänotypen zeigen, dass die i-AAA Protease eine wichtige Rolle für die Zelle spielt. Trotzdem ist ihre zelluläre Funktion immer noch kaum verstanden (Engmann 2009; Francis & Thorsness 2011). Ähnlich wie die m-AAA Protease ist YME1 am Abbau geschädigter Membranproteine beteiligt (Abb. 4A). Zu den bei *S. cerevisiae* identifizierten endogenen Substraten gehören neben der nicht-assemblierten Untereinheit 2 (COX2) von Komplex IV die Prohibitine PHB1 und PHB2 und die externe NADH-Dehydrogenase NDE1, die alle in der inneren Membran verankert sind und in Abwesenheit von YME1 akkumulieren (Abb. 4B; Pearce & Sherman 1995; Nakai et al. 1995; Augustin et al. 2005; Kambacheld et al. 2005; Gräf 2006). Jedoch können sowohl COX2 als auch die Prohibitine zusätzlich von anderen Peptidasen abgebaut werden (Pearce & Sherman 1995; Kambacheld et al. 2005).



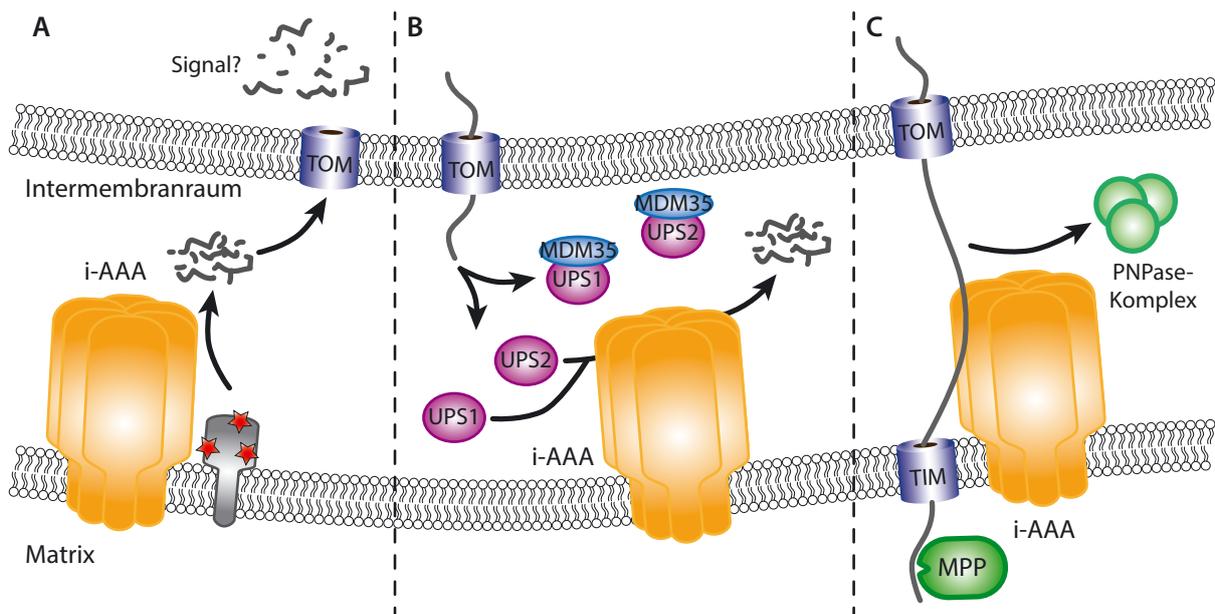
**Abb. 4: Aufgaben der i-AAA Protease YME1.** (A) Wie die m-AAA Protease baut auch die i-AAA Protease fehlgefaltete bzw. geschädigte (roter Stern) Membranproteine (grau) aus der inneren Membran ab. (B) Zu den bisher bekannten Substraten der i-AAA Protease YME1 gehören nicht-assemblierte COX2-Untereinheiten, die Prohibitine PHB1 und PHB2 und NDE1 der externen NADH-Dehydrogenase.

Der Verlust von YME1 beeinflusst auch die Aktivität der Atmungskettenkomplexe. Bereits unter Standardbedingungen, bei denen die Deletionsstämme normales Wachstum zeigen, ist die Aktivität von Komplex IV deutlich reduziert (Nakai et al. 1995; Lemaire et al. 2000). Hitze verstärkt diesen Effekt weiter und führt zusätzlich zur Verminderung der Aktivitäten der Komplexe II und III (Nakai et al. 1995). Zusätzlich ist der Sauerstoffverbrauch bei Hitze in *Yme1*-defizienten Zellen reduziert (Campbell & Thorsness 1998). Darüber hinaus ist auch die Komplex V-Aktivität beeinträchtigt (Lemaire et al. 2000; Kominsky et al. 2002). Dies erfolgt vermutlich durch die Regulation der Stabilität eines Inhibitors der  $F_1$ -ATPase durch YME1 (Lemaire et al. 2000). Dadurch wird in Abwesenheit der i-AAA Protease die Enzymaktivität von Komplex V inhibiert. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die Untereinheiten ATP4, ATP5, ATP6, ATP7 und ATP17 der membrangebundenen  $F_0$ -ATPase-Untereinheit möglicherweise YME1-abhängig abgebaut werden.

Komplex IV und YME1 spielen bei der mitochondrialen Fusion eine wichtige Rolle (Hori et al. 2011). So konnte gezeigt werden, dass während der Fusion von Mitochondrien ein Komplex IV-Monomer vom Superkomplex  $III_2IV_2$  dissoziiert. Dies führt zu einer vorübergehenden Reduktion der Menge an Komplex IV-Untereinheiten, die YME1-abhängig abgebaut werden. Dadurch kommt es zu einer vermehrten ROS-Produktion, die wiederum zur Replikation der mtDNA führt. Dadurch wird sichergestellt, dass die mtDNA zwischen den Mitochondrien verteilt werden kann und keine mtDNA-freien Mitochondrien entstehen.

Die Peptide, die durch YME1 freigesetzt werden, besitzen vermutlich eine Funktion in der retrograden Antwort an den Zellkern (Abb. 5A; Young et al. 2001; Augustin et al. 2005; Kambachel et al. 2005; Arnold et al. 2006a). Fehlen diese Peptide durch die Deletion von *Yme1*, so dient dies als Signal über den Funktionszustand der Atmungskette, deren Aktivität in *Yme1*-defizienten Stämmen reduziert ist (Thorsness & Fox 1993; Nakai et al. 1995). Diese Signale führen wiederum zur Induktion von Genen, die an der mitochondrialen Genexpression beteiligt sind (Arnold et al. 2006a). Die Gene kodieren sowohl für Proteine mit Aufgaben in der mitochondrialen Translation als auch in der Biosynthese von Atmungskettenkomplexen. Interessanterweise gehören die in der Abwesenheit von *Yme1* aktivierten Gene zu einem funktionalen Regulon, das die mitochondriale Genexpression und die Biosynthese der Atmungskette kontrolliert (Lascaris et al. 2003). Dadurch kann die Genexpression an die Aktivität der Atmungskette angepasst werden. In *Yme1*-defizienten Zellen scheint vor allem der Zustand von Komplex V ausschlaggebend zu sein.

Als weitere Funktion der i-AAA Protease häufen sich Hinweise auf eine Beteiligung am Lipid-Metabolismus der Mitochondrien (Anand et al. 2012). Bereits die veränderte Mitochondrienmorphologie *Yme1*-defizienter Zellen ließ die Vermutung aufkommen, dass die Akkumulation unvollständig prozessierter oder assemblierter Proteine das Protein/Lipid-Verhältnis der mitochondrialen Membran stört, wodurch deren Fluidität beeinflusst wird (Campbell & Thorsness 1998). Tatsächlich führt der Verlust von



**Abb. 5: Weitere Aufgaben der i-AAA Protease YME1.** (A) Die von der i-AAA Protease beim Abbau von Proteinen (grau) freigesetzten Peptide gelangen durch Diffusion z.B. durch den TOM-Komplex ins Cytosol und dienen möglicherweise zur Kommunikation mit dem Zellkern. (B) Die i-AAA Protease ist am Abbau von UPS1 und UPS2 beteiligt. UPS1 und UPS2 regulieren die Akkumulation der Membranlipide Cardiolipin und Phosphatidylethanolamin und sind intrinsisch instabil. Durch die Assemblierung mit MDM35, einem Protein des Intermembranraums, werden sie vor dem Abbau durch die i-AAA Protease geschützt. (C) Der Import der humanen PNPase hängt von YME1 ab. Nach dem Import der PNPase wird sie durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase MPP prozessiert, worauf YME1 die PNPase in den Intermembranraum zieht. Dort assembliert sie in trimere Komplexe (modifiziert nach Arnold et al. 2006a, Rainey et al. 2006 und Potting et al. 2010).

YME1 zu einer gesteigerten Aktivität der mitochondrialen Phosphatidylserin-Decarboxylase (PSD1), die die Umwandlung von Phosphatidylserin (PS) zu Phosphatidylethanolamin (PE) katalysiert, und dadurch zu einer erhöhten Menge an PE, einer essenziellen Komponente mitochondrialer Membranen (Nebauer et al. 2007). Zusätzlich wird die Stabilität der ebenfalls am mitochondrialen Phospholipid-Metabolismus beteiligten Proteine UPS1 und UPS2 erhöht, die die Akkumulation von Cardiolipin (CL) und PE regulieren (Abb. 5B; Potting et al. 2010). UPS1 und UPS2 assemblieren normalerweise mit MDM35, einem Protein des Intermembranraums, wodurch sie vor dem Abbau durch YME1 geschützt werden. Darüber hinaus werden einige mutierte Formen von Tafazzin (TAZ1), welches am CL-Metabolismus beteiligt ist, YME1-abhängig abgebaut (Claypool et al. 2011). Auch die kurze Isoform MCR1 der mitochondrialen NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase sammelt sich in Abwesenheit von YME1 an (Engmann 2009). Das Flavoenzym NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase ist an der Ergosterol-Biosynthese beteiligt, einem pilzspezifischen Sterol, welches unter anderem in der inneren Mitochondrienmembran enthalten ist (Zinser et al. 1993; Lamb et al. 1999). Dies zeigt, dass die i-AAA Protease die Zusammensetzung der mitochondrialen Membran vermutlich auf vielfältige Weise beeinflussen kann (Anand et al. 2012).

Obwohl der Verlust von *Yme1* zu einem hitzesensitiven Phänotyp führt, konnte in einer Studie mit dem Wildstamm gezeigt werden, dass eine zweistündige Inkubation bei 42°C keinen Einfluss auf die Proteinmenge von YME1 hat (Bender et al. 2010). Dagegen wird das Homolog der LON-Protease PIM1 sowohl durch Hitze als auch in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hochreguliert.

Neben der proteolytischen Funktion von YME1 besitzt deren AAA-Domäne eine Chaperon-artige Aktivität, was mit Hilfe von membrangebundenen Modellproteinen gezeigt werden konnte (Leonhard et al. 1999). Die AAA-Domäne bindet dabei ungefaltete, exponierte Bereiche der Proteine und verhindert deren Aggregation. Einige Substrate konnten darüber hinaus durch YME1 rückgefaltet werden. Die Assoziierung von YME1 mit dem ungefalteten Polypeptid ist ATP-unabhängig, während zum Abbau des gebundenen Peptids ATP hydrolysiert werden muss. Dies bewirkt vermutlich die Freisetzung des mit der AAA-Domäne assoziierten Polypeptids und dessen Translokation in die proteolytische Kammer. Interessanterweise konnte für COX2 gezeigt werden, dass dieses unter bestimmten Bedingungen nicht von YME1 abgebaut wird, sondern dass YME1 als Chaperon an der Assemblierung von COX2 in Komplex IV beteiligt ist (Fiumera et al. 2009). Obwohl die Chaperonaktivität auch nach proteolytischer Inaktivierung von YME1 immer noch vorhanden ist, während Mutationen in den ATP-Binderegionen mit dem Verlust der proteolytischen Aktivität einhergehen, muss das Metallbindungsmotiv von YME1 bei der Assemblierung von COX2 intakt sein (Leonhard et al. 1999; Fiumera et al. 2009).

Eine weitere nicht-proteolytische Funktion von YME1 stellt die Translokation der heterolog exprimierten humanen Polynukleotidphosphorylase (PNPase) in den Intermembranraum von Mitochondrien von *S. cerevisiae* dar (Abb. 5C; Rainey et al. 2006). Die PNPase wird in die Mitochondrien importiert und von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase geschnitten, worauf YME1 die PNPase in den Intermembranraum zieht. Obwohl die i-AAA Protease die PNPase weder prozessieren noch abbauen kann, wird die proteolytische Aktivität von YME1 benötigt. Ob die i-AAA Protease bei diesem Import eine ähnliche Rolle wie die m-AAA Protease bei der Translokation von CCP1 spielt (vgl. 1.4.1), ist jedoch noch unklar.

Insgesamt scheint der Verlust von YME1 eher nachteilig für *S. cerevisiae* zu sein, was die Bedeutung der i-AAA Protease für die Zellen unterstreicht.

#### **1.4.2.2 *Neurospora crassa***

In dem filamentösen Pilz *N. crassa* ist die i-AAA Protease ebenfalls aus einem homo-oligomeren Komplex aus IAP-1-Untereinheiten aufgebaut und bildet ATP-abhängig einen hochmolekularen Komplex in der inneren Membran (IAP-1: i-AAA Protease; Klanner et al. 2001). Dieser kann in der inneren Membran verankerte Modellproteine abbauen, deren fehlgefaltete Domänen in den Intermembranraum ragen. Die Genexpression eines durch „repeat induced point mutation“ (RIP) verkürzten Proteins, dem

sowohl die AAA- als auch die proteolytische Domäne fehlen, führt bei Hitze (40°C) ähnlich wie bei *S. cerevisiae* zum Verlust der Atmungskompetenz und einer verkürzten Wachstumsrate. Dagegen weicht die Wachstumsrate des *lap-1<sup>RIP</sup>*-Stamms weder bei 12°C noch bei 20°C bzw. bei Wachstum auf fermentierbaren Medien von der des Wildtyps ab. Der hitzesensitive Phänotyp kann durch die Expression des Wildtypgens wieder rückgängig gemacht werden. Die mitochondriale Morphologie und die Verteilung der Mitochondrien in den Hyphen des *lap-1<sup>RIP</sup>*-Stamms unterscheiden sich dagegen nicht von der des Wildstamms. Bei Komplementationsanalysen mit *S. cerevisiae* zeigte sich, dass verglichen mit YME1 nur wenig IAP-1 in die Hefe-Mitochondrien importiert wird, weshalb die mitochondriale Signalsequenz von YME1 mit der Sequenz von reifem IAP-1 fusioniert wurde. Dieses Fusionsprotein wird effizient in die Mitochondrien von *Yme1*-defizienten Zellen importiert und in die innere Membran inseriert. Dabei wird deutlich, dass die Funktionen von IAP-1 und YME1 zwar größtenteils konserviert, jedoch nicht identisch sind. So wird sowohl der kältesensitive Phänotyp als auch das mtDNA-abhängige Wachstum komplementiert (vgl. 1.4.2.1), das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Medien bei erhöhten Temperaturen kann jedoch nicht wiederhergestellt werden. Darüber hinaus werden statt der großen, runden Mitochondrien der *Yme1*-defizienten Zellen zwar viele kleine Mitochondrien sichtbar, ein Wildtyp-artiges Netzwerk kann dagegen nicht gebildet werden. Ein weiterer Unterschied besteht im Abbau von COX2 und PHB1, zwei Substraten von YME1, die von IAP-1 nicht abgebaut werden können (Klanner et al. 2001; Gräf et al. 2007). Versuche mit Hybridproteinen aus IAP-1 und YME1 zeigten, dass vor allem die geringfügigen Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der AAA-Domänen eine wichtige Rolle für die funktionellen Unterschiede der beiden i-AAA Proteasen spielen (Gräf et al. 2007). Dies zeigt, dass Unterschiede in den Funktionen der i-AAA Proteasen in den Mitochondrien der verschiedenen Organismen berücksichtigt werden müssen (Klanner et al. 2001).

#### **1.4.2.3 *Caenorhabditis elegans***

In *C. elegans* ist bisher wenig über die i-AAA Protease bekannt. So konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *Ymel-1* anders als die Deletion der CLPP-Protease keinen Einfluss auf die UPR<sup>mt</sup> hat (vgl. 1.3; Haynes et al. 2010). Dagegen nimmt die Bildung an  $\alpha$ -Synuclein-Einschlüssen durch den Verlust von *Ymel-1* zu (van Ham et al. 2008).  $\alpha$ -Synuclein-Einschlüsse sind beim Menschen typische Kennzeichen der Parkinson-Krankheit.

#### **1.4.2.4 *Arabidopsis thaliana***

Anders als Pilze und vielzellige Tiere weist das Genom von *A. thaliana* zwei zu *Yme1* aus *S. cerevisiae* homologe Sequenzen auf, *AtFtsH4* und *AtFtsH11* (Urantowka et al. 2005). *In-silico*-Analysen zeigten, dass Orthologe zu *AtFtsH4* und *AtFtsH11* in allen Mono- und Dikotyledonen existieren. Während *AtFtsH4*

in die Mitochondrien importiert wird, kann AtFtsH11 sowohl in den Mitochondrien als auch in Chloroplasten nachgewiesen werden. In den Mitochondrien bilden die beiden Untereinheiten der i-AAA Protease hochmolekulare homo-oligomere Komplexe. Trotz der Homologie zu *Yme1* kann weder *AtFtsH4* noch *AtFtsH11* den atmungsdefizienten Phänotyp *Yme1*-defizienter Hefezellen komplementieren. Da dies auch nach Fusion der beiden Proteine mit der mitochondrialen Signalsequenz von YME1 nicht möglich ist, scheinen die i-AAA Proteasen aus *A. thaliana* und *S. cerevisiae* unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen.

Der Verlust von *AtFtsH4* hat unter Langtagbedingungen (optimale Bedingungen) keinen Einfluss auf das Wachstum von *A. thaliana* (Gibala et al. 2009). Unter Kurztagbedingungen kommt es dagegen in der späten Phase der Rosettenentwicklung zu schwerwiegenden Veränderungen der Morphologie und der Entwicklung der Rosetten. Diese sind kleiner und die Blätter weisen unsymmetrische Formen mit unregelmäßig gezackten Blattspreiten auf. Während die Veränderungen in der Mesophyll-Differenzierung bereits früh sichtbar werden, treten die Abweichungen der Mitochondrien und Chloroplasten im Blattgewebe erst später in der Entwicklung auf. Die Mitochondrien enthalten wenige Cristae und die Matrix ist transparenter als beim Wildtyp und enthält unregelmäßig verteiltes, elektronendichtes Material. Ähnliche Aberrationen werden auch bei den Chloroplasten erkennbar. Dieser Verlauf stimmt mit der unter Kurztagbedingungen in Rosettenblättern des Wildtyps beobachteten Transkriptmenge von *AtFtsH4* überein, die im Laufe des Alterns der Pflanzen immer weiter ansteigt (Kicia et al. 2010). Unter Langtagbedingungen ist die Transkriptmenge in den Keimblättern vergleichbar mit der Menge unter Kurztagbedingungen, jedoch bleibt die Menge unter Langtagbedingungen relativ gleich.

In den verschiedenen Organen der Pflanzen ist die Transkriptmenge von *AtFtsH4* in den Samen am höchsten, und sowohl unter Lang- als auch unter Kurztagbedingungen ist die Keimung *AtFtsH4*-defizienter Samen verzögert (Gibala et al. 2009). Sobald die Keimblätter geöffnet sind, erfolgt die weitere Entwicklung der Keimlinge vergleichbar mit dem Wildtyp. Erst gegen Ende des vegetativen Wachstums werden die Unterschiede unter Kurztagbedingungen immer ausgeprägter. Die Blüte der Pflanzen erfolgt später und 85 % der Mutanten bilden keine Samen. Die Blätter der Mutanten weisen erhöhte ROS-Level und eine erhöhte Menge carbonylierter Proteine auf, was zeigt, dass die Mutanten mit zunehmendem Alter unter oxidativem Stress leiden. Dies wird möglicherweise durch die gestörte Funktion von Atmungskettenkomplexen ausgelöst, die in Abwesenheit von *AtFtsH4* beobachtet wurde (Kolodziejczak et al. 2007). Dabei sind sowohl die Aktivität als auch die Proteinmenge von Komplex V, sowie dessen Untereinheiten ATP6 und  $\beta F_1$ , reduziert. Dies deutet auf eine Rolle der i-AAA Protease bei der Assemblierung bzw. der Stabilisierung des Komplexes hin. Die nicht-assemblierten Untereinheiten werden vermutlich von der m-AAA Protease abgebaut. Da die Transkriptmenge von *Atp6* in den

Mutanten erhöht ist, unterstützt dies eine post-transkriptionelle Regulation der ATP6-Menge (Gibala et al. 2009). Darüber hinaus sind auch die Proteinmengen der Prohibitine und des Anionenkanals Porin erhöht. Bei den Prohibitinen wird dies auf Transkriptionsebene reguliert.

Unter Langtagbedingungen werden die Proteinmengen von Chaperonen wie HSP70 und der Prohibitine gegen Ende der vegetativen Phase erhöht, möglicherweise um den Verlust von AtFtsH4 zu kompensieren und die Akkumulation der carbonylierten Proteine zu verhindern (Gibala et al. 2009). Dies fehlt unter Kurztagbedingungen, unter denen die vegetative Phase verlängert ist und die Funktion der Mitochondrien aufgrund der längeren dunklen Phase von größerer Bedeutung ist.

Insgesamt wird deutlich, dass die i-AAA Protease besonders gegen Ende der vegetativen Phase eine wichtige Rolle spielt (Kicia et al. 2010). Dabei ist es denkbar, dass die Chaperonaktivität der i-AAA Protease die Fehlfaltung von Proteinen länger verhindert, wodurch diese weniger anfällig für oxidative Schädigung sind. Gleichzeitig ist die i-AAA Protease vermutlich am Abbau der oxidativ geschädigten Proteine beteiligt, sodass diese während des Alterns der Pflanzen nicht akkumulieren (Gibala et al. 2009). Durch die Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe wird die Dysfunktion der Mitochondrien verzögert, sodass die Zellfunktion und somit die Blattentwicklung ungestört verlaufen.

#### **1.4.2.5 *Homo sapiens***

Im menschlichen Genom ist ebenfalls ein Homolog von *Yme1* kodiert, *Yme1l* (*Yme1l1*; Coppola et al. 2000; Shah et al. 2000). Das Transkript von *Yme1l* ist in allen Geweben nachweisbar, die Menge ist jedoch im Herz und in Skelettmuskeln am höchsten (Coppola et al. 2000). Durch Expression von *Yme1l* in Primatenzellen konnte gezeigt werden, dass das Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist. Dies wurde durch die Fusion von *Yme1l* mit *Gfp* und die anschließende Expression in HeLa-Zellen bestätigt (Shah et al. 2000). Die Expression von *Yme1l* in *S. cerevisiae* zeigt, dass YME1L den hitzesensitiven Phänotyp *Yme1*-defizienter Stämme komplementieren kann, wobei die Hefestämme in Gegenwart von YME1L langsamer wachsen als die Wildstämme.

Sowohl in HeLa-Zellen als auch in embryonalen Maus-Fibroblasten („*mouse embryonic fibroblasts*“; MEF) ist YME1L an der konstitutiven Prozessierung von humanem OPA1 beteiligt (Griparic et al. 2007; Song et al. 2007; Guillery et al. 2008). Dies wurde jedoch für eine Reihe mitochondrialer Proteasen gezeigt, zu denen die Rhomboid-Protease PARL, die m-AAA Protease, die Serinprotease HTRA2 und die Metallopeptidase OMA1 gehören (Cipolat et al. 2006; Duvezin-Caubet et al. 2007; Ehses et al. 2009; Kieper et al. 2010). Die Analysen von Zelllinien, in denen jeweils nur eine Protease herunterreguliert wurde, unterstützen direkte Rollen dagegen nur für YME1L und die ATP-unabhängige Metallopeptida-

se OMA1. Während OMA1 für die Prozessierung an der S1-Schnittstelle zuständig ist, wird YME1L für die Prozessierung von S2 benötigt. Darüber hinaus konnte durch die Herunterregulierung von *Yme1l* zunächst eine erhöhte Konnektivität der Mitochondrien beobachtet werden, auf die eine zunehmende Fragmentierung der Mitochondrien folgte (Griparic et al. 2007).

Eine weitere Charakterisierung der Funktion von YME1L wurde kürzlich in menschlichen embryonalen Nierenzellen („*human embryonic kidney*“; HEK) durchgeführt (Stiburek et al. 2012). Dabei konnte gezeigt werden, dass YME1L als hochmolekularer Komplex in der inneren Mitochondrienmembran verankert ist. Die Menge dieser Komplexe unterscheidet sich zwischen verschiedenen Geweben. Durch die Herunterregulierung von *Yme1l* wird die Wachstumsrate der HEK-Zellen reduziert. Dies wird vermutlich sowohl durch die veränderte Aktivität der Atmungskette als auch durch die verminderte Resistenz gegen Apoptose verursacht. Durch die Abwesenheit von YME1L kommt es zur Akkumulation der Komplex I-Untereinheiten NDUFB6 und ND1, sowie der Komplex IV-Untereinheit COX4, die normalerweise von YME1L abgebaut werden. Neben der Aufgabe der Qualitätskontrolle scheint YME1L die Verfügbarkeit der Untereinheiten zur Assemblierung der Atmungskettenkomplexe zu kontrollieren. Durch die Herunterregulierung von *Yme1l* wird die Komplex I-Aktivität gestört, möglicherweise durch dessen Assemblierung mit defekten Untereinheiten, die sonst von YME1L abgebaut werden. Auch die Assemblierung von Komplex IV scheint durch die Verminderung der YME1L-Menge beeinflusst zu werden. Obwohl dessen Untereinheit COX2 durch die Herunterregulierung von *Yme1l* nicht stabilisiert wird, konnte gezeigt werden, dass COX2 mit proteolytisch inaktivem YME1L interagiert und somit ein proteolytisches Substrat darstellt, das ebenfalls von anderen Peptidasen abgebaut werden kann. Darüber hinaus weisen die *Yme1l*-defizienten Zellen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zugabe deutlich höhere Mengen an carbonylierten Proteinen auf verglichen mit der Kontrolle. Die Menge an aktivierter Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) ist nach Zugabe von Apoptose-induzierenden Stressoren ebenfalls erhöht, was auf eine verminderte Resistenz gegenüber Apoptose hinweist. Wie auch in HeLa-Zellen und MEFs beeinflusst die Herunterregulierung von *Yme1l* die Prozessierung von OPA1 und die mitochondriale Morphologie. Die Mitochondrien sind größtenteils fragmentiert und enthalten statt der Cristae-Lamellen deutlich ungeordnete Cristae, was durch die Expression des Wildtypgens *Yme1l* wieder revertiert werden kann. Insgesamt zeigt sich die Bedeutung von YME1L für die mitochondriale und die zelluläre Integrität.

In einer *in-silico*-Analyse des humanen Genoms konnte gezeigt werden, dass die Promotorregion von *Yme1l* die notwendigen Elemente der durch UPR<sup>mt</sup> aktivierten Gene, wie z.B. das der CLP-Protease, aufweist (Zhao et al. 2002; Aldridge et al. 2007). Dies wurde durch Fusion des *Yme1l*-Promotors mit einem Reporter gen und dessen durch UPR<sup>mt</sup> induzierbare Expression in Primatenzellen verifiziert (Horibe & Hoogenraad 2007).

Da die m-AAA Protease an neurodegenerativen Krankheiten beteiligt ist, liegt die Vermutung nahe, dass Fehlfunktionen von YME1L ebenfalls zu mitochondrialen Krankheiten führen (Coppola et al. 2000). Die Untersuchung menschlicher Hautfibroblasten von elf Patienten mit kombinierten Defekten in der oxidativen Phosphorylierung zeigte jedoch keine Beteiligung von YME1L (Coenen et al. 2005). Dies schließt allerdings nicht aus, dass YME1L-Defekte an anderen Erkrankungen beteiligt sind. Prinzipiell wäre die Untersuchung von *Yme1l*-defizienten Mäusen oder Ratten zur weiteren Analyse der Rolle der i-AAA Protease sinnvoll, jedoch existieren diese Modelle bisher nicht und die Herstellung ist oftmals sehr aufwendig und langwierig. Daher hat die Modulation der Genexpression der i-AAA Protease in einfachen, kurzlebigen, eukaryotischen Modellsystemen hier klare Vorteile.

### **1.5 *Podospora anserina* als Modellorganismus der Altersforschung**

Ein solches Modellsystem stellt *Podospora anserina* dar, ein filamentöser Ascomycet, der natürlicherweise auf dem Dung von Herbivoren wächst. Anders als die meisten anderen Ascomyceten weist *P. anserina* eine begrenzte Lebensspanne auf. Die Hyphen, die in ihrer Gesamtheit das Myzel bilden, wachsen an ihren Spitzen relativ gleichmäßig und sterben nach einem bestimmten Zeitraum ab. Dies tritt beim Wildstamm ‚s‘ unter definierten Anzuchtbedingungen je nach Nährstoffen im Medium nach etwa 25 Tagen ein (Tudzynski & Esser 1977). Bereits kurz bevor die Hyphenspitzen absterben, werden einige morphologische Veränderungen des Myzels sichtbar. So nehmen die Wachstumsrate und die Fertilität ab, die Bildung von Luftmyzel wird verringert und das Myzel pigmentiert zunehmend. Diese phänotypischen Veränderungen werden als ‚Seneszenzsyndrom‘ bezeichnet (Rizet 1953; Esser & Tudzynski 1980).

Da das Genom von *P. anserina* vollständig sequenziert und annotiert ist (*Podospora anserina* Genom-Projekt: <http://podospora.igmors.u-psud.fr>), der Organismus leicht zu kultivieren und genetisch zu manipulieren ist, stellt *P. anserina* einen idealen Modellorganismus zur Untersuchung molekularbiologischer Mechanismen wie z.B. bei der Altersforschung dar. Darüber hinaus bildet *P. anserina* große Mengen an Meiosporen (Ascosporen), den Produkten der sexuellen Fortpflanzung, welche die Analyse der Lebensspanne mit einer großen Zahl von Individuen erlaubt.

Die bedeutende Rolle der Mitochondrien beim Altern von *P. anserina* ist bereits seit mehr als 50 Jahren bekannt und wird seitdem intensiv untersucht (Osiewacz 2002). Ein für *P. anserina* charakteristisches Merkmal ist die altersabhängige Reorganisation der mtDNA, für den die „*plasmid-like*“ DNA (pIDNA;  $\alpha$ -senDNA) verantwortlich ist (Stahl et al. 1978; Cummings et al. 1979). Als pIDNA wird das erste Intron des mitochondrial-kodierten *PaCox1*-Gens bezeichnet (Stahl et al. 1978; Cummings et al.

1979; Belcour et al. 1981; Osiewacz & Esser 1984). Nach der Transkription von *PaCox1* wird das Intron herausgespleißt. Als transposables Element kann dieses nach reverser Transkription in die mtDNA re-integrieren. Dabei wird zwischen „*homing-like*“-Transposition, bei der die pDNA hinter das 3'-Ende des ersten Introns integriert, und ektopischer Transposition, bei der es in andere Regionen der mtDNA aufgenommen wird, unterschieden. Durch homologe Rekombination zwischen den pDNA-Sequenzen kann es je nach Integrationsart zur Freisetzung der pDNA oder zu umfassenden Deletionen in der mtDNA kommen. In seneszenten *P. anserina*-Kulturen liegt die zirkuläre pDNA in stark amplifizierter Form vor, was jedoch nicht als Ursache für die begrenzte Lebensspanne des Ascomyceten angesehen wird, sondern als Beschleunigung der Seneszenz. Ein weiteres für *P. anserina* typisches Merkmal des Alterns ist die zunehmende Fragmentierung der Mitochondrien (Scheckhuber et al. 2007). So weisen juvenile Stämme ein Netzwerk aus langen, filamentösen Mitochondrien auf, das mit dem Alter zunehmend fragmentiert. Die Verzögerung dieses Vorgangs resultiert in einer Verlängerung der Lebensspanne, jedoch existieren auch langlebige Mutanten mit fragmentierten Mitochondrien (Scheckhuber et al. 2007; Sellem et al. 2007).

Aufgrund der zentralen Rolle der Mitochondrien beim Altern überrascht es nicht, dass auch die Modulation der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle das Altern von *P. anserina* beeinflusst. So hat die konstitutive Überexpression von *PaLon* einen deutlich positiven Effekt auf die Lebensspanne und die Fitness des Organismus (Luce & Osiewacz 2009). Damit übereinstimmend ist die Deletion von *PaLon* nachteilig und führt zu einer verkürzten Lebensspanne (Adam et al. 2012). Der Deletionsstamm kann darüber hinaus weder bei Kälte noch bei Hitze wachsen und ist anfällig gegenüber  $H_2O_2$  im Medium. Dagegen hat die Deletion von *PaClpP*, der proteolytischen Untereinheit der PaCLPXP-Protease, überraschenderweise unter Normalbedingungen positive Auswirkungen für *P. anserina* und verlängert deren Lebensspanne ohne feststellbare physiologische Beeinträchtigungen (Fischer 2011). Die erhöhte Hitzesensitivität des Deletionsstamms weist jedoch auf die essenzielle Rolle der PaCLPXP-Protease für zelluläre Prozesse und eine mögliche Beteiligung an der mitochondrialen Stressantwort hin. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Untersuchung der i-AAA Protease von *P. anserina* und deren Rolle bei der Alterung für das Verständnis der Zusammenhänge der mitochondrialen Qualitätskontrolle notwendig ist.



## 2 Zielsetzung der Arbeit

Immer mehr Befunde zeigen, dass die mitochondriale Qualitätskontrolle eine enorme Bedeutung für die mitochondriale Homöostase hat und der Ausfall von Proteinen mit Aufgaben in der Qualitätskontrolle für die Ausprägung von Krankheiten und Altern verantwortlich ist. Während viele dieser Kontrollsysteme bereits relativ gut verstanden sind, ist über die Rolle der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle teilweise sehr wenig bekannt. Dass die Proteasen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle die Alterung beeinflussen, konnte durch die Modulation der beiden Matrixproteasen PaLON und PaCLXP bei *P. anserina* gezeigt werden (vgl. 1.5). Dagegen sind die zellulären Aufgaben der i-AAA Protease, einer weiteren Komponente dieses Netzwerks, bisher noch kaum verstanden. In anderen Organismen löst der Verlust der i-AAA Protease pleiotrope Phänotypen aus, die deutlich machen, dass die Protease eine zentrale Rolle für die mitochondriale Homöostase und die zelluläre Funktion spielt (vgl. 1.4.2). Dies zeigt, dass die Aufgaben der i-AAA Protease scheinbar nur bedingt durch andere Komponenten kompensiert werden können und unterstreicht die Bedeutung der Gewinnung weiterer Erkenntnisse über die biologische Rolle der Protease. In dieser Arbeit stand dabei vor allem die Analyse der Funktion der i-AAA Protease während der Alterung im Vordergrund, über die bisher nur sehr wenig bekannt ist. So zeigte eine Untersuchung der chronologischen Lebensspanne von *S. cerevisiae*, dass diese durch die Deletion von *Yme1* verkürzt wird (Francis et al. 2007; Palermo et al. 2007). Dabei besitzt *S. cerevisiae* unter den Alternsmodellsystemen eine Sonderstellung, da sowohl Komplex I der mitochondrialen Atmungskette als auch die CLPP-Protease der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle fehlen. Darüber hinaus können die Zellen auch unter anaeroben Bedingungen leben. Hinzu kommt die relativ niedrige Komplexität der Hefe als Einzeller, die *S. cerevisiae* zu einem weniger geeigneten Modellsystem für die Analyse der i-AAA Protease machen, da mehrere Befunde darauf hindeuten, dass die Protease sowohl die Atmungskettenkomplexe als auch andere Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beeinflusst (vgl. 1.4.2). Daher wurden die Analysen der vorliegenden Arbeit mit dem aeroben Hyphenpilz *P. anserina* durchgeführt, mit dessen Hilfe bereits einige molekulare Mechanismen des Alterns aufgeklärt werden konnten. Im Genom von *P. anserina* ist ein Homolog der i-AAA Protease kodiert (*Palap*; ***P. anserina* i-AAA Protease**). Um herauszufinden, ob und welche Rolle die Protease PalAP für die zelluläre Funktion besonders im Zusammenhang mit dem Alterungsprozess des Ascomyceten spielt, wurde das Gen durch homologe Rekombination deletiert. Die molekularbiologische und biochemische Charakterisierung dieses *Palap*-Deletionsstamms sollte weitere Aufschlüsse über die Aufgabe der i-AAA Protease liefern, insbesondere während des Alterns von *P. anserina*.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	GE 446 EC-1	Getinge
Binokular	M3Z	Wild Heerbrugg
Brutschränke	Kelvitron Rubarth Hannover Binder	Heraeus Heraeus Binder
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
„Crosslinker“	UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Einschweißgerät		Petra
Elektrophorese-Kammern	Mini-Sub® DNA Cell	Bio-Rad
	Wide Mini-Sub® DNA Cell	Bio-Rad
	Mini-Protean® II	Bio-Rad
	Mini-Protean® Tetrasystem	Bio-Rad
	Protean® II	Bio-Rad
	Ettan DALTwelve Separation Unit	GE Healthcare
Elektroporationsgerät	Easyject Prima	Equibio
Feinwaage	PB303	Mettler Toledo
Filmentwickler	Protec 45 compact	Protec
Fluoreszenzmikroskop	DM LB	Leica
	CLSM TCS SP5	Leica
Gefrierschrank		Liebherr
		Sanyo
Gradientenmischer	Econo Pump Ep-1 700	Bio-Rad
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
	Dri-Block DB 3	Techne
Heiz-Magnetrührer	IKAMAG RET	IKA
	IKAMAG RTC-basic	IKA
Homogenisatoren	Bead-Beater™	Roth
	Disruptor Genie	Scientific Industries
	Waring-Blendor	Waring
Hybridisierungsöfen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham
Infrarotscanner	Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR® Biosciences
Kamera	D300	Nikon
Kühlschrank		Liebherr
Laserscanner	Typhoon 9400	Amersham Biosciences
Mikroskop	Laborlux S	Leitz
Mikrowelle	Micro-Chef FM B935	Moulinex
NanoDrop® Spectrometer	ND-1000	peqlab
Netzgeräte	GPS 200/400	GE Healthcare
PCR-Geräte	TGradient 96	Biometra
	T1 Thermocycler 96	Biometra
pH-Meter	Calimatic 761	Knick

Gerät	Modell	Hersteller
Photometer	Ultrospec 2100 pro SPECTRAmax PLUS384	Amersham Biosciences Molecular Devices
Proteinfokussierungskammer	Protean® IEF Cell Ettan IGPhor IEF unit	Bio-Rad GE Healthcare
Proteintransfer	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad
Real-Time-Cycler	MJ MiniOpticon	Bio-Rad
Real-Time-Cycler	MyiQ™2	Bio-Rad
Sauerstoffelektrode	Oroboros Oxygraph-2k	Oroboros
Schüttelinkubator	HT-Infors	Infors-HT
Schüttelplattform	Promax 1020	Heidolph
Sterilbank	NSF 49; LF 460 EC	Clean Air
Thermomixer	S436	Eppendorf
Thoma-Zählkammer		Brand
Transilluminator	CS1	Cybertech
Trockenschrank	TKE 117	EHRET
Vakuum-Transferapparatur	LKB VacuGene XL	Pharmacia
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Plus SC 110A	Savant
„Vortex“	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Waagen	PB 303 LC 82	Mettler Toledo Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus	Millipore
Wasserbad	1083 (GFL), MP, U3	Julabo
Zentrifugen (und Rotoren)	Combi-Spin FVL-2400N	Lab 4 you
	5417 R (FA-45-24-11)	Eppendorf
	5804 R (A-4-44)	Eppendorf
	Sorvall RC5B (Super-Lite GSA SLA-1500 bzw. Sorvall SS34)	DuPont
	Sorvall Ultra Pro 80 (TH641)	DuPont
	Varifuge 3.0 WX Ultra 80 (TH641)	Heraeus Thermo Scientific

### 3.1.2 Sonstige Materialien

Tabelle 3: Liste der sonstigen Materialien.

Materialien	Modell	Hersteller
Cellophan		Bio-Rad
Filterpapier	3MM	Whatman
Glasperlen	0,5 mm	Biospec Products
Hybridisierungsmembran	Hybond-N	GE Healthcare
Hybridisierungsröhren		GE Healthcare
immobilisierte pH-Gradienten (IPG)	Immobiline™ DryStrips pH 3-10 NL	GE Healthcare
PVDF-Membran	Millipore Immobilon-FL	Millipore
Röntgenfilm	SuperRX	Fuji
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr Goos

### 3.1.3 Chemikalien und Stoffe

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe.

Artikel	Bezugsquelle	Artikel	Bezugsquelle
Antimycin A	Sigma	Hefeextrakt	Sigma
Acrylamid	Roth	HEPES	Serva
Agar	Invitrogen	Heringssperma-DNA	Roche
Agarose	Invitrogen	Hexanukleotide	Calbiochem
Ammoniumacetat	Merck	HF-Puffer	NEB
Ampicillin	Roche	Hygromycin B	Calbiochem
Antifoam	Sigma	Imidazol	Roth
APS	Merck	Isoamylalkohol	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma	Isopropanol	Roth
$\beta$ -NADH	Sigma	$K_2HPO_4$	Merck
BCIP	Roche	KCl	Merck
Biomalz	Roth	$KH_2PO_4$	Merck
Biotin	Serva	KOH	Sigma
Bisacrylamid	Roth	Lauroylsarkosin	Merck
Blockierungsreagenz	Roche	Maismehl	Merck
Bromphenolblau	Serva	Maleinsäure	Roth
BSA	Sigma	Methanol	Invitrogen
$CaCl_2$	Merck	$MgCl_2$ -Lösung (für PCR)	Invitrogen
Casaminsäuren	Difco	$MgSO_4 \times 7 H_2O$	Merck
CHAPS	Roth	$MnCl_2$	Merck
Chloroform	Merck	$MnSO_4 \times H_2O$	Merck
Coomassie Blue G250	Roth	$Na_2HPO_4$	Merck
CSPD	Roche	$Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$	Serva
$CuSO_4 \times 5 H_2O$	Merck	NaCl	Merck
Cytochrom c	Sigma	NaOH	Merck
D(+)-Saccharose	Roth	Natriumacetat	Merck
DAB	Sigma	Natriumcitrat	Roth
Dextrin	Roth	NBT	Sigma
Digitonin	Sigma	$NH_4Cl$	Merck
dNTPs	MBI Fermentas	Paraffin	GE Healthcare
DTT	MBI Fermentas	10x PCR-Puffer (- $MgCl_2$ )	Invitrogen
$\epsilon$ -Aminocapronsäure	Roth	PEG4000	Serva
EDTA	Merck	Phenol	Roth
Essigsäure	Merck	Phleomycin	Calbiochem
Ethanol	Roth	Rotenon	Sigma
Ethidiumbromid	Merck	Roti-Nanoquant	Roth
$Fe(NH_2)(SO_4)_2 \times 6 H_2O$	Roth	Saccharose	Roth
$FeCl_2$	Merck	SDS	Serva
$FeSO_4 \times 7 H_2O$	Merck	Sorbit	Merck
Formaldehyd	Sigma	TEMED	Sigma
Glucanex	Novo Nordisk Ferment AG	Tetracyclin	Roche
Glucose	Serva	Thiamin	Serva
Glycerin	Roth	TRIS	Gibco
Glycin	Merck	Triton X-100	Serva
$H_3Bo_3$	Roth	Trypton	Difco
$H_3PO_4$	Roth	Tween20	Sigma
Harnstoff	Merck	Xylencyanol	Serva
HCl	Difco	$ZnSO_4 \times 7 H_2O$	Merck

### 3.1.4 Anzuchtmedien

#### Ammoniumacetat-Medium

60 mM Ammoniumacetat  
in BMM  
2 % (w/v) Agar  
autoklavieren

#### BMM (Biomalz-Mais-Medium)

250 g Maismehl/5l Wasser  
über Nacht bei 60°C quellen  
über Handtuch filtrieren  
8 g Biomalz/l  
pH 6,5 (KOH)  
ad 5 l H<sub>2</sub>O  
autoklavieren  
2 % (w/v) Agar  
autoklavieren  
100 µg/ml Hygromycin B  
6 µg/ml Phleomycin

#### CM-Medium („complete medium“)

1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,5 g KCl  
0,5 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
10 g Glucose-Monohydrat  
3,7 g NH<sub>4</sub>Cl  
2 g Trypton  
2 g Hefe-Extrakt  
1 ml Stammlösung A  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH 6,5 (KOH)  
autoklavieren

#### LB („lysogeny broth“)

1 % (w/v) Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
1 % (w/v) NaCl  
pH 7,5 (NaOH)  
Festmedium: 1,5 % (w/v) Agar  
autoklavieren  
50 µg/ml Ampicillin-Lösung (LBA)  
12,5 µg/ml Tetracyclin (LBT)

#### M2-Medium (Minimalmedium)

0,25 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,3 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,25 g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
0,5 g Harnstoff  
10 g gelbes Dextrin  
20 g Agar  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
autoklavieren  
50 µl Biotin (0,05 mg/ml)  
200 µl Thiamin (250 mg/ml)  
100 µl Spurenelementlösung

#### Präp-Agar

4 % (w/v) Agar  
4 % (w/v) Präp-Agar  
autoklavieren

#### SOC

2 % (w/v) Trypton  
0,5 % (w/v) Hefeextrakt  
0,05 % (w/v) NaCl  
250 mM KCl  
pH 7,0 (NaOH)  
autoklavieren  
1 % 1 M Glucose  
1 % 2 M MgCl<sub>2</sub>

#### Transformationsmedium

3,7 g Ammoniumchlorid  
2 g Trypton  
1 g Hefe-Extrakt  
10 g Glucose-Monohydrat  
342,3 g Saccharose  
20 ml Stammlösung 1  
20 ml Stammlösung 2  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
für Hygromycin B: pH 6,0 (KOH)  
für Phleomycin: pH 7,5 (KOH)  
Festmedium: 1,2 % (w/v) Agar  
Überschichtungsmedium: 0,5 % (w/v) Agar  
autoklavieren  
100 µg/ml Hygromycin B  
6 µg/ml Phleomycin

### 3.1.5 Lösungen und Puffer

#### Agarose-Dichtung (DIGE)

0,5 % (w/v) Agarose  
0,02 % (w/v) Bromphenolblau  
1x SDS-Laufpuffer

#### Ampicillin-Lösung

50 mg/ml in H<sub>2</sub>O lösen  
sterilfiltrieren

#### Anodenpuffer (BN-PAGE)

25 mM Imidazol  
pH 7,0 (HCl)

#### Äquilibriumspuffer (DIGE)

6 M Harnstoff  
2 % (w/v) SDS  
50 mM Tris/HCl pH 8,8  
0,02 % (v/v) Bromphenolblau-Lösung  
30 % (v/v) Glycerin  
vor Verwendung zugeben:  
0,5 g/50 ml DTT bzw.  
1,25 g/50 ml Iodoacetamid (IAA)

#### Blotpuffer

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
20 % (v/v) Methanol

#### 3x BNP-Puffer

1,5 M ε-Aminocapronsäure  
75 mM Imidazol  
pH 7,0 (HCl)

#### Biotin-Stammlösung

5 mg Biotin  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O  
sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

#### Bromphenolblau-Lösung (DIGE)

1 % (w/v) Bromphenolblau  
0,06 % Tris

#### C18-Puffer A (ICAT)

5 % Acetonitril  
0,1 % Ameisensäure

#### C18-Puffer B (ICAT)

66 % Acetonitril  
0,1 % Ameisensäure

#### Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

96 % (v/v) Chloroform  
4 % (v/v) Isoamylalkohol

#### „cracking“-Puffer

50 mM Tris/HCl pH 6,8  
2 mM EDTA  
0,4 M Saccharose  
1 % (v/v) SDS  
0,01 % (w/v) Bromphenolblau  
1/100 RNaseA (100 µg/ml)

#### 5 % Coomassie (für BN-PAGE)

0,005 g Coomassie Blue G250  
in 100 µl 500 mM ε-Aminocapronsäure

#### DBQ-Puffer

20 mM NaMOPS  
50 mM NaCl  
2 mM KCN  
pH 7,4  
direkt vor Messung zugeben bzw. vorlegen:  
100 mM dNADH  
14 mM DBQ  
5 mM DQA

#### Denaturierungslösung

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH  
autoklavieren

#### Denaturierungsreduzierungspuffer (ICAT)

8 M Harnstoff in 50 mM Tris pH 8,5  
1,5 mM TCEP

#### DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)

7 % (w/v) SDS  
5 x SSC  
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin  
2 % (w/v) Blockingreagenz  
50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0)

#### DIG-Puffer 1

0,1 M Maleinsäure  
0,15 M NaCl  
pH 7,5 (NaOH)  
autoklavieren

#### DIG-Puffer 2

0,5% (w/v) Blockierungsreagenz  
bei 60°C in DIG-Puffer 1 lösen

#### DIG-Puffer 3

0,1 M Tris/HCl (pH 9,5)  
0,14 M NaCl  
autoklavieren

**DIG-Waschpuffer**

0,3 % (v/v) Tween 20  
in DIG-Puffer 1

**DIGE „labeling“-Puffer**

7 M Harnstoff  
2 M Thioharnstoff  
4 % (w/v) CHAPS  
30 mM Tris/HCl pH 8,6

**DIGE „stop“-Lösung**

10 mM Lysin

**Digitonin-Lösung** (10 %ig für BN-PAGE)

10 mg Digitonin  
ad 100 µl H<sub>2</sub>O  
bei 97-99°C bis gelöst  
bei 4°C abkühlen, evtl. bei -20°C lagern

**6x DNA-Ladepuffer**

0,25 % (w/v) Bromphenolblau  
0,25 % (w/v) Xylencyanol  
50 % (w/v) Saccharose  
0,1 M EDTA

**DTT-Lösung** (ICAT)

100 mM DTT in 50 mM Tris pH 8,5

**Entfernung der DIG-Sonde**

0,2 N NaOH  
0,1 % (v/v) SDS

**Görg-Coomassie-Entfärbelösung**

20 mM CuSO<sub>4</sub>  
25 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
65 % (v/v) H<sub>2</sub>O

**Görg-Coomassie-Färbelösung**

20 mM CuSO<sub>4</sub>  
45 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250  
45 % (v/v) H<sub>2</sub>O

**HAR-Puffer**

20 mM HEPES  
250 mM Saccharose  
0,2 mM EDTA  
2 mM NaN<sub>3</sub>  
pH 8,2  
direkt vor Messung zugeben bzw. vorlegen:  
100 mM NADH  
100 mM HAR

**Heringssperma-DNA**

20 mg/ml Heringssperma-DNA in H<sub>2</sub>O  
1 h bei 60°C, über Nacht bei RT rühren,  
5 min Ultraschall

**Kathodenpuffer** (BN-PAGE)

50 mM Tricin  
7,5 mM Imidazol  
pH ~ 7,0 (nicht einstellen)  
0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250 (B) bzw.  
0,002 % (w/v) Coomassie Blue G250 (B/10)

**Komplex I-Färbelösung**

1 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)  
0,1 mg/ml β-NADH  
0,1 M Tris/HCl pH 7,8

**Komplex IV-Färbelösung**

1 mg/ml Diaminobenzidin (DAB)  
24 U/ml Katalase  
1 mg/ml Cytochrom c  
75 mg/ml Saccharose

**Mitochondrien-Isolationspuffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
0,33 M Saccharose  
pH 7,5 (HCl)  
ggf. 0,2 % (w/v) BSA  
ggf. 5 mM ε-Aminocaprinsäure (frisch zugeben)  
ggf. 50 mM DTT (frisch zugeben)

**NBT/X-Phosphatlösung**

0,48 mM NBT  
0,56 mM BCIP  
in DIG-Puffer 3

**Neutralisierungslösung**

2 M NaCl  
1 M Tris  
pH 5,5 (HCl)  
autoklavieren

**Odyssey-Blocking-Puffer**

von LI-COR® Biosciences

**10x PBS**

1,4 M NaCl  
0,1 M KCl  
0,027 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
autoklavieren

**PEG**

60 % (w/v) PEG 4000  
 50 mM  $\text{CaCl}_2$   
 10 mM Tris  
 pH 7,5 (HCl)  
 autoklavieren

**Phleomycin-Lösung**

10 mg/ml in Wasser lösen  
 sterilfiltrieren

**Rehydrierungspuffer (DIGE)**

7 M Harnstoff  
 2 M Thioharnstoff  
 2 % (w/v) CHAPS  
 0,002 % (v/v) Bromphenolblau-Lösung  
 in  $\text{H}_2\text{O}$   
 vor Verwendung zugeben:  
 1 % (v/v) Pharmalyte 3-10 NL  
 18 mM DTT

**RNase A-Lösung**

10 mg/ml RNase A  
 0,01 M NaAc (pH 5,2)  
 15 min langsam aufkochen  
 1/10 Vol. 1 M Tris/HCl (pH 7,4)

**4 x Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris  
 0,04 % (w/v) SDS  
 pH 6,8 (HCl)

**4x SDS-Kathodenpuffer (DIGE)**

1,5 M Tris  
 0,4 % (w/v) SDS  
 pH 8,8 (HCl)

**5x SDS-Ladepuffer**

6,25 ml Tris/HCl  
 2 g SDS  
 1 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 7,5 ml Glycerin  
 1 % (w/v) Bromphenolblau

**10x SDS-Laufpuffer**

0,25 M Tris  
 1,9 M Glycin  
 1 % (w/v) SDS  
 pH 8,3 (HCl)

**Solubilisierungspuffer (BN-PAGE)**

50 mM NaCl  
 50 mM Imidazol/HCl pH 7  
 2 mM  $\epsilon$ -Aminocaprinsäure (frisch zugeben)  
 1 mM EDTA  
 pH 7

**Spurenelementlösung**

5 g Citrat  $\times \text{H}_2\text{O}$   
 5 g  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 1 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$   
 0,25 g  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
 0,05 g  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
 0,05 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$   
 0,05 g  $\text{H}_3\text{BO}_4$   
 ad 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$   
 sterilfiltrieren (0,2  $\mu\text{m}$  Porengröße)

**20x SSC**

3 M NaCl  
 0,3 M Natriumcitrat  
 pH 7,0 (HCl)  
 autoklavieren

**Stammlösung 1 (50x)**

0,075 % (w/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
 0,025 % (w/v) KCl  
 0,027 % (w/v)  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 autoklavieren

**Stammlösung 2 (50x)**

0,05 % (w/v)  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 0,05 % (w/v)  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$   
 0,05 % (w/v)  $\text{FeSO}_4$   
 0,05 % (w/v)  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$   
 autoklavieren

**Stammlösung A (für CM-Medium)**

0,1 % (w/v)  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$   
 0,1 % (w/v)  $\text{FeCl}_2$   
 0,1 % (w/v)  $\text{MnCl}_2$   
 autoklavieren

**STC-Lösung**

1 M Sorbit  
 10 mM Tris  
 50 mM  $\text{CaCl}_2$   
 pH 7,5 (HCl)  
 autoklavieren

**Tetracyclin-Lösung**

12,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  lösen  
 sterilfiltrieren

**STET-Lösung**

8 % (w/v) Saccharose  
 5 % (v/v) Triton X-100  
 50 mM EDTA  
 10 mM Tris  
 pH 8,0 (HCl)

**50x TAE**

2 M Tris  
57,1 ml Eisessig/l  
50 mM Na<sub>2</sub>EDTA  
pH 8,5 (Essigsäure)  
autoklavieren

**TENS**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
100 mM NaCl  
2 % (v/v) SDS  
pH 8,0 (HCl)

**Thiamin-Stammlösung**

25 g Thiamin  
ad 100 ml H<sub>2</sub>O  
sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße)

**TPS**

0,8 M Saccharose  
45 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
pH 5,5 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)  
autoklavieren

**4x Trenngelpuffer**

1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)  
0,4 % (w/v) SDS

**3.1.6 Zusammensetzung der Proteingele**

**Tabelle 5: Zusammensetzung von 10, 12 und 16 %igen Glycin-SDS-Polyacrylamidgelen (zwei Gele).**

	10 %	Trenngel		Sammelgel
		12 %	16 %	4 %
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	2,5 ml	3 ml	4 ml	250 µl
4x Trenngel- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	500 µl
H <sub>2</sub> O	5 ml	4,5 ml	3,5 ml	1,2 ml
TEMED	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	100 µl	50 µl	50 µl

**Tabelle 6: Zusammensetzung des 12,5 %igen Trenngels für 2D-DIGE (12 Gele).**

	12,5 % Trenngel
Acrylamid-Bisacrylamid (49,5 % T, 3 % C)	252 ml
4x Trenngelpuffer	250 ml
H <sub>2</sub> O	494 ml
TEMED	500 µl
10 % APS	4 ml

**Tabelle 7: Zusammensetzung eines 3,5 - 13 %igen blau-nativen Polyacrylamid-Gradientengels.**

	4 % Trenngel	13 % Trenngel	3,5 % Sammelgel
Glycerin	-	2,96 g	-
30 % Acrylamid	1,92 ml	713,6 µl	1,7 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	-	4,28 ml	-
2 % Bisacrylamid	889 µl	-	787,5 µl
3x BNP-Puffer	4,94 ml	4,94 ml	5 ml
H <sub>2</sub> O	7 ml	auf 15 ml auffüllen	7,385 ml
TEMED	6,8 µl	4,1 µl	11,9 µl
10 % APS	68 µl	41 µl	119 µl

### 3.1.7 Kits

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits.

Kit	Bezugsquelle
Cleavable ICAT® Reagent Kit for Protein Labeling	Applied Biosystems
CyDye DIGE Fluor, minimal labeling kit	GE Healthcare
DIG-DNA Labeling and Detection Kit	Boehringer Mannheim
iQ™ SYBR® Green Supermix	Bio-Rad
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad
Midi/Maxi Plasmid Purification	QIAGEN
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA Plant	Macherey-Nagel
OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit	Millipore
peqGOLD Fungal DNA Mini Kit	peqlab
Plasmid Purification Kit	Macherey-Nagel

### 3.1.8 Verwendete Stämme

Tabelle 9: Liste der verwendeten Stämme.

Organismus	Stamm	Quelle/Referenz
<i>E. coli</i>	XL1 Blue	Stratagene
	Wildstamm s	Rizet 1953
	$\Delta$ Palap	K. Luce (AK Osiewacz)
<i>Podospora anserina</i>	Palap_rev1	diese Arbeit
	Palap_rev2	diese Arbeit
	Palap_E540Q1	diese Arbeit
	Palap_E540Q2	diese Arbeit
	Palap_E540QG	diese Arbeit

### 3.1.9 Größenstandards

Tabelle 10: Liste der verwendeten Größenstandards.

Größenstandard	Hersteller
<b>DNA-Größenstandards</b>	
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Lambda DNA ( $\lambda$ ) / HindIII Marker	MBI Fermentas
Lambda DNA ( $\lambda$ ) / HindIII Marker, DIG-markiert	Roche
<b>Protein-Größenstandard</b>	
PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0671	MBI Fermentas

### 3.1.10 Oligonukleotide

**Tabelle 11: Liste der zur Herstellung von Vektoren verwendeten Oligonukleotide.** Die Schnittstelle der Restriktionsendonuklease ist unterstrichen.

Name	Basensequenz	Schnittstelle	Verwendung
<i>Palap-KpnI-for</i>	5' ATGGT <u>ACCG</u> GAGATGGCTGTAGAGGCG 3'	<i>KpnI</i>	bindet in 5'-Flanke des <i>Palap</i> -Gens, fügt <i>KpnI</i> -Schnittstelle ein
<i>Palap-PstI-rev</i>	5' CTTGTCCAGCAGCTGCAGCCTGCTC 3'	<i>PstI</i>	bindet in Sequenz des <i>Palap</i> -Gens, natürlich vorkommende <i>PstI</i> -Schnittstelle
<i>Palap-PstI-for</i>	5' GAGCAGGCTGCAGCTGCTGGACAAG 3'	<i>PstI</i>	bindet in Sequenz des <i>Palap</i> -Gens, natürlich vorkommende <i>PstI</i> -Schnittstelle
<i>Palap-EcoRV-rev</i>	5' CTGATATCCAAGTGTGCCCTCTCTGC 3'	<i>EcoRV</i>	bindet in 3'-Flanke des <i>Palap</i> -Gens, fügt <i>EcoRV</i> -Schnittstelle ein
<i>Palap_MunI-for</i>	5' TTCAATTGCCGCTCAGCGCAACGG 3'	<i>MunI</i>	bindet in Sequenz des <i>Palap</i> -Gens, fügt <i>MunI</i> -Schnittstelle ein, zur Inaktivierung der proteolytischen Domäne
<i>Palap_PvuII-rev</i>	5' TTCAGCTGGTGGTAGGCAGTCATCTC 3'	<i>PvuII</i>	bindet in Sequenz des <i>Palap</i> -Gens, fügt <i>PvuII</i> -Schnittstelle ein, zur Inaktivierung der proteolytischen Domäne
<i>Palap_EheI-for</i>	5' TTTGGCGCCGCCACGCCCTTGTTG 3'	<i>EheI</i>	bindet in Sequenz des <i>Palap</i> -Gens, fügt <i>EheI</i> -Schnittstelle ein, zur Inaktivierung der proteolytischen Domäne

**Tabelle 12: Liste der für „real-time RT-PCR“ verwendeten Oligonukleotide.**

Name	Basensequenz	cDNA-Produkt (Bp)	DNA-Produkt (Bp)
<i>Porin-rt-for</i>	5' TCTCCTCCGGCAGCCTTG 3'		
<i>Porin-rt-rev</i>	5' GAGGGTGTCCGCAAGTTC 3'	200	431
<i>PaMap-1876-for</i>	5' GGGTTTGCCGGAGCTGACATTG 3'		
<i>PaMap-2114-rev</i>	5' CAAACAGCGTGACCAGCTTCG 3'	200	259
<i>Udgrtfor</i>	5' TGGAGAGGGAGTATGCTGCT 3'		
<i>Udgrtrev</i>	5' GGAGGACACTAAACGCCAGA 3'	-	233
<i>PaLsurtfor</i> (Sellem et al. 2007)	5' GGGTACGACTGTTTCGTCGAT 3'		
<i>PaLsurtrev</i> (Sellem et al. 2007)	5' CCCCATGTTCTTTCGTACA 3'	-	130

### 3.1.11 Plasmide

**Tabelle 13: Liste der verwendeten Plasmide.**

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAN7-1	Positivkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation	Punt et al. 1987
phph-1	Negativkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation	Roche
pKO4	Vektor zur Herstellung der <i>bsd</i> -Sonde	Grief 2007

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pKO7-KU	Expressionsvektor für <i>P. anserina</i> , enthält eine Hygromycin B-Resistenzkassette	Gabe von Dr. A. Hamann (AK Osiewacz)
pPalap-E540Q	Plasmid zur Einführung einer proteolytisch inaktiven Variante von PalAP in den <i>Palap</i> -Deletionsstamm, Ausgangsvektor Palap-E540QG	diese Arbeit
pPalap-E540QG	Plasmid zur Einführung einer proteolytisch inaktiven Variante von PalAP in den <i>Palap</i> -Deletionsstamm, Ausgangsvektor Palap-rev	diese Arbeit
pPalap-rev	<i>Palap</i> -Reversionsplasmid für <i>P. anserina</i> , enthält eine Kassette bestehend aus ~ 1 kbp großen Promotorregion, der Sequenz von <i>Palap</i> und einer ~ 500 Bp Terminatorsequenz zur Reversion der Deletion von <i>Palap</i>	diese Arbeit
pPorin2	Plasmid mit der Gensequenz von <i>PaPorin</i> , Positivkontrolle	Gabe von Dr. A. Hamann (AK Osiewacz)

### 3.1.12 Sonden

Tabelle 14: Liste der verwendeten DIG-markierten Sonden.

Bezeichnung der Sonde	Herkunft des DNA-Fragments
bsd-Sonde	Verdau des Plasmids pKO4 mit <i>NcoI</i> und <i>XbaI</i> , 445 Bp großes Fragment
pDNA-Sonde	Stahl et al. 1982
<i>Palap</i> -Sonde	Verdau des Plasmids pPalap-Ex mit <i>NcoI</i> , 1.287 Bp großes Fragment
<i>PaClpP</i> -Sonde	von K. Luce (AK Osiewacz) zur Verfügung gestellt

### 3.1.13 Enzyme

Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	MBI Fermentas
Katalase	Sigma
Klenow-Fragment	MBI Fermentas
Lysozym	Merck
Phusion DNA-Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen <i>BglII</i> , <i>EcoRV</i> , <i>EheI</i> , <i>KpnI</i> , <i>MunI</i> , <i>NotI</i> , <i>PstI</i> , <i>PvuI</i> , <i>PvuII</i>	MBI Fermentas
RNase	Roche
$T_4$ DNA-Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen

### 3.1.14 Antikörper

Tabelle 16: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Anit-Digoxigenin~AP, Fab-Fragment	1:10.000	Sekundärantikörper gegen Digoxigenin, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, polyklonal aus Schaf	Roche
Anti-DNP	1:150	Primärantikörper, polyklonal aus Kaninchen	Chemicon Int.

Antikörper	Verdünnung	Beschreibung	Bezugsquelle
Anti-HsHSP60	1:4.000	Primärantikörper gegen Chaperonin HSP60, human	Biomol
Anti-PaCLPP	1:400	Primärantikörper gegen synthetisches Peptid, polyklonal aus Kaninchen	NEP
Anti-PaIAP	1:5.000	Primärantikörper gegen synthetisches Peptid, polyklonal aus Kaninchen	NEP
Anti-PaLON	1:1.500	Primärantikörper gegen synthetisches Peptid, polyklonal aus Kaninchen	NEP
Anti-PaPOR	1:5.000	Primärantikörper gegen aufgereinigtes Protein, polyklonal aus Kaninchen	NEP
Anti-ScCOX2	1:1.000	Primärantikörper gegen aufgereinigtes COX2 aus <i>S. cerevisiae</i> , polyklonal aus Kaninchen	Prof. T. Langer (Köln)
Anti-ScPHB1	1:1.000	Primärantikörper gegen synthetisches Peptid, polyklonal aus Kaninchen	Prof. T. Langer (Köln)
Anti-ScPHB2	1:1.000	Primärantikörper gegen synthetisches Peptid, polyklonal aus Kaninchen	Prof. T. Langer (Köln)
Anti-Ubiquitin	1:1.000	Primärantikörper, polyklonal aus Kaninchen	Abcam
IRDye 680CW goat α-mouse IgG	1:15.000	Sekundärantikörper, polyklonal aus Ziege, gekoppelt mit Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff	LI-COR® Biosciences
IRDye 800CW goat α-rabbit IgG	1:15.000	Sekundärantikörper, polyklonal aus Ziege, gekoppelt mit Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff	LI-COR® Biosciences

### 3.1.15 Computerprogramme

Tabelle 17: Liste der verwendeten Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Referenz / Quelle
Blast	Homologievergleich	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi">www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi</a>
Boxshade	Darstellung der Homologievergleiche	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html">www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html</a>
Clone Manager 8	<i>in silico</i> Klonierung	SciEd
ClustalW	Vergleich von Aminosäuresequenzen	Larkin et al. 2007
DAS	Vorhersage transmembraner Domänen	<a href="http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/">www.sbc.su.se/~miklos/DAS/</a>
DatLab 4	Oroboros-Auswertung	Oroboros
DeCyder™	Auswertung von 2D-DIGE	GE Healthcare
MitoProII	Identifizierung von mitochondrialen Lokalisierungssequenzen	Claros & Vincens 2004
Opticon Monitor 3	„real-time RT-PCR“	Bio-Rad
Photoshop, Illustrator	Bilddarstellung	Adobe
Quantity One	Densitometrie	Bio-Rad
SWISS-MODEL	Erstellung von Homologiemodellen	Arnold et al. 2006b
T-Test	statistische Auswertung	<a href="http://studentsttest.com">studentsttest.com</a>
UniProt	Charakterisierung der durch DIGE und ICAT identifizierten Proteine, Molekulargewicht und pI	UniProt Consortium 2012
USCF Chimera	Darstellung von Proteinstrukturen	Pettersen et al. 2004
Wilcoxon Test	statistische Auswertung	<a href="http://www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html">www.fon.hum.uva.nl/Service/Statistics/Wilcoxon_Test.html</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 *E. coli*-spezifische Methoden

#### Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht des *E. coli*-Stamms XL1 Blue erfolgte auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium in Gegenwart der entsprechenden Selektionsmarker. Zur Anzucht eines Stammes aus einer Gefrierkultur bzw. nach der Transformation mit einem hergestellten Plasmid wurden die Bakterien auf LB-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie des Stamms in eine 5 ml-Vorkultur überführt und mehrere Stunden bei 180 UpM und 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur in eine Hauptkultur (150 ml) überimpft und ebenfalls mehrere Stunden bei 37°C angezogen.

#### Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-XL1 Blue-Zellen wurden diese zunächst auf LBT-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine 5 ml LBT-Vorkultur wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Vorkultur wurde in eine 150 ml LBT-Hauptkultur überführt und bei 37°C kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,8 erreicht wurde. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurden die Kulturen durch 10minütige Zentrifugation bei 5.300 UpM (Sorvall GSA) bei 4°C sedimentiert und das Pellet in 150 ml kaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Zentrifugation und die darauf folgende Resuspension wurden zwei Mal wiederholt. Daraufhin wurde das Zellpellet in 12 ml kaltem H<sub>2</sub>O rückgelöst und erneut zentrifugiert (10 min, 5.800 UpM, 4°C, Sorvall SS34). Das Pellet wurde in 450 µl kaltem 10 %igen Glycerin resuspendiert und die Zellen in Aliquots à 50 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Bei der Elektroporation wird durch kurze Hochspannungsimpulse die Integrität der Bakterienmembran partiell gestört, sodass die Zelle DNA aufnehmen kann. Um ein ‚Durchschlagen‘ des Ansatzes durch zu hohe Ionenkonzentrationen zu vermeiden, wurde die DNA in H<sub>2</sub>O gelöst und nur ein Teil des Ligationsansatzes für die Transformation verwendet.

Die elektrokompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden 4 µl des Ligationsansatzes zu den Zellen gegeben und die Suspension in auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2.500 V und sofortiger Zugabe von 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium in die Küvette. Die Zellen wurden dann in ein 1,5 ml-Reagiergefäß überführt und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Daraufhin wurden die Zellen 5 min bei 2.500 UpM (FA-45-24-11) bei RT sedimentiert und ¾ des Überstands abgenommen. Das Pellet wurde vorsichtig rückgelöst, vollständig auf LBA-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.2.2 *P. anserina*-spezifische Methoden

#### Anzuchtbedingungen

Die Primärtransformanten und die Wildstämme s<sup>-</sup>F18261 und s<sup>+</sup>F18260 wurden auf BMM-Festmedium bei 27°C und Dauerlicht angezogen und anschließend bei 4°C gelagert. Zur Alterung von Stämmen wurden Myzelstücke juveniler Isolate an den Rand einer Petri-Schale mit 30 ml M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Bei Erreichen des gegenüberliegenden Endes der Platte wurde ein Myzelstück vom Ende der Wuchsfrent auf eine frische Platte mit M2-Festmedium überimpft. Die Wachstumsfront des Myzels wurde täglich markiert und die Isolate so angeimpft, dass das gewünschte Alter ein bis zwei Tage vor Versuchsbeginn erreicht wurde.

Zur Isolation von Gesamt-DNA und Gesamt-RNA sowie zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs des Myzels wurden pro Stamm mehrere Myzelstücke gleichmäßig auf einer Platte mit 30 ml M2-Festmedium mit Cellophan verteilt und zwei bis drei Tage bei 27°C und Dauerlicht bzw. 15 - 24 Stunden vor der Isolation bei 37°C inkubiert.

Für die Isolation mitochondrialer Proteine wurden zur Verifizierung von Mutanten und zur Untersuchung des  $\Delta Palap\Delta PaClpP$ -Stamms, zur Analyse von Proteinmodifikationen (während des Alterns) und der mitochondrialen Proteome (2D-DIGE) von jedem Stamm mehrere Myzelstücke auf fünf bis zehn Platten mit 30 ml M2-Festmedium und Cellophan verteilt und bei 27°C und Dauerlicht angezogen. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Myzel in Weithalskolben mit flüssigem CM-Medium (200 ml) überführt und zwei bis drei Tage bei 140 UpM bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Bei seneszenten Kulturen wurde das gewachsene Myzel in Fernbachkolben mit 150 ml CM-Medium gegeben und stehend für mehrere Tage bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Zur Analyse mitochondrialer Proteine durch Western Blot, BN-PAGE und ICAT wurden Myzelstücke von elf Tage alten Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolaten auf 20 - 30 Platten mit je 30 ml M2-Festmedium und Cellophan verteilt und drei Tage bei 27°C und Dauerlicht bzw. 24 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C inkubiert. Sollte das Myzel von drei Wild- bzw. drei  $\Delta Palap$ -Isolaten vereinigt werden, so wurden vor Beginn der Isolation gleiche Mengen (Feuchtgewicht) zusammengegeben und aufgearbeitet.

#### Protoplastierung von Myzel und Transformation von Protoplasten

Um die Aufnahme von Fremd-DNA zu ermöglichen, muss zunächst die Zellwand von *P. anserina* entfernt werden. Dies erfolgt enzymatisch durch Inkubation mit Glucanex, wobei genaugenommen Sphäroblasten entstehen, da die Zellwände nicht restlos entfernt werden.

Zunächst wurden von dem zu transformierenden Stamm mehrere Myzelstücke gleichmäßig auf BMM-Festmedium ohne Cellophan verteilt und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach zwei bis drei Tagen wurde das Myzel in Weithalskolben mit je 200 ml CM-Medium überführt und weitere zwei Tage bei 27°C und Dauerlicht bei 140 UpM

inkubiert. Daraufhin wurde das Myzel über vier Lagen Mull filtriert, gewogen und pro g Myzel in 5 ml Glucanex-suspension (20 mg Glucanex/ml TPS) in einem Mixer zerkleinert. Die Myzelsuspension wurde in einen Weithalskolben überführt und 1,5 Stunden bei 35°C inkubiert. Mit einer mikroskopischen Kontrolle wurde der Fortschritt der Protoplastierung überprüft. Anschließend wurde die Suspension über zwei Lagen Mull und durch einen Trichter mit Glaswolle filtriert. Die filtrierte Suspension wurde in Sarstedt-Gefäße überführt und 10 min bei 4.000 UpM (Varifuge 3.0) bei RT zentrifugiert. Das entstandene Protoplastenpellet wurde in 1 ml TPS resuspendiert, in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und Glucanex durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml TPS und Zentrifugation bei 4.000 UpM (FA-45-24-11) bei RT entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Protoplasten-Suspension auf Eis gestellt, eine 1:100-Verdünnung hergestellt und mit einer Thoma-Zählkammer die Zahl der Protoplasten bestimmt. Pro Transformationsansatz wurden 1 -  $3 \times 10^7$  Protoplasten eingesetzt. Überschüssige Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

Zur Transformation wurden die Protoplasten in 200 µl kalter STC-Lösung aufgenommen und auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurden 10 µg DNA des zu transformierenden Plasmids eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden 10 µg des Plasmids pAN7-1 (Hygromycin-Resistenzkassette) verwendet, als Negativkontrolle diente das Plasmid phph-1, welches kein Resistenzgen trägt. Der Regenerationskontrolle wurden 20 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und alle Ansätze wurden auf Eis inkubiert. Nach 30 min wurden je 50 µl gekühltes PEG zugegeben und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze in Polypropylen(PP)-Röhrchen überführt und je 2 ml PEG in 500 µl-Schritten zugegeben. Die Röhrchen wurden drehend vorsichtig gemischt und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze 10 min bei RT inkubiert und anschließend je 4 ml STC zugegeben und vorsichtig gemischt. Schließlich wurden die Protoplasten ausplattiert. Dazu wurden von den Transformationsansätzen je 800 µl mit 4 ml Hygromycin-haltigem Überschichtungsmedium in PP-Röhrchen vermischt, auf Transformationsmedium mit Hygromycin verteilt und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Von der Regenerationskontrolle wurden zwei Verdünnungsreihen von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-6</sup> mit STC bzw. H<sub>2</sub>O angelegt und von jeder Verdünnungsstufe 1 ml mit 4 ml Überschichtungsmedium vermischt. Diese wurden auf Hygromycin-freiem Transformationsmedium verteilt und ebenfalls bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach vier Tagen erfolgten die Auswertung der Regenerationskontrolle und die Berechnung der Regenerationsrate.

### **Isolation der Ascosporen**

Die für die Versuche verwendeten monokaryotischen Isolate wurden durch Kreuzung von zwei monokaryotischen *P. anserina*-Stämmen mit gegensätzlichem Kreuzungstyp gewonnen. So wurden z.B. die nach der Transformation erhaltenen Primärtransformanten mit dem Wildstamm gekreuzt um juvenile Sekundärtransformanten zu erhalten. Dazu wurden die Stämme auf M2-Festmedium im Abstand von ~ 5 cm voneinander angeimpft und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach etwa zehn Tagen hatten sich an den aneinandergrenzenden Wuchsfronten der

beiden Stämme Fruchtkörper (Perithezien) gebildet. Im Inneren dieser Perithezien befinden sich mehrere Asci, die normalerweise vier dikaryotische Ascosporen enthalten. In seltenen Fällen (~ 5 %) werden jedoch irreguläre Asci mit mehr als vier Sporen gebildet, bei denen Einzelkerne von einer Sporenwand umschlossen wurden. Diese Asci mit zwei oder mehr monokaryotischen und drei oder weniger dikaryotischen Sporen wurden isoliert, die Sporen auf Ammoniumacetat-Festmedium überimpft und zwei Tage bei 27°C im Dunkeln inkubiert. Die keimten Sporen wurden anschließend bei 4°C aufbewahrt. Zur Kontrolle der monokaryotischen Stämme und der Bestimmung des Paarungstyps wurden Testkreuzungen auf M2-Festmedium mit dem Wildstamm sF18261 angesetzt und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert.

Die Überprüfung der Keimungsrate erfolgte mit dikaryotischen Sporen. Dazu wurden die Wildstämme sF18261 und sF18260 auf M2-Festmedium gegeneinander gekreuzt, sowie die  $\Delta Palap$ -Stämme F114341 und F114332. Die Sporen je eines Wildstamm- und eines  $\Delta Palap$ -Stamm-Askus wurden auf eine Ammoniumacetat-Platte überimpft und drei Tage bei 27°C bzw. 37°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde die Keimungsrate unter Verwendung eines Binokulars bestimmt.

#### **Bestimmung von Wuchsrate und Lebensspanne**

Zur Bestimmung der medianen und maximalen Lebensspanne der Stämme wurden zwei Tage auf Ammoniumacetat-Medium gewachsene, monokaryotische Isolate verwendet. Ein Myzelstück aus der Mitte des Isolats wurde an einem Ende eines mit 50 ml M2-Festmedium befüllten Rennrohrs angeimpft und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Dabei wurde die Wuchsfrente alle zwei bis drei Tage bis zum Einstellen des Wachstums markiert. Zur Analyse der Lebensspanne bei Hitzestress wurde parallel ein zweites Rennrohr mit einem Myzelstück derselben Kultur beimpft und zunächst bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Isolate, die hitzestress werden sollten, in eine Ebene eines Brutschanks mit einer Temperatur von 37°C umgesetzt. Aufgrund der geringeren Lebensspanne wurden die Wuchsfrenten täglich markiert. Die Lebensspannen der Isolate ergaben sich aus der Anzahl der Wuchstage, zusätzlich zu den zwei Keimungstagen. Die mediane Lebensspanne entspricht der Zahl an Tagen bis 50 % der Individuen eines Stammes ihr Wachstum einstellen, die maximale Lebensspanne des Stammes ist mit der Lebensspanne des am längsten überlebenden Individuums identisch.

Die Wachstumsrate der Isolate wurde im Rahmen der Lebensspannen-Experimente bestimmt. Sie entspricht der Wuchsstrecke des Myzels eines Individuums innerhalb eines Zeitraums mit konstantem Wachstum und ist in cm pro Tag angegeben. Der Mittelwert aller Individuen eines Stammes ergibt die Wachstumsrate des Stammes.

#### **Bestimmung der weiblichen Fertilität von *P. anserina***

Die Bestimmung der weiblichen Fertilität des  $\Delta Palap$ -Stamms erfolgte auf M2-Festmedium. Dazu wurden je vier juvenile Isolate des Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamms mit dem Kreuzungstyp „+“ und jeweils vier mit dem Kreuzungstyp

„-“ in der Mitte einer Petri-Schale mit 30 ml M2-Festmedium angeimpft. Um den Einfluss von Hitzestress auf die weibliche Fertilität zu analysieren, wurden pro Isolat jeweils zwei Petri-Schalen angeimpft. Parallel dazu wurde jeweils ein Myzelstück des Wildstamms s<sup>-</sup>F18261 und s<sup>+</sup>F18260 auf mehreren Platten mit M2-Festmedium angeimpft und ebenfalls bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach acht Tagen bei 27°C und Dauerlicht wurden die Individuen, die hitzestress werden sollten, in einen Brutschrank mit 37°C und Dauerlicht überführt. Nach weiteren fünf Tagen wurden alle Isolate spermatisiert. Dazu wurden jeweils 5 ml H<sub>2</sub>O auf das Myzel der Wildstämme s<sup>-</sup>F18261 bzw. s<sup>+</sup>F18260 gegeben, um die Spermastien abzuschwemmen. Nach 5 min wurde die Suspension abpipettiert und 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Suspension wurde kurz gemischt (Vortex) und jeweils sechs Tropfen à 300 µl auf Myzel eines zu testenden Individuums mit gegensätzlichem Kreuzungstyp pipettiert. Die Spermastien-Suspension eines Wildstamms wurde dabei für ein Wildstamm- $\Delta$ Palap-Stamm-Pärchen bei 27°C und nach Inkubation bei 37°C verwendet. Nach 5 min wurden die Tropfen vollständig entfernt und alle Myzelien zwei Tage bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Daraufhin wurde die Zahl der Perithezien pro Tropfen und die Fläche jedes Tropfen bestimmt, woraus sich die Zahl der Perithezien pro Fläche ergab. Von jedem Individuum wurde ein Mittelwert berechnet, und aus den Mittelwerten aller Individuen eines Stamms ergab sich der Mittelwert des Stamms.

#### Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen

Für die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden die Stämme verschiedenen Alters auf Objektträgern angeimpft, deren zentrale Mulde mit flüssigem M2 und 2 % Agarose (1:1) gefüllt war. Die Objektträger wurden zwei Tage in einer feuchten Kammer bei 27°C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien in den Hyphen wurde eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXMRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach 15minütiger Inkubation wurden die Isolate mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (TCS SP5,  $\lambda_{\text{ex}}$  515 - 560 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  > 590 nm, Leica) analysiert.

#### Sauerstoffverbrauchsmessungen mit dem Respirometer Oxygraph-2k

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs von 14 Tage alten Wild- und  $\Delta$ Palap-Isolaten wurde mit dem Respirometer Oxygraph-2k (Oroboros) durchgeführt. Die Stämme wurden dazu auf M2-Festmedium (30 ml) mit Cellophan bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Messung bei 37°C und Dauerlicht angezogen.

Vor Beginn jeder Messung wurden die beiden Messkammern mit flüssigem M2 befüllt und mit Sauerstoff gesättigt. Daraufhin wurden je ~ 8 mg Myzel mit einem Skalpell in kleine Stückchen zerteilt. Dann wurde das Myzel eines Wildstamms in eine Kammer gegeben und das eines  $\Delta$ Palap-Isolats in die andere, die Kammern verschlossen und der Sauerstoffverbrauch analysiert. Für die bei 27°C angezogenen Isolate erfolgte die Messung bei 27°C, für hitzestressete Myzelien bei 37°C. Während der Messung wurde schrittweise Rotenon zugegeben (1 µM, 5 µM und 10 µM) und zuletzt 2 µM Antimycin A. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ‚DatLab 4‘ (Oroboros).

### 3.2.3 Nukleinsäuren-spezifische Methoden

#### Isolation von Gesamt-DNA aus *P. anserina*

Die Isolation von Gesamt-DNA aus *P. anserina* erfolgte nach Lecellier & Silar (Lecellier & Silar 1994). Zum Nachweis von DNA-Abschnitten z.B. von Primärtransformanten, wurden Myzelstücke der zu untersuchenden Stämme zwei Tage auf BMM-Festmedium mit einer Schicht Cellophan in regelmäßigen Abständen verteilt und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Zur Analyse der pDNA-Freisetzung während des Alterns und des Einflusses von Hitze auf die mtDNA wurden die Myzelstücke der Stämme auf M2-Festmedium (30 ml) zwei Tage bei 27°C bzw. 15 Stunden vor der Isolation der Gesamt-DNA bei 37°C inkubiert. Senescente Stämme wurden drei Tage bei 27°C angezogen. Das gewachsene Myzel wurde daraufhin in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml frischem TENS-Puffer vermischt. Dieses Myzel-Puffer-Gemisch wurde daraufhin abwechselnd 30 s stark durchmischt (Vortex) und in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach dem Gefrieren wurde die Probe bei 70°C auf dem Schüttler aufgetaut. Dieser Zyklus wurde drei Mal wiederholt. Durch den ersten Zentrifugationsschritt bei 14.000 UpM (FA-45-24-11) für 10 min bei RT wurden Zellrückstände sedimentiert. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 Vol. Phenol durch Invertieren vermischt, um Proteine zu fällen. Nach erneuter Zentrifugation bei 6.000 UpM (FA-45-24-11) für 5 min bei RT wurde die obere Phase abgenommen und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt und erneut zentrifugiert. Die Oberphase wurde erneut abgenommen, mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) vermischt und wie zuvor zentrifugiert. Daraufhin wurde die DNA durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und anschließender Zentrifugation für 20 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei 4°C gefällt. Das Sediment wurde in 90 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 3 M NaAc (pH 5,2) bei 37°C rückgelöst. Durch Zugabe von 2 Vol. Ethanol wurde die DNA für 15 min bei -80°C gefällt und anschließend erneut für 20 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und je nach Größe in 15 - 50 µl H<sub>2</sub>O rückgelöst.

Zur Gewinnung reiner Gesamt-DNA aus *P. anserina* wurde das „peqGOLD Fungal DNA Mini“-Kit (peqlab) verwendet. Dazu wurden Myzelstücke des Wildstamms sF18261 zwei Tage auf BMM-Festmedium mit Cellophan bei 27°C angezogen. Die Isolation der DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

#### Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* – „cracking“-Methode

Die „cracking“-Methode dient zur schnellen Analyse einer großen Zahl von *E. coli*-Kolonien nach der Transformation mit einem hergestellten Plasmid. Dabei kann jedoch nur untersucht werden, ob eine Kolonie einen Vektor aufgenommen hat, der sich vom Ausgangsvektor unterscheidet. Dazu wurden je 500 µl LBA-Medium in 1,5 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt, mit je einer Ampicillin-resistenten Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Daraufhin wurden die Kulturen bei 13.000 UpM (FA-45-24-11) für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Sediment wurde in 25 µl „cracking“-Puffer resuspendiert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13.000 UpM (FA-45-24-11) bei RT zentrifugiert, der Überstand auf ein 0,7 %iges TAE-

Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Kontrolle wurde der unverdaute Ausgangsvektor aufgetragen. Kolonien, die Plasmide mit abweichenden Größen aufgenommen haben, wurden erneut in 5 ml LBA-Medium angeimpft und die Plasmide durch „Mini“-Plasmidpräparation (STET) isoliert und analysiert.

#### **Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* – „Mini“-Plasmidisolation (STET)**

Zur schnellen und einfachen Isolation von Plasmid-DNA wurden 5 ml LBA-Kulturen mit je einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3.500 UpM (A-4-44) für 10 min bei RT sedimentiert und in 150 µl STET-Lösung resuspendiert. Die Lösung wurde mit 12 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) gemischt, kurz inkubiert und die Reaktion durch Inkubation für 90 s bei 90°C gestoppt. Durch anschließende Zentrifugation für 10 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei RT wurden die Proteinaggregate entfernt, der Überstand mit 150 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und die DNA bei -80°C für 20 min gefällt. Nach erneuter Zentrifugation für 30 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei 4°C wurde das Sediment mit 150 µl 70 %igem Ethanol für 10 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei 4°C gewaschen. Das entstandene Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 30 - 50 µl RNaseA-haltiger Lösung (0,2 mg/ml) resuspendiert.

#### **Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* – „Mini“- und „Midi“-Plasmidisolation (Macherey-Nagel bzw. Qiagen)**

Hochreine Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Menge nach Herstellerangaben mit dem „Plasmid DNA Purification“-Kit (Macherey-Nagel) bzw. dem „Midi/Maxi Plasmid Purification“-Kit (Qiagen) isoliert. Die Plasmid-DNA wurde in 50 - 75 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Bei Bedarf wurde vor Beginn der Isolation eine Gefrierkultur in 15 %igem Glycerin angelegt, die bei -80°C aufbewahrt wurde.

#### **Isolation von Gesamt-RNA aus *P. anserina* und Synthese von cDNA**

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus *P. anserina* wurden Myzelstücke der zu untersuchenden Stämme drei Tage auf M2-Festmedium (30 ml) mit Cellophan bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Isolation bei 37°C inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und durch Mörsern aufgeschlossen. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit dem „NucleoSpin® RNA Plant“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Der DNase-Verdau erfolgte dabei nicht wie im Protokoll vorgegeben auf der Säule, sondern wurde in Lösung durchgeführt. Anschließend wurde die RNA mit dem „NucleoSpin® RNA Clean-up“-Kit (Macherey-Nagel) aufgereinigt.

Zur Analyse der RNA durch „real-time RT-PCR“ wurde diese mit dem „iScript™ cDNA Synthesis“-Kit (Bio-Rad) nach Herstellerangaben in cDNA umgewandelt. Dazu wurde maximal 1 µg RNA eingesetzt. Bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde, wurde zunächst überprüft, dass die isolierte RNA frei von DNA ist, da DNA das Ergebnis der „real-time RT-PCR“ verfälscht. Dazu wurde eine PCR mit der DNA-abhängigen DNA-Polymerase *Taq* und dem Oligonukleotidpaar *Porin-rt-for*/*Porin-rt-rev* (vgl. Tabelle 12) durchgeführt. Als Matrize dienten je 50 ng RNA

pro Probe. Als Positivkontrolle wurden 5 ng des Plasmids pPorin2 eingesetzt. Während nach der anschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung und Färbung mit Ethidiumbromid bei der Positivkontrolle eine Bande von ~ 430 Bp Größe detektierbar sein sollte, sollte bei den RNA-Proben kein Produkt sichtbar werden. Nur aus DNA-freien RNA-Proben wurde cDNA synthetisiert.

#### **Amplifikation von DNA (Polymerase-Kettenreaktion)**

Zur schnellen Vervielfältigung von DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion („*polymerase chain reaction*“, PCR) verwendet. Dabei amplifiziert eine DNA-abhängige DNA-Polymerase einen kurzen, durch Oligonukleotide genau definierten Abschnitt einer DNA-Matrize. Zur Klonierung von PCR-Produkten wurde die DNA durch die *Phusion*-Polymerase amplifiziert, für alle anderen Anwendungen wurde die *Taq*-Polymerase verwendet. Pro Ansatz wurden als DNA-Matrize 2,5 ng Plasmid-DNA oder 1 µl reine Gesamt-DNA aus *P. anserina* eingesetzt. Die Mengen an Puffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP-Mix und Oligonukleotiden richteten sich nach den empfohlenen Mengen der Hersteller. Die Reaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt, wobei das PCR-Programm (Denaturierung, Anlagerung, Elongation, Nachsynthese) ebenfalls nach den Angaben des jeweiligen Herstellers der Polymerase verwendet wurde. Für jedes Oligonukleotidpaar wurde in einem Vorversuch die optimale Anlagerungstemperatur ermittelt. Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit aufgereinigt.

#### **Quantitative „*real-time (reverse Transkriptase)-PCR*“ („*real-time (RT)-PCR*“)**

Die quantitative „*real-time (RT)-PCR*“ ist eine Methode zur Bestimmung der relativen Konzentration von Nucleinsäuren. Der im Reaktionsvolumen enthaltene Farbstoff „SYBR Green“ interkaliert in doppelsträngige DNA, wodurch nach jedem Zyklus die Fluoreszenz des Farbstoffs als Maß für die Menge an doppelsträngiger DNA bestimmt werden kann. Die Analyse wurde mit dem „iQ™ SYBR® Green Supermix“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben in dem Gerät „MyiQ™2“ (Bio-Rad) durchgeführt.

Dazu wurden zunächst in Vorversuchen die optimale Anlagerungstemperatur und die optimale Konzentration des Oligonukleotidpaares bestimmt (Tabelle 18). Die Anlagerungstemperatur wurde durch eine PCR mit einem Temperatur-Gradienten mit der *Taq*-Polymerase untersucht. Zur Bestimmung der optimalen Oligonukleotid-Konzentration wurde eine „*real-time RT-PCR*“ mit Oligonukleotid-Konzentrationen von 75 bis 900 nM in Triplikaten durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Ansätze wurde die Oligonukleotid-Konzentration gewählt, bei der viel spezifisches Produkt gebildet wurde, aber keine Oligonukleotid-Dimere entstehen. Darüber hinaus sollte die Standardabweichung des C(t)-Wertes des Triplets (Anzahl der Zyklen, die nötig sind um ein bestimmtes Fluoreszenz-Niveau zu erreichen) gering sein, da dies eine gleichmäßige Reaktion spiegelt.

Um die Effizienz des Oligonukleotidpaares *PaMap-1876-for/PaMap-2114-rev* zu ermitteln, wurde eine „*real-time RT-PCR*“ mit verschiedenen Mengen an cDNA (20 ng, 40 ng, 60 ng und 80 ng) durchgeführt. Für das Oligonukleotidpaar *PaLsurtfor/PaLsurtrev* wurde ebenfalls eine „*real-time PCR*“ mit verschiedenen Mengen an Matrize durchgeführt, jedoch wurde statt cDNA Gesamt-DNA (1 ng, 5 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng und 100 ng) eingesetzt. Normalerweise sollte die DNA-Menge mit jedem Zyklus verdoppelt werden, was jedoch in der Praxis nicht immer der Fall ist. Der ermittelte C(t)-Wert wurde gegen die Verdünnung aufgetragen und über die Steigung der Regressionsgeraden die Effizienz (E) für das jeweilige Oligonukleotidpaar ermittelt:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Unter Berücksichtigung der Effizienz des Oligonukleotidpaares und der C(t)-Werte der Analysen von *PaMap* und *PaPor*, dem Referenzgen, bzw. *PaLsu* und dessen Referenzgen *PaUdg*, konnte die relative Expression von *PaMap* bzw. *PaLsu* berechnet werden (Pfaffl 2001). Da die C(t)-Werte aus den Mittelwerten von je vier Wild- bzw.  $\Delta$ *Palap*-Stämmen gebildet wurden, wurden die Ratiowerte logarithmiert, der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet und diese Werte wieder delogarithmiert.

**Tabelle 18: Parameter der Oligonukleotidpaare für eine „*real-time RT-PCR*“.**

	<b>PaPorin</b>	<b>PaMap</b>	<b>PaUdg</b>	<b>PaLsu</b>
Oligonukleotide	<i>Porin-rt-for</i> <i>Porin-rt-rev</i>	<i>PaMap-1876-for</i> <i>PaMap-2114-rev</i>	<i>Udgrtfor</i> <i>Udgrtrev</i>	<i>PaLsurtfor</i> <i>PaLsurtrev</i>
Anlagerungstemperatur	60°C	65°C	61°C	57°C
Konzentration	900 nM	75 nM	300 nM	750 nM
(c)DNA-Menge	20 ng	40 ng	25 ng	25 ng
Effizienz	2,03	2,1	2,02	2,05

### Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur größenabhängigen Auftrennung von DNA im elektrischen Feld. Dazu wurden je nach Fragmentgröße 0,8 - 1,5 %ige TAE-Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit je 1/5 ihres Volumens 6x DNA-Ladepuffer versetzt und mit einem geeigneten Größenstandard aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V für 1,5 Stunden.

Nach der Auftrennung wurden die TAE-Agarosegele 20 min im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml H<sub>2</sub>O) inkubiert. Die gefärbten DNA-Banden wurden mit einem UV-Transilluminator detektiert und die Gelbilder digital abgespeichert.

### Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA aus PCR-Ansätzen oder aus der Gelmatrix erfolgte mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Zur Elution wurden 15 - 50 µl vorgewärmter Elutionspuffer oder H<sub>2</sub>O verwendet.

### Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden, Plasmid-DNA, DNA-Fragmenten und RNA erfolgte durch photometrische Messung nach Herstellerangaben (NanoDrop ND-1000). Zur Bestimmung der Konzentration von Oligonukleotiden wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und in die folgende Gleichung eingesetzt:

Konzentration [mol/l] = Absorption/Em A = Adenin-Nukleotide im Oligonukleotid

Em = molarer Extinktionskoeffizient T = Thymin-Nukleotide im Oligonukleotid

Em = A x 16.000 + T x 9.600 + G x 12.000 + C x 7.000 G = Guanin-Nukleotide im Oligonukleotid

C = Cytosin-Nukleotide im Oligonukleotid

Die Konzentration von genomischer DNA wurde densitometrisch bestimmt. Dazu wurde 1 µl isolierte Gesamt-DNA und 250 ng λHindIII-Marker auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „Quantity One®“ (Bio-Rad), wobei die Intensitäten der Banden des λHindIII-Markers mit bekannter DNA-Konzentration mit denen der Proben verglichen und die Konzentration pro Mikroliter berechnet wurde.

### Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde durch die Firma „Scientific Research and Development GmbH“ (SRD GmbH, Bad Homburg) durch Kettenabbruchreaktion durchgeführt. Die Sequenzierreaktion enthielt dabei 300 ng der zu sequenzierenden DNA und 5 pmol Oligonukleotid in einem Gesamtvolumen von 7 µl.

### Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA wurde mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer für 2 - 3 Stunden bzw. über Nacht bei 37°C verdaut. Dazu wurde normalerweise pro 1 µg DNA 5 U Enzym eingesetzt.

### Ligation von DNA

Für die Ligation von kompatiblen DNA-Fragmenten durch die T<sub>4</sub>-DNA-Ligase wurden der Vektor und die Insertionsfragmente im molaren Verhältnis 1:4 oder 1:6 zusammengefügt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 5 U T<sub>4</sub>-DNA-Ligase über Nacht bei 4°C. Durch anschließende Inkubation für 10 min bei 65°C wurde die Ligase inaktiviert.

### **Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten zur Herstellung von DNA-Sonden**

Um DNA-Sequenzen in Southern Blot-Analysen detektieren zu können, werden mit Digoxigenin (DIG) markierte DNA-Fragmente (Sonden) benötigt. Das benötigte DNA-Fragment wurde durch Restriktion aus einem Plasmid gewonnen. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Fragment aus einem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin® Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Daraufhin wurde 1 µg des zu markierenden DNA-Fragments 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und sofort auf Eis inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 2 µl Hexanukleotidgemisch, 2 µl dNTP-Mix („DIG-DNA Labeling and Detection“-Kit von Roche) und 2 µl Klenow-Fragment in einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben. Die Markierungsreaktion wurde nach 20 Stunden bei 37°C durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8) gestoppt.

### **Überprüfung der Markierungseffizienz von DNA-Sonden (Spot-Blot)**

Die Überprüfung der Effizienz der DIG-Markierung der DNA-Sonde erfolgte durch Vergleich mit DIG-markierter Kontroll-DNA. Dazu wurden definierte Mengen der Kontroll-DNA und der markierten Sonde auf eine Nylonmembran aufgetragen und durch UV-Behandlung mit dem „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) quervernetzt. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte wie bei der Southern Blot-Analyse, wobei als Farbsubstrat NBT/X-Phosphat verwendet wurde. Nach 1 - 3stündiger Inkubation im Dunkeln wurden die Intensitäten der Färbung der DIG-markierten Kontroll-DNA mit der neu hergestellten Sonde verglichen.

### **Transfer von DNA (Southern Blot)**

Von der zu untersuchenden DNA wurden 500 - 1.000 ng mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease über Nacht bei 37°C verdaut. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurde jede Probe 30 min mit 0,5 µl RNaseA-haltiger Lösung (0,2 mg/ml) bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach der Auftrennung der Proben zusammen mit DIG-markiertem  $\lambda$ HindIII Marker mit TAE-Agarosegelen wurde die DNA durch Vakuum (etwa 50 mbar) auf eine auf die entsprechende Größe zugeschnittene, mit 2x SSC befeuchtete Nylonmembran (Hybond-N von GE Healthcare) transferiert. Dazu wurde die DNA zunächst durch Überschichtung des Agarosegels mit 0,25 N HCl und 20minütiger Inkubation depuriniert. Daraufhin wurde das Agarosegel mit Denaturierungslösung überschichtet und erneut 20 min inkubiert, wodurch die DNA-Stränge voneinander getrennt werden. Zur Neutralisierung wurde das Gel weitere 20 min mit Neutralisierungspuffer überschichtet. Darauf folgte der Transfer der DNA auf die Nylonmembran, wozu das Agarosegel mit 20x SSC überschichtet und etwa 1,5 Stunden inkubiert wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in 2x SSC inkubiert und luftgetrocknet. Dann wurde die DNA durch beidseitige UV-Bestrahlung der Nylonmembran („UV-Stratalinker 1800“ von Stratagene, 120 mJ) quervernetzt. Anschließend wurde die Membran direkt hybridisiert oder bei RT gelagert.

### **Hybridisierung und Detektion von DNA-Sequenzen**

Die Hybridisierung der durch Southern Blot erhaltenen Nylonmembran mit einer DIG-markierten Sonde erfolgte in Hybridisierungsröhren. Dazu wurde die Membran zunächst für 1 Stunde in 6x SSC mit 0,5 % „Blocking“-Reagenz bei RT im Hybridisierungssofen inkubiert. Darauf folgte eine 3stündige Prähybridisierung bei 55°C in 15 ml DIG-Hybridisierungspuffer mit 1/100 Vol. Heringssperma-DNA. Die Heringssperma-DNA wurde zuvor im kochenden Wasserbad 10 min denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Die Hybridisierung der DNA mit der DIG-markierten Sonde wurde über Nacht bei 55°C in DIG-Hybridisierungspuffer mit 1/100 Vol. denaturierter Heringssperma-DNA und 25 ng/ml denaturierter Sonde durchgeführt. Nach Abschluss der Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener DNA-Sonde zwei Mal 5 min in je 15 ml 2x SSC mit 0,1 % SDS bei RT und anschließend zwei Mal 15 min in 0,1x SSC mit 0,1 % SDS bei 68°C gewaschen. Darauf folgte die Detektion der gebundenen DIG-markierten Sonde. Dazu wurde die Membran zunächst 5 min in DIG-Waschpuffer und anschließend 30 min in DIG-Puffer 2 bei RT inkubiert. Dieser wurde durch 10 ml DIG-Puffer 2 mit DIG-Antikörper-Konjugat (Anti-DIG~AP) ersetzt und weitere 30 min bei RT inkubiert. Darauf folgten drei 10minütige Waschschrte in DIG-Waschpuffer bei RT. Anschließend wurde die Membran kurz in DIG-Puffer 3 äquilibriert, auf eine Einschweißfolie gelegt und mit 500 µl Substratlösung (1:100 CSPD in DIG-Puffer 3) überschichtet. Nach kurzer Einwirkzeit von 1 - 2 min wurde die CSPD-Substrat-Lösung ausgestrichen, die Nylonmembran eingeschweißt und 15 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Nylonmembran für 1 - 4 Stunden auf einem Röntgenfilm in einer Röntgenfilmkassette exponiert. Der Röntgenfilm wurde durch den Filmentwickler „Protec 45 compact“ (Protec) entwickelt.

Um die Nylonmembran mit einer weiteren DIG-markierten Sonde zu hybridisieren, wurde die gebundene Sonde nach der Detektion entfernt. Dazu wurde die Nylonmembran zunächst 5 min mit H<sub>2</sub>O bei RT in einer Hybridisierungsröhre gewaschen. Darauf folgten zwei Inkubationen für je 10 min bei 37°C in 0,2 N NaOH mit 0,1 % SDS und zwei Mal 15 min bei 37°C in 2x SSC. Anschließend konnte die Nylonmembran erneut prähybridisiert werden.

### **3.2.4 Protein-spezifische Methoden**

#### **Isolation von mitochondrialen Proteinen aus *Podospora anserina***

Die Isolation von Mitochondrien wurde nach dem von Gredilla et al. (Gredilla et al. 2006) veröffentlichten Protokoll durchgeführt. Allerdings wurde die resuspendierte mitochondriale Fraktion nach dem letzten Zentrifugationsschritt auf einen Saccharosegradienten aufgetragen. Dieser bestand aus 4 ml einer 50 %igen, 4 ml einer 36 %igen und 2 ml einer 20 %igen Saccharoselösung, die vorsichtig in Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert wurden. Durch Ultrazentrifugation (15 min, 25.000 UpM, 4°C, TH641) wurden die Vakuolen von den Mitochondrien getrennt und die mitochondriale Bande vollständig in ein SS34-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden zu 2/3 mit BSA-freiem Mitochondrien-Isolationspuffer aufgefüllt und für 20 min bei 11.500 UpM (Sorvall SS34)

bei 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in 50 - 300 µl BSA-freiem Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt und aliquotiert. Daraufhin wurden die Mitochondrien erneut sedimentiert (10 min, 11.000 UpM, FA-45-24-11, 4°C), der Überstand abgenommen und die Pellets bei -80°C gelagert.

Zur Analyse von Proteinmodifikationen wurden dem Mitochondrien-Isolationspuffer 50 mM DTT zugegeben. Für Western Blot-Analysen und zur Untersuchung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe wurde der Puffer mit 5 mM des Proteaseinhibitors ε-Aminocaprinsäure versetzt.

### **Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Roti-Nanoquant-Reagenz (Roth) nach dem Prinzip von Bradford bestimmt (Bradford 1976). Dabei wurde eine Eichgerade mit 0 µg, 5 µg, 10 µg und 20 µg BSA in 190 µl H<sub>2</sub>O erstellt. Zu jedem Ansatz wurden daraufhin 10 µl des Puffers und 800 µl einer 1:5-Verdünnung des Roti-Nanoquant-Reagenz gegeben und die Extinktion der Proben bei 450 nm und 590 nm photometrisch bestimmt. Freies Coomassie Blue absorbiert bei 470 nm, während Protein-gebundenes Coomassie bei 595 nm absorbiert. Aus den Quotienten der beiden Werte kann durch lineare Regression eine Eichgerade erstellt werden.

Zur Bestimmung der Protein-Konzentration mitochondrialer Proteinextrakte wurden je 2 µl Probe mit 8 µl Puffer und 190 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Dies wurde mit 800 µl des verdünnten Roti-Nanoquant-Reagenz vermischt und die Absorption gemessen. Durch die Eichgerade kann mit dem erhaltenen Quotienten die Proteinkonzentration der Probe ermittelt werden.

### **Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden monophasische 10, 12 oder 12,5 %ige Glycin-SDS-Polyacrylamidgele bzw. biphasische 10 und 16 %ige Polyacrylamidgele verwendet (Tabelle 5 und 6). Die Auftrennung erfolgte im „Mini-Protean® II“-Elektrophorese-System (Bio-Rad) nach Herstellerangaben. Die Polyacrylamid-Sammelgele enthielten immer 4 % Acrylamid.

Für die Analysen wurden zwischen 30 und 100 µg mitochondriale Proteine mit 5x SDS-Ladepuffer versetzt und 10 min bei 95°C im Heizblock denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, kurz abzentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Zusätzlich wurden auf jedes Gel 1,5 µl des Markers „Page Ruler Prestained Protein Ladder #SM0671“ (MBI Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mit 1x SDS-Laufpuffer bei 100 V bis die Bromphenolblau-Front des Ladepuffers am unteren Ende des Gels austrat. Daraufhin wurde das Gel entweder für Western Blot-Analysen verwendet oder in Görg-Coomassie-Färbelösung gefärbt. Die Entfärbung erfolgte abwechselnd in Görg-Coomassie-Entfärbelösung und H<sub>2</sub>O.

Zur Analyse der Carbonylierung mitochondrialer Proteine wurden die Carbonylgruppen der Proteine vor der gelelektrophoretischen Auftrennung nach Herstellerangaben (Millipore) mit DNPH derivatisiert. Pro Probe wurden 20 µg Protein eingesetzt. Nach der Derivatisierung wurden die Proben direkt aufgetragen.

### **Transfer (Western Blot) und Immunodetektion von Proteinen**

Der Transfer von Proteinen aus denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (Millipore) erfolgte nach dem „wet/tank-blot“-Verfahren in der Western Blot-Apparatur „Mini-Protean® II“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben. Dazu wurde eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, 1 min in Methanol aktiviert und anschließend zusammen mit dem SDS-Polyacrylamidgel in Blotpuffer äquilibriert. Daraufhin wurde die Apparatur nach Herstellerangaben zusammengesetzt und die Proteine in Blotpuffer für 70 min bei 100 V und 4°C transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 min in Methanol fixiert und anschließend in H<sub>2</sub>O rehydriert. Danach wurde sie entweder in 1x PBS bei 4°C gelagert oder 1 Stunde schüttelnd bei RT in Odyssey-Blocking-Puffer (LI-COR® Biosciences) inkubiert. Nachdem die Membran abgesättigt war, wurde sie über Nacht bei 4°C mit 10 ml einer Erstantikörperlösung (Tabelle 16) schüttelnd inkubiert. Die Waschschritte und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgten nach Herstellerangaben (LI-COR® Biosciences). Zur Detektion wurde das „Odyssey Infrared Imaging System“ (LI-COR® Biosciences) verwendet.

### **Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)**

Die blau-native PAGE dient zur Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe und wird häufig zur Analyse von Membranproteinen verwendet. Zur Auftrennung wurden 4 - 13 %ige Gradientengele (10 x 15 cm) mit einem Gradientenmischer bei 4°C gegossen und nach der Polymerisation bei RT mit einem 3,5 %igen Sammelgel überschichtet (Tabelle 7; Wittig et al. 2006).

Vor der Auftrennung der mitochondrialen Proteine wurden die Membranproteine mit Digitonin im Verhältnis 3 g Digitonin pro g Protein solubilisiert. Dazu wurden je 100 µg Proteinpellet in 27 µl Solubilisierungspuffer resuspendiert, mit 3 µl 10 %igem Digitonin vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Proben 30 min bei 15.000 UpM (FA-45-24-11) bei 4°C zentrifugiert und der Überstand mit den solubilisierten Komplexen vollständig in ein neues 1,5 ml-Reagiergefäß überführt. Der Überstand wurde mit 3,5 µl 50 %igem Glycerin und 1,5 µl 5 %igem Coomassie versetzt und auf das Gel aufgetragen. Ein Marker wurde nicht aufgetragen, da sich das Laufverhalten membrangebundener Proteinkomplexe von dem der in Markern enthaltenen löslichen Proteine unterscheidet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Elektrophorese-System „Protean® II“ (Bio-Rad) bei 4°C. Als Kathodenpuffer wurde zunächst Kathodenpuffer B mit 0,02 % Coomassie Blue verwendet, während der Anodentank mit Anodenpuffer befüllt wurde. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 1 - 1,5 Stunden bei einer Span-

nung von 100 V. Sobald die Proben deutlich aus den Taschen gewandert waren, wurde die Spannung auf 500 V bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel erhöht. Nachdem die Proben etwa die Hälfte des Gels durchwandert hatten, wurde der Kathodenpuffer B aus dem Kathodentank abgesaugt und durch Kathodenpuffer B/10 mit 0,002 % Coomassie Blue ersetzt. Die Auftrennung wurde gestoppt sobald die Coomassie-Front am unteren Ende des Gels austrat. Daraufhin wurde das Gel kurz in H<sub>2</sub>O gespült und über Nacht in Görg-Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach der Entfärbung des Gels, die abwechselnd mit H<sub>2</sub>O und Görg-Coomassie-Entfärbelösung erfolgte, wurde dieses auf einem Leuchttisch fotografiert und densitometrisch mit dem Programm ‚Quantity One®‘ (Bio-Rad) ausgewertet. Zur *in-gel*-Färbung der Komplexe I und IV der Atmungskette wurde das ungefärbte Gel zwischen den Glasplatten über Nacht bei 4°C in Frischhaltefolie aufbewahrt.

### ***in-gel*-Färbung von Komplex I und Komplex IV der Atmungskette**

Die *in-gel*-Färbungen von Komplex I und Komplex IV erfolgten nach Jung et al. (Jung et al. 2000).

#### **Nachweis der NADH-Dehydrogenase-Aktivität (Komplex I)**

Zum Nachweis der Aktivität von NADH-Dehydrogenasen wie Komplex I der mitochondrialen Atmungskette wurde das Gel schüttelnd in Komplex I-Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Durch die Aktivität der NADH-Dehydrogenase (N-Modul, Brandt 2006) wird das zugegebene NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert und NBT<sup>2+</sup> in violette Formazan (NBT) umgewandelt. Das Gel wurde dabei in Abständen von 15 min auf einem Leuchttisch fotografiert. Zur densitometrischen Auswertung der im RGB-Format digitalisierten Abbildung wurden nur der Rot- und Grün-Kanal berücksichtigt und das Gel mit dem Programm ‚Quantity One®‘ (Bio-Rad) ausgewertet.

#### **Nachweis der Häm-Gruppen der Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV)**

Die Untersuchung der ‚Aktivität‘ der Cytochrom c-Oxidase beruht auf einer Häm-Färbung mit Diaminobenzidin (DAB). Dieses wird in Bereichen mit Komplex IV mit intakten Hämen zu einem bräunlichen Farbstoff oxidiert. Dazu wurde das Gel schüttelnd in Komplex IV-Färbelösung im Dunkeln inkubiert und in Abständen von 15 min auf einem Leuchttisch fotografiert. Die densitometrische Auswertung der im RGB-Format digitalisierten Abbildungen erfolgte mit dem Programm ‚Quantity One®‘ (Bio-Rad), wobei nur der Rot- und Grün-Kanal berücksichtigt wurden.

#### **Photometrische Bestimmung der Aktivität von Komplex I**

Die Messung der katalytischen Aktivität von Komplex I erfolgte nach dem Protokoll von Tocilescu et al. (Tocilescu et al. 2007). Dazu wurde die Oxidation von NADH in Gegenwart des Komplex I-spezifischen Elektronenakzeptors Hexamineruthenium(III)chlorid (HAR; Sled & Vinogradov 1993) bzw. des Komplex I-spezifischen Substrats dNADH mit dem Elektronenakzeptor n-Decyl-Benzochinon (DBQ) untersucht (SPECTRAMax PLUS<sup>384</sup>, Molecular Devices).

Aus der Abnahme der Extinktionsdifferenz ( $E_{340} - E_{400}$ ) mit der Zeit wurde die Steigung der Geraden ermittelt. Dabei wurde für NADH und dNADH ein Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) von  $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  zugrundegelegt.

Die Bestimmung der NADH:HAR-Oxidoreduktase-Aktivität wurde in HAR-Puffer mit  $200 \mu\text{M}$  NADH und  $2 \text{ mM}$  HAR bei  $27^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von  $50 \mu\text{g}$  mitochondrialer Proteine ( $2,5 \text{ mg/ml}$  in BSA-freiem Mitochondrien-Isolationspuffer) gestartet (Endvolumen  $200 \mu\text{l}$ ). Die NADH:HAR-Aktivität dient zur Abschätzung des Komplex I-Gehalts der Probe.

Für die Messung der katalytischen Komplex I-Aktivität wurde dNADH als Elektronendonator und das Ubichinon-Analog DBQ als Elektronenakzeptor verwendet. Durch Zugabe von 2-n-Decylchinazolin-4-yl-amin (DQA) wird die Aktivität von Komplex I inhibiert. Daher wurde zunächst die dNADH:DBQ-Oxidoreduktase-Aktivität und daraufhin die Aktivität in Gegenwart von DQA bestimmt. Dazu wurden  $70 \mu\text{M}$  DBQ vorgelegt und die Messung durch Zugabe von DBQ-Puffer mit  $100 \mu\text{M}$  dNADH und  $100 \mu\text{g}$  mitochondrialen Proteinen ( $5 \text{ mg/ml}$  in BSA-freiem Mitochondrien-Isolationspuffer) gestartet (Endvolumen  $200 \mu\text{l}$ ). Zur Bestimmung der Aktivität in Gegenwart des Inhibitors DQA wurden  $70 \mu\text{M}$  DBQ und  $20 \mu\text{M}$  DQA vorgelegt und erneut mitochondriale Proteine in DBQ-Puffer mit dNADH zugegeben. Die Aktivität mit DQA wird von der DBQ-Aktivität abgezogen und spiegelt den Inhibitor-sensitiven Teil der Komplex I-Aktivität. Normiert wurde dieser Wert auf den Komplex I-Gehalt (NADH:HAR-Aktivität) der Probe.

## 2D-DIGE

2D-DIGE („2-dimensional difference gel electrophoresis“) ist eine auf 2D-PAGE basierende Methode zur Untersuchung differenziell gebildeter Proteine, bei der durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zwei Proben in einem Ansatz analysiert werden können. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (GE Healthcare).

Zur Vorbereitung der Proben wurden je  $100 \mu\text{g}$  sedimentierte mitochondriale Proteine in  $20 \mu\text{l}$  DIGE „labeling“-Puffer resuspendiert und  $30 \text{ min}$  auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation für  $10 \text{ min}$  bei  $22.000 \text{ g}$  bei  $4^\circ\text{C}$  wurde der Überstand in ein neues  $1,5 \text{ ml}$ -Reagiergefäß überführt.  $10 \mu\text{l}$  jeder Probe ( $50 \mu\text{g}$ ) wurden zur Markierung mit den Cy-Farbstoffen verwendet,  $5 \mu\text{l}$  der Probe ( $25 \mu\text{g}$ ) wurden für den internen Standard zusammengegeben, und die restlichen  $5 \mu\text{l}$  jeder Probe wurden für das präparative Gel zur Identifizierung der Proteine vereinigt.

Vor Beginn der Markierung der zu vergleichenden Proben wurden die Cy-Farbstoffe („cyanine dye“; „CyDye DIGE Fluor, minimal labeling“-Kit, GE Healthcare) zunächst auf RT äquilibriert ( $\sim 5 \text{ min}$ ) und abzentrifugiert ( $30 \text{ s}$ ,  $22.000 \text{ g}$ , RT). Daraufhin wurde von den Farbstoffen Cy2, Cy3 und Cy5 jeweils eine Arbeitslösung hergestellt. Dazu wurden  $6,2 \mu\text{l}$  wasserfreies DMF zugegeben und  $30 \text{ s}$  bei  $22.000 \text{ g}$  bei RT zentrifugiert, sodass die Konzentration der Farbstoffe  $323 \text{ pmol}/\mu\text{l}$  betrug. Daraufhin wurden  $6 \mu\text{l}$  Cy2 zu dem den internen Standard bildenden Mix gegeben, vorsichtig gemischt und  $30 \text{ min}$  im Dunkeln im Eisbad inkubiert. Die Proben wurden mit jeweils  $1 \mu\text{l}$  Cy3 bzw. Cy5 versetzt, ebenfalls vermischt und  $30 \text{ min}$  im Dunkeln im Eisbad inkubiert. Zur internen Kontrolle wur-

den drei der sechs Wildstammproben mit Cy3 und die anderen drei mit Cy5 markiert, während die Proben der  $\Delta Palap$ -Stämme, von denen jeweils eine mit einer Wildstammprobe verglichen werden sollte, mit dem jeweils anderen Farbstoff markiert wurde („*dye-flip*“). Die Markierungsreaktion des Cy2-Ansatzes wurde mit 6  $\mu$ l DIGE „*stop*“-Lösung beendet, während die der Cy3- bzw. Cy5-Ansätze mit je 1  $\mu$ l DIGE „*stop*“-Lösung abgebrochen wurden. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die Proben 30 s bei 22.000 g bei RT zentrifugiert und über Nacht bei -20°C aufbewahrt.

Die Auftrennung in der ersten Dimension (isoelektrische Fokussierung, IEF) der Proteine erfolgte mit 24 cm langen „Immobiline™ DryStrips pH 3-10 NL“ (GE Healthcare) in einer Keramikschale mit dem Fokussierungssystem „Ettan IPGphor“ (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Dazu wurden die Proben zunächst auf Eis aufgetaut und die Proteine der zu vergleichenden Stämme zusammenpipettiert. Zu jedem Probenpärchen wurden je 10  $\mu$ l des mit Cy2-markierten internen Standards gegeben und alle sechs Proben mit je 60  $\mu$ l Rehydrierungspuffer versetzt. Daraufhin wurden die über Nacht bei RT in einer Quellkassette mit je 450  $\mu$ l Rehydrierungspuffer rehydrierten IPG-Streifen in der Keramikschale platziert und an den Enden mit wassergetränkten Filterpapieren bedeckt. Die Proben wurden nach der „*cup-loading*“-Methode an der Anodenseite des IPG-Streifens aufgetragen und die Streifen mit dünnflüssigem Paraffin überschichtet. Die IEF erfolgte bei 20°C im Dunkeln bis zum Erreichen von etwa 47.000 - 50.000 Volt-Stunden unter den in Tabelle 19 dargestellten Bedingungen. Pro Streifen wurde eine Stromstärke von 75  $\mu$ A angelegt.

**Tabelle 19: Protokoll der isoelektrischen Fokussierung.**

Schritt	Betriebsart	Spannung (V)	Zeit (Stunden)
1	„ <i>step and hold</i> “	150	3
2	„ <i>step and hold</i> “	300	3
3	Gradient	1.000	10
4	Gradient	8.000	3
5	„ <i>step and hold</i> “	8.000	5

Nach Abschluss der Fokussierung wurden die Gelstreifen äquilibriert. Dazu wurden sie zunächst 15 min bei RT im Dunkeln mit Äquilibrierungspuffer mit DTT inkubiert und anschließend 15 min bei RT im Dunkeln mit Äquilibrierungspuffer mit IAA. Daraufhin folgte die Auftrennung in der zweiten Dimension.

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurden 12,5 %ige Glycin-SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die mit dem „Ettan DALT*twelve* Gel Caster“ (GE Healthcare) gegossen wurden (Tabelle 6). Die äquilibrierten IPG-Streifen wurden mit je einem Filterpapier mit 5  $\mu$ l des Markers „PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0671“ (MBI Fermentas) auf die Polyacrylamid-Trenngele gelegt und mit 2 ml Agarose-Dichtung verschlossen. Die Elektrophorese erfolgte mit der „Ettan DALT*twelve* Separation Unit“ (GE Healthcare) mit 1x SDS-Laufpuffer in der unteren Pufferkammer und 2x SDS-Kathodenpuffer in der oberen Kammer bei 20°C. Die Proben wurden zunächst für eine Stunde bei 0,5 W/Gel und anschließend 16 Stunden bei 1,5 W/Gel aufgetrennt.

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung wurden die Gele aus der Laufkammer entnommen, mit H<sub>2</sub>O abgewaschen und bei 4°C gelagert. Vor dem Scannen der Gele mit dem Laserscanner „Typhoon 9400“ (Amersham Biosciences) wurden die Glasplatten erneut mit H<sub>2</sub>O und Ethanol gereinigt. Die drei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe wurden nacheinander angeregt.

**Tabelle 20: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore.** Die Angaben zu den Absorptions- und Emissionseigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe wurden dem ‚Typhoon: User’s Guide v3.0 for Microsoft Windows‘ (Amersham Biosciences) entnommen.

Fluorophor	Absorptionsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)
Cy2	489	506
Cy3	550	570
Cy5	649	670

Für jedes verwendete Fluorophor wird ein separates Bild erstellt und gespeichert. Bei einem Vor-Scan mit einer Auflösung von 1.000 µm pro Pixel wurden die Scan-Parameter überprüft. Der Photoelektronenvervielfacher („*photomultiplier tube*“, PMT) wurde auf 600 V eingestellt und der Fokus auf 3 mm. Je nach Signalstärke wurde der PMT angepasst. Der Haupt-Scan wurde mit einer Auflösung von 100 µm pro Pixel durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm ‚DeCyder™‘ (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Die einzelnen ‚Proteinspots‘ wurden mit dem internen Standard normalisiert und statistisch ausgewertet (T-Test). ‚Proteinspots‘, die in den analysierten Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen signifikant ( $p < 0,05$ ) differenziell exprimiert wurden, und deren Mengen sich um mindestens 20 % unterschieden, wurden aus dem Silber-gefärbten präparativen Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch durch das ‚Labor Redox-Proteomics‘ (AK Brandt, Molekulare Bioenergetik, Frankfurt) analysiert.

### Silberfärbung

Die Silberfärbung von Polyacrylamidgelen ist eine sehr sensitive Färbemethode, durch die auch geringe Proteinmengen detektiert werden können. Zur Färbung des präparativen Gels der 2D-DIGE-Analyse wurde eine für MALDI-MS geeignete Methode verwendet. Das Protokoll basiert auf Blum et al. (Blum et al. 1987) und wurde nach Rais et al. (Rais et al. 2004) modifiziert. Dazu wurden die Proteine zunächst 30 min schüttelnd bei RT in 50 % (v/v) Methanol mit 10 % (v/v) Essigsäure fixiert und gefällt. Darauf folgten zwei Waschschrte für jeweils 30 min in H<sub>2</sub>O bevor das Gel für 30 min in 0,005 %iger (w/v) Natriumthiosulfatlösung sensibilisiert wurde. Anschließend wurde das Gel 30 min in einer 0,1 %igen (w/v) Silbernitratlösung inkubiert, wobei sich die Silberionen an negativ geladene Seitenketten anlagern. Vor der Entwicklung wurde überschüssiges Silber durch kurzes Spülen der Geloberfläche entfernt. Die Entwicklung erfolgte in 0,036 % (v/v) Formaldehyd mit 2 % (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> für wenige Minuten. Durch die Zugabe von alkalischem Formaldehyd werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und als schwarze Stellen sichtbar. Die Reaktion wurde durch 15minütige Inkubation in 50 mM EDTA (pH 8) gestoppt.

## ICAT

ICAT („*isotope-coded affinity tag*“) ist eine Gel-freie Methode zur Analyse komplexer Proteingemische. Die Durchführung des „Cleavable ICAT® Reagent Kit for Protein Labeling“ erfolgte nach Herstellerangaben (Applied Biosystems). Dabei werden die Proteine an Cystein-Seitenketten durch kovalente Bindung mit dem ICAT-Reagenz markiert, welches aus drei Elementen besteht. Durch die reaktive Gruppe (Iodoacetamid) wird das ICAT-Reagenz kovalent mit dem Protein verbunden. Darauf folgt ein Isotop-markierter Bereich ( $C_{10}H_{17}N_3O_3$ ), wobei das schwere Reagenz  $^{13}C$  beinhaltet und das leichte  $^{12}C$ . Die Isotop-markierten Bereiche verhalten sich chemisch identisch, jedoch führt die Markierung zu einem Masseunterschied von 9 Dalton pro Cystein. Dieser Unterschied erlaubt einen massenspektrometrischen Vergleich von mit dem schweren und dem leichten Reagenz markierten Peptiden zweier Proben. Der Isotop-markierte Bereich ist über ein trennbares Verbindungsstück an Biotin gekoppelt, wodurch die Peptide durch Affinitätsreinigung angereichert werden können. Durch die Analyse der markierten Peptide der Proteine hat die ICAT-Methode gegenüber der klassischen 2D-PAGE den Vorteil, dass sowohl Proteine mit extrem sauren oder basischen isoelektrischen Punkten, Proteine mit sehr hohem oder sehr geringem Molekulargewicht, selten vorkommende Proteine und membrangebundene Proteine besser vertreten sind.

Zur Analyse der mitochondrialen Proteome vom Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamm wurden je 100  $\mu g$  sedimentierte mitochondriale Proteine auf Eis mit 40  $\mu l$  frischem Denaturierungsreduzierungsbuffer versetzt und durch 1minütiges Mischen (Vortex) und 10minütige Sonifizierung im Wasserbad resuspendiert. Daraufhin wurden die Proben kurz zentrifugiert, 20 min bei 55°C inkubiert, erneut kurz zentrifugiert und auf Eis gehalten.

Währenddessen wurden je eine Ampulle „Cleavable ICAT Reagent Light“ und „Cleavable ICAT Reagent Heavy“ bei RT aufgetaut und kurz abzentrifugiert. Die Reagenzien wurden in je 20  $\mu l$  Acetonitril durch kurzes Mischen (Vortex) gelöst, kurz abzentrifugiert und mit je 40  $\mu l$  50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) versetzt. Daraufhin wurden die zu markierenden Proteine vollständig zu den Reagenzien gegeben. Die Proteine des Wildstamms wurden mit dem leichten Reagenz inkubiert, die des  $\Delta Palap$ -Stamms mit dem schweren Reagenz. Die Ansätze wurden zwei Mal kurz gemischt (Vortex) und abzentrifugiert, und bei RT inkubiert. Nach 2 Stunden wurden je 10  $\mu l$  DTT-Lösung zugegeben, kurz gemischt, abzentrifugiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Ansätze vereinigt und Trypsin zugegeben. Dazu wurden 4  $\mu g$  Trypsin mit 220  $\mu l$  50 mM Tris-Puffer (pH 8,5) versetzt, gemischt (Vortex) und abzentrifugiert. Nach der Zugabe zu den markierten Proteinen wurde der Ansatz ebenfalls gemischt, kurz abzentrifugiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Darauf folgte die Aufreinigung der Peptide. Dazu wurde zunächst der Trypsin-Verdau durch die Zugabe von 20  $\mu l$  reiner Ameisensäure gestoppt. Der Ansatz wurde kurz gemischt, abzentrifugiert und der pH-Wert mit 1  $\mu l$  der Suspension überprüft. Dieser sollte < 3 sein und bei Bedarf mit mehr Ameisensäure angepasst werden. Daraufhin wurde eine C18-Kartusche mit 2x 100  $\mu l$  reinem Acetonitril äquilibriert und der Ansatz zwei Mal durch die Säule

gegeben. Die Kartusche wurde mit 2x 1 ml C18-Puffer A gewaschen und die Peptide mit 2x 100 µl C18-Puffer B in ein 1,5 ml-Reagiergefäß eluiert. Die eluierten Peptide wurden unter Vakuum für etwa 2 Stunden getrocknet.

Währenddessen wurde die Avidin-Kartusche zur Anreicherung der markierten Peptide vorbereitet. Dazu wurde die Säule nach Herstellerangaben (Applied Biosystems) mit den beigegeführten Puffern aktiviert. Daraufhin wurden die getrockneten Peptide in 500 µl „Affinity Buffer-Load“ und 500 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Der pH sollte bei 7 liegen und bei Bedarf mit „Affinity Buffer-Load“ angepasst werden. Nach kurzem Mischen und Zentrifugieren wurden die gelösten Peptide langsam (1 Tropfen/Sekunde) auf die Säule gegeben. Der Durchfluss wurde aufgefangen und enthält unmarkierte Peptide. Zur weiteren Entfernung nicht-markierter Peptide wurden 500 µl „Affinity Buffer-Load“ injiziert und der Durchfluss ebenfalls gesammelt. Um die Salzkonzentration zu reduzieren wurden 500 µl „Affinity Buffer-Wash 1“ injiziert, gefolgt von 500 µl „Affinity Buffer-Wash 2“ und 1 ml H<sub>2</sub>O. Die Elution der markierten Peptide erfolgte mit 800 µl „Affinity Buffer-Elute“. Dazu wurden zunächst langsam (1 Tropfen/Sekunde) 50 µl des Puffers injiziert und das Eluat verworfen. Daraufhin wurden die restlichen 750 µl injiziert und das Eluat aufgefangen. Dieses wurde gemischt, kurz zentrifugiert, unter Vakuum für 1 - 2 Stunden getrocknet und bei -20°C aufbewahrt.

Zuletzt wurde Biotin von den markierten Peptiden getrennt. Dazu wurden die getrockneten Peptide in 95 µl Reagenz A und 5 µl Reagenz B (Applied Biosystems) gelöst, gemischt, abzentrifugiert und 2 Stunden bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurden die Peptide für 30 - 60 min unter Vakuum getrocknet. Die massenspektrometrische Analyse der markierten Peptide erfolgte durch das ‚Labor Redox-Proteomics‘ (AK Brandt, Molekulare Bioenergetik, Frankfurt).

### **Erstellung des Homologiemodells**

Zur Analyse der möglichen räumlichen Strukturen von PalAP und YME1 wurde *in-silico* jeweils ein molekulares Homologiemodell erstellt. Dies erfolgte mit Hilfe der durch Röntgenkristallographie aufgeklärten Struktur des löslichen Teils des Homologs FtsH aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* (Bieniossek et al. 2006; PDB-Code 2cea). Dazu wurden die Aminosäuresequenzen von PalAP bzw. YME1 mit der des Referenzproteins FtsH durch den ‚ClustalW‘-Algorithmus verglichen und ausgerichtet. Auf der Basis dieser Sequenzausrichtung wurden die Strukturmodelle mit FtsH als Referenz durch den ‚SWISS-MODEL‘-Server erstellt („*alignment mode*“; Arnold et al. 2006b). Die Modelle (im PDB-Format) wurden mit dem Programm ‚JSCF Chimera‘ visualisiert (Pettersen et al. 2004).

### **Erstellung des Stammbaums**

Zur Einordnung von PalAP in die Familie der i-AAA Proteasen wurden die Aminosäuresequenzen der Proteine der verschiedenen Organismen mit dem ‚ClustalW‘-Algorithmus verglichen und mit Hilfe des Programms ‚Treeview‘ dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der i-AAA Protease von *Podospora anserina*, um Hinweise auf deren Rolle bei der Alterung des filamentösen Ascomyceten zu gewinnen. Die durchgeführten Untersuchungen gliedern sich in vier wesentliche Abschnitte.

Zunächst wurden die Auswirkungen der Deletion der i-AAA Protease *Palap* auf *P. anserina* während des Alterns analysiert. Der dafür verwendete Deletionsstamm  $\Delta Palap$  wurde von K. Luce (AK Osiewacz) bereitgestellt. Dabei wurden sowohl phänotypische und physiologische, als auch molekularbiologische und biochemische Eigenschaften des Stamms unter verschiedenen Temperaturbedingungen untersucht und mit dem Wildstamm verglichen.

Um Hinweise auf die biologische Rolle von PaIAP in *P. anserina* zu erhalten, wurden Proteomanalysen durchgeführt. Dabei wurden sowohl gezielt Proteine des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems untersucht, als auch die mitochondrialen Proteome von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen zur Identifizierung von Substratkandidaten miteinander verglichen. Darüber hinaus wurde der Einfluss von PaIAP auf membrangebundene Proteine wie die Atmungskettenkomplexe analysiert.

Zur Verifizierung des Zusammenhangs zwischen dem Verlust von *Palap* und den beobachteten Eigenschaften des Deletionsstamms wurde das Wildtypgen wieder in den Deletionsstamm eingeführt und die daraus resultierenden Revertanten charakterisiert. Um darüber hinaus die Bedeutung der AAA- und der proteolytischen Domäne abzuschätzen, wurden proteolytisch inaktive Formen von PaIAP im  $\Delta Palap$ -Stamm exprimiert und deren Einfluss auf die Alterung von *P. anserina* untersucht.

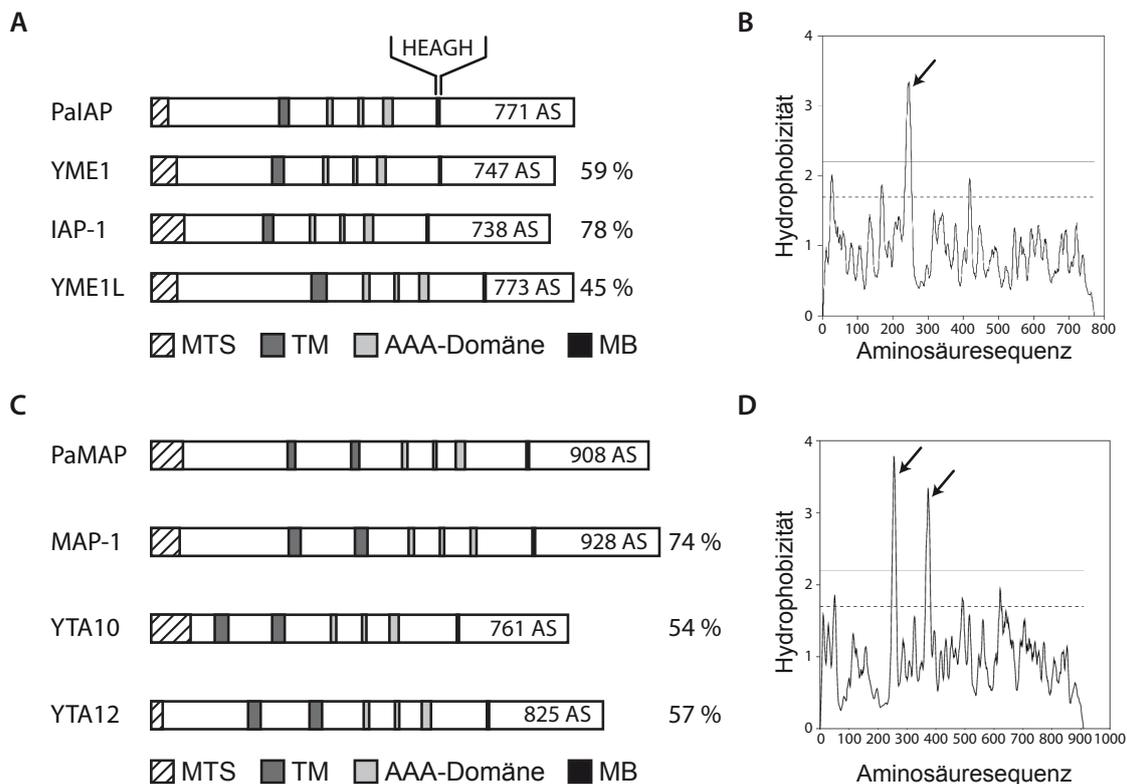
Schließlich wurde eine Doppeldeletionsmutante hergestellt, der neben der i-AAA Protease auch die in der Matrix lokalisierte PaCLPP-Untereinheit der PaCLXP-Protease fehlt. Die Charakterisierung dieses Stamms sollte Aufschlüsse über Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Funktionen der beiden Proteasen geben.

### 4.1 Deletion der i-AAA Protease in *Podospora anserina*

Um einen Einblick in die Bedeutung der i-AAA Protease für die Alterung des filamentösen Ascomyceten *P. anserina* zu erhalten, sollte das Gen durch homologe Rekombination im Wildstamm ‚s‘ deletiert werden. Da sich die i-AAA und die m-AAA Protease sehr ähnlich sind, wurden zunächst *in-silico*-Analysen durchgeführt und die Aminosäuresequenzen der beiden Proteasen charakterisiert.

#### 4.1.1 Identifizierung der i-AAA und m-AAA Protease bei *Podospira anserina*

Im Genom von *P. anserina* wurde ein offener Leserahmen identifiziert, der für ein Protein kodiert, das große Sequenzähnlichkeit zur Untereinheit IAP-1 der i-AAA Protease aus *N. crassa* aufweist (Klanner et al. 2001; Espagne et al. 2008). Dementsprechend erhielt das Protein den Namen PaIAP für *P. anserina* i-AAA Protease (Osiewacz et al. 2010).



**Abb. 6: In-silico-Charakterisierung der Proteinsequenzen der i-AAA Protease PaIAP und der m-AAA Protease PaMAP. (A)** Die Domänenstruktur der i-AAA Proteasen ist sehr konserviert zwischen verschiedenen Organismen. Die Sequenzen der homologen Proteine PaIAP aus *P. anserina*, YME1 aus *S. cerevisiae*, IAP-1 aus *N. crassa* und YME1L aus *H. sapiens* bestehen aus einer mitochondrialen Signalsequenz (MTS), einer transmembranen Domäne (TM), der konservierten AAA-Domäne, die das Walker A- und B-Motiv sowie die „second region of homology“ enthält, und dem Metall-bindenden Motiv (MB), welches als katalytisches Zentrum fungiert. Die Aminosäuresequenz des Metallbindemotivs von PaIAP lautet HEAGH und ist oberhalb des Proteins dargestellt. Die Längen der Aminosäuresequenzen liegen zwischen 738 Aminosäuren (AS) bei IAP-1 und 773 Aminosäuren bei YME1L. Die Sequenzähnlichkeit von PaIAP zu den anderen i-AAA Proteasen beträgt 59 %, 78 % bzw. 45 %. **(B)** Die Aminosäuresequenz von PaIAP enthält eine für i-AAA Proteasen typische transmembrane Region (Pfeil). Hydrophobe Sequenzbereiche sind oberhalb der gestrichelten Linie dargestellt, hydrophile Bereiche unterhalb der Linie. Das Hydrophobizitätsprofil von PaIAP wurde mit dem Programm ‚DAS‘ erstellt. **(C)** Die Domänenstruktur der m-AAA Protease ähnelt der der i-AAA Protease und ist ebenfalls sehr konserviert. Die Aminosäuresequenzen von PaMAP aus *P. anserina*, MAP-1 aus *N. crassa*, und die der beiden Untereinheiten der hetero-oligomeren m-AAA Protease YTA10 und YTA12 aus *S. cerevisiae* besitzen neben den bei der i-AAA Protease vorhandenen Domänen eine zweite transmembrane Domäne. Die Länge der Aminosäuresequenzen variiert zwischen 761 Aminosäuren (AS) bei YTA10 und 928 Aminosäuren bei MAP-1. Die Ähnlichkeit der Sequenz von PaMAP zu denen der anderen m-AAA Proteasen beträgt 74 %, 54 % und 57 %. **(D)** Die Aminosäuresequenz von PaMAP weist die für m-AAA Proteasen typischen zwei hydrophoben Bereiche (Pfeile) auf, in denen sich die transmembranen Domänen befinden. Das Hydrophobizitätsprofil von PaMAP wurde mit dem Programm ‚DAS‘ erstellt (A und B modifiziert nach Weil et al. 2011).

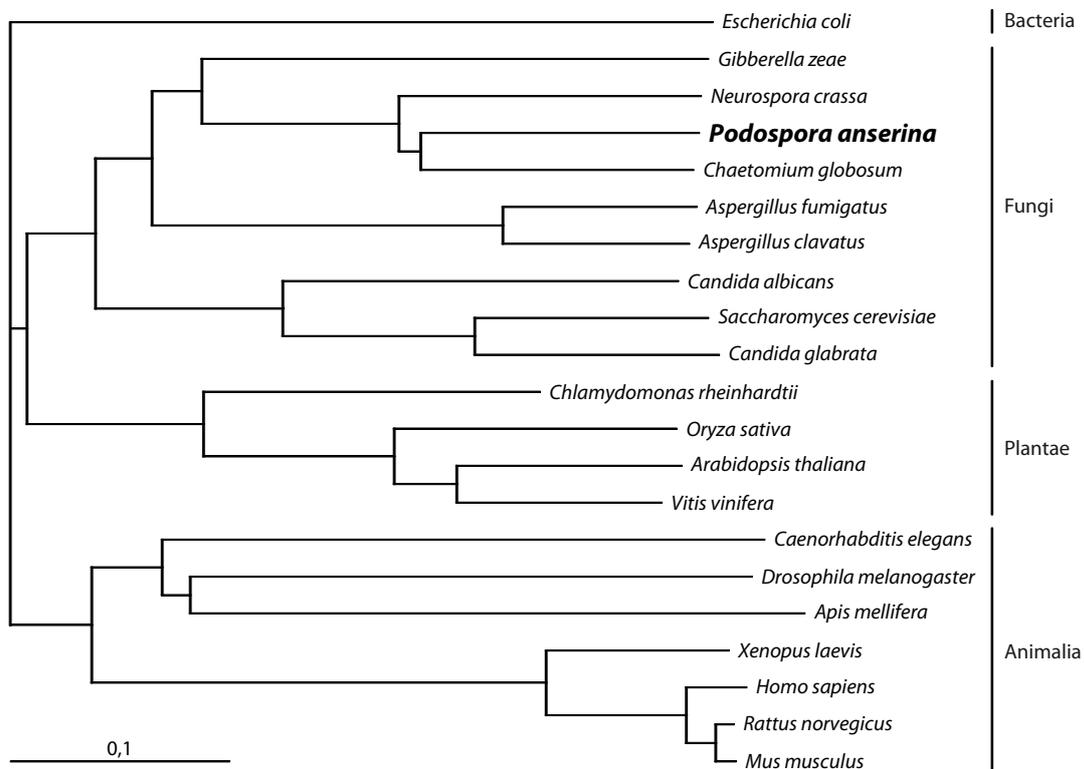
Der offene Leserahmen von *Palap* kodiert für ein Polypeptid mit einer Länge von 771 Aminosäuren, wobei die ersten ~ 113 Aminosäuren die typische Ladungsverteilung eines mitochondrialen Signalpeptids aufweisen (Abb. 6A und Anhang Abb. 44). Die Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation beträgt dabei ~ 87 %. Nach dem Import des Proteins und der Abspaltung des Signalpeptids hat PalAP ein relatives Molekulargewicht von ~ 71 kDa. *In-silico*-Analysen zeigen, dass PalAP die typische Domänenstruktur der Untereinheiten der i-AAA Protease aus anderen Organismen teilt. In Aminosäuresequenzvergleichen mit YME1 aus *S. cerevisiae*, IAP-1 und YME1L aus *H. sapiens* wird deutlich, dass besonders die AAA-Domäne von PalAP mit den Walker A- und Walker B-Motiven, sowie der „*second region of homology*“ sehr konserviert sind (vgl. 1.2 und Anhang Abb. 44). Das Metall-bindende Motiv der proteolytischen Domäne mit dem konservierten HExxH-Motiv ist darüber hinaus in den homologen Proteinen fast identisch, sodass PalAP den Zinkionen-abhängigen Metallopeptidasen zugeordnet werden kann (Bieniossek et al. 2006). Im weniger homologen N-terminalen Bereich befindet sich die für die Topologie der i-AAA Protease verantwortliche transmembrane Domäne, welche im Hydrophobizitätsprofil des Polypeptids PalAP als deutlich hydrophober Abschnitt erkennbar ist (Abb. 6B). Insgesamt weist die Aminosäuresequenz von PalAP eine Ähnlichkeit zu den Sequenzen von YME1, IAP-1 und YME1L von 59 %, 78 % bzw. 45 % auf.

Die innere Mitochondrienmembran von *P. anserina* enthält eine weitere membrangebundene AAA-Protease, die zur Matrix orientierte m-AAA Protease PaMAP (***P. anserina* m-AAA Protease**; Osiewacz et al. 2010). Der offene Leserahmen von *PaMap* kodiert für ein 908 Aminosäuren langes Polypeptid, welches ein ~ 59 Aminosäuren langes Signalpeptid besitzt und mit einer Wahrscheinlichkeit von ~ 98 % mitochondrial lokalisiert ist. Der Aufbau der m-AAA Protease ähnelt dem der i-AAA Protease (Abb. 6C). Die *in-silico*-Analyse zeigt die für AAA-Proteasen typische Gliederung. So weist PaMAP sowohl die hochkonservierte AAA-Domäne als auch die darauf folgende proteolytische Domäne mit dem Metallbindungsmotiv HExxH auf. Anders als bei der i-AAA Protease enthält der N-terminale Bereich der m-AAA Protease zwei transmembrane Domänen, die für die Orientierung des Proteins zur Matrixseite verantwortlich sind. Dementsprechend werden im Hydrophobizitätsprofil der Polypeptidsequenz von PaMAP zwei hydrophobe Abschnitte deutlich (Abb. 6D). Somit können die Aminosäuresequenzen von PalAP und PaMAP eindeutig voneinander unterschieden werden. Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von PaMAP zu der von MAP-1 aus *N. crassa*, sowie YTA10 und YTA12 aus *S. cerevisiae* beträgt 74 %, 54 % bzw. 57 %. Während die m-AAA Protease bei *P. anserina* und *N. crassa* jeweils aus einem homo-oligomeren Komplex besteht, bilden YTA10 und YTA12 in *S. cerevisiae* einen hetero-oligomeren m-AAA Protease-Komplex (vgl. 1.4.1).

Im Genom von *P. anserina* sind zwei Gene enthalten, die für die AAA-Proteasen PaIAP und PaMAP kodieren. Diese können jedoch deutlich voneinander unterschieden werden.

#### 4.1.2 Einordnung von PaIAP in die Proteinfamilie der i-AAA Proteasen

Zur Einordnung von PaIAP in die Proteinfamilie der i-AAA Proteasen wurde ein Stammbaum mit i-AAA Proteasen aus unterschiedlichen Organismen der Reiche Bacteria, Fungi, Plantae und Animalia erstellt. Die Aminosäuresequenzen der Proteine wurden verglichen und in einem Stammbaum dargestellt (Abb. 7).



**Abb. 7: Stammbaum von mitochondrialen i-AAA Proteasen aus verschiedenen Organismen.** Zur Einordnung der i-AAA Protease PaIAP aus *Podospira anserina* wurde die Aminosäuresequenz mit der anderer i-AAA Proteasen aus verschiedenen Organismen der Reiche Fungi, Plantae und Animalia, sowie mit bakteriellem FtsH verglichen. PaIAP ist am nächsten verwandt mit der i-AAA Protease aus dem Ascomycet *Chaetomium globosum*, über die bisher nichts bekannt ist, und aus *Neurospora crassa*. Ein Abstand von 0,1 im Stammbaum entspricht einem ausgetauschten Nukleotid im Gen für das entsprechende Protein. Eine Tabelle mit den Identifizierungsnummern der Proteine der verschiedenen Organismen befindet sich im Anhang (Tabelle 22).

Dabei wird durch die geringen Abstände deutlich, dass die Proteinfamilie der i-AAA Proteasen sehr konserviert ist. PaIAP ist in das Reich Fungi eingeordnet und am nächsten verwandt mit der i-AAA Protease aus dem Ascomycet *Chaetomium globosum*, über die bisher nichts bekannt ist. Die nächsthöhere Verwandtschaft besteht zu IAP-1 aus *N. crassa*, zu der bereits Untersuchungen durchgeführt wurden

(Klanner et al. 2001; Gräf et al. 2007). Die bisher am besten charakterisierte i-AAA Protease YME1 aus *S. cerevisiae* (vgl. 1.4.2.1) ist ebenfalls ins Reich Fungi eingeordnet, wobei der Abstand zu PalAP deutlich größer ist als der zwischen PalAP und IAP-1. Die beiden anderen i-AAA Proteasen AtFtsH4 aus *A. thaliana* und YME1L aus *H. sapiens*, die ebenfalls bereits untersucht wurden (vgl. 1.4.2.4 und 1.4.2.5), befinden sich im Reich Plantae bzw. Animalia und weisen größere Sequenzunterschiede zu PalAP auf als die Proteine aus dem Reich Fungi. FtsH aus *E. coli* ist dagegen als prokaryotisches Protein im Stammbaum deutlich abgegrenzt von den Proteinen aus den übrigen Organismen.

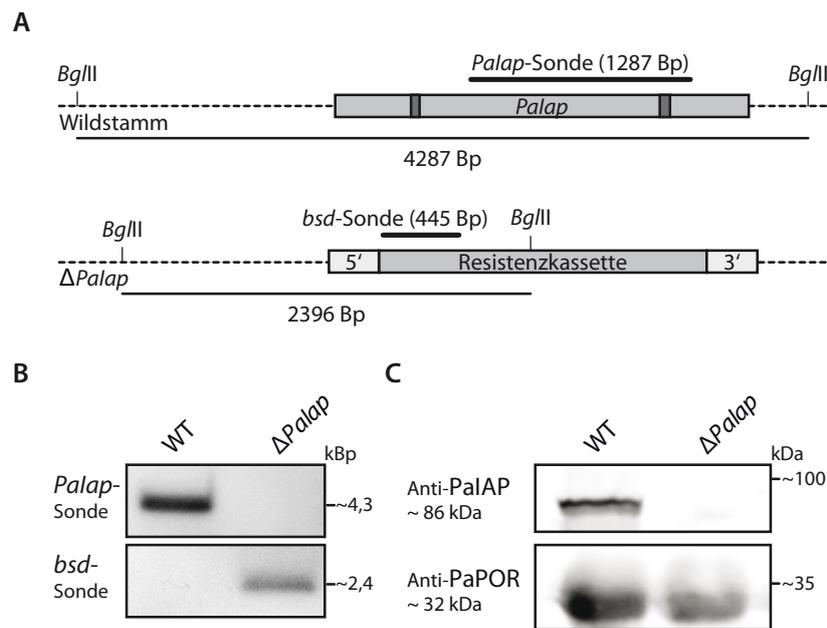
Während in eukaryotischen Mitochondrien zwei membrangebundene AAA Proteasen vorhanden sind, enthalten die meisten Bakterien nur eine in der Plasmamembran verankerte AAA Protease, von denen FtsH aus *E. coli* die bekannteste ist (Langer 2000). Somit weist FtsH hohe Sequenzhomologie sowohl zur Untereinheit der i-AAA Protease als auch zu denen der m-AAA Protease auf (Thorsness et al. 1993; Guélin et al. 1994). Interessanterweise konnten dagegen in Archaeen bisher keine homologen Proteine identifiziert werden (Langer 2000).

#### 4.1.3 Verifizierung der Deletion von *Palap* im Deletionsstamm $\Delta Palap$

Um die Rolle der i-AAA Protease PalAP für die Alterung von *P. anserina* zu untersuchen, wurde der offene Leserahmen von *Palap* durch homologe Rekombination im Wildstamm ‚s‘ von K. Luce (AK Osiewacz) deletiert. Dabei wurde das Gen, welches aus 2.426 Basenpaaren besteht und zwei Introns aufweist (Abb. 8A), durch eine Resistenzkassette ersetzt (Hamann et al. 2005).

Der zur Verfügung gestellte Deletionsstamm wurde zunächst auf DNA- und auf Protein-Ebene überprüft (Abb. 8). Dazu wurde DNA aus Wild- und *Palap*-Deletionsstammmyzel isoliert und diese durch eine Southern Blot-Analyse mit einer spezifischen *Palap*-Sonde überprüft (Abb. 8A und B). Während bei der DNA des Wildstamms das bei Verdau mit *Bgl*III erwartete *Palap*-Fragment bei ~ 4,3 kBp nachgewiesen werden kann, ist dieses im  $\Delta Palap$ -Stamm nicht detektierbar. Dagegen kann das Blasticidin-Gen (*bsd*) in der Phleomycin-Resistenzkassette als ~ 2,4 kBp großes Fragment nur im Genom des  $\Delta Palap$ -Stamms nachgewiesen werden, während das Signal in der Wildstamm-Probe fehlt.

Zusätzlich wurde der Verlust von PalAP in mitochondrialen Proteinextrakten des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms durch Western Blot-Analyse mit einem neusynthetisierten Peptid-Antikörper gegen PalAP bestätigt (Abb. 8C). Nach Inkubation mit dem PalAP-Antikörper wird im mitochondrialen Proteinextrakt des Wildstamms ein Signal bei ~ 86 kDa detektiert, welches im  $\Delta Palap$ -Isolat fehlt. Dabei ist PalAP nur in mitochondrialen Proteinextrakten nachweisbar, in Gesamtproteinextrakten konnte kein Signal festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Das Molekulargewicht von PalAP wurde anhand der Banden des Markers bestimmt und ist größer als theoretisch berechnet (vgl. 4.1.1).



**Abb. 8: Verifizierung der verwendeten  $\Delta$ Palap-Isolate.** (A) Schematische Darstellung des Gens *Palap* im Genom des Wildstamms mit der für die Southern Blot-Analyse verwendeten *Palap*-Sonde, sowie des entsprechenden DNA-Bereichs im *Palap*-Deletionsstamm  $\Delta$ *Palap* mit der verwendeten *bsd*-Sonde. Die beiden in der Gensequenz von *Palap* vorhandenen Introns sind dunkelgrau dargestellt. (B) Überprüfung des  $\Delta$ *Palap*-Stamms durch Southern Blot-Analyse. Je 750 ng DNA des Wildstamms, s' und des  $\Delta$ *Palap*-Stamms wurden mit *Bgl*II verdaut, in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Daraufhin erfolgte die Hybridisierung mit einer *Palap*-spezifischen, DIG-markierten Sonde. Das ~ 4,3 kbp große Fragment ist nur im Wildstamm detektierbar. Nach Entfernung der Sonde wurde die Membran mit einer *bsd*-spezifischen Sonde zum Nachweis der Resistenzkassette inkubiert, wodurch ein ~ 2,4 kbp großes Fragment im  $\Delta$ *Palap*-Stamm sichtbar wird. Als Größenstandard wurde DIG-markierter  $\lambda$ *Hind*III-Marker verwendet. (C) Überprüfung des *Palap*-Deletionsstamms durch Western Blot-Analyse. Je 100  $\mu$ g mitochondriale Proteinextrakte des Wild- und des  $\Delta$ *Palap*-Stamms wurden in einer 10 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach Inkubation mit einem PalAP-spezifischen Antikörper kann die i-AAA Protease im mitochondrialen Proteinextrakt des Wildstamms nachgewiesen werden. Porin (PaPOR) dient als Ladekontrolle. Als Größenstandard wurde der Marker SM0671 aufgetragen (B und C modifiziert nach Weil et al. 2011).

Unterschiede zwischen dem theoretisch bestimmten Molekulargewicht und dem Verhalten der Proteine bei der SDS-PAGE treten häufig auf, wofür es eine Reihe möglicher Gründe gibt: (i) posttranslationale Modifikationen können zu Änderungen der Mobilität des Proteins im Gel führen (Pulverer et al. 1991); (ii) die Aufrechterhaltung hydrophober Domänen resultiert in einer globuläreren Proteinstruktur und somit verändertem Laufverhalten (Rais et al. 2004); (iii) bestimmte Aminosäuresequenzen führen zu anomaler gelelektrophoretischer Migration (Klenova et al. 1997); (iv) laut Hersteller kann anhand der Markerbanden eine ungefähre Größenbestimmung durchgeführt werden, die von den gewählten Gelelektrophoresebedingungen abhängig ist (Fermentas).

Obwohl der Peptid-Antikörper spezifisch mit PalAP reagiert, werden mehrere Nebenbanden sichtbar (Anhang Abb. 45). Dieses Phänomen wurde auch für einen YME1-spezifischen Antikörper beschrieben (Weber et al. 1996). Nach Inkubation mit YME1-Antiserum wurden mehrere Banden mit geringerem Molekulargewicht als YME1 sichtbar. Dies beruht sowohl auf Kreuzreaktionen des Antikörpers, als auch auf Abbauprodukten von YME1, die vor allem in eingefrorenen Proben detektiert werden konnten.

Die Abwesenheit des *Palap*-Gens im Genom des zur Verfügung gestellten  $\Delta$ *Palap*-Stamms sowie der Verlust von PalAP in den Mitochondrien konnten somit bestätigt werden. Die in den folgenden Versuchen verwendeten  $\Delta$ *Palap*-Isolate sind Nachkommen dieser Primärtransformante und wurden stichprobenartig in regelmäßigen Abständen verifiziert.

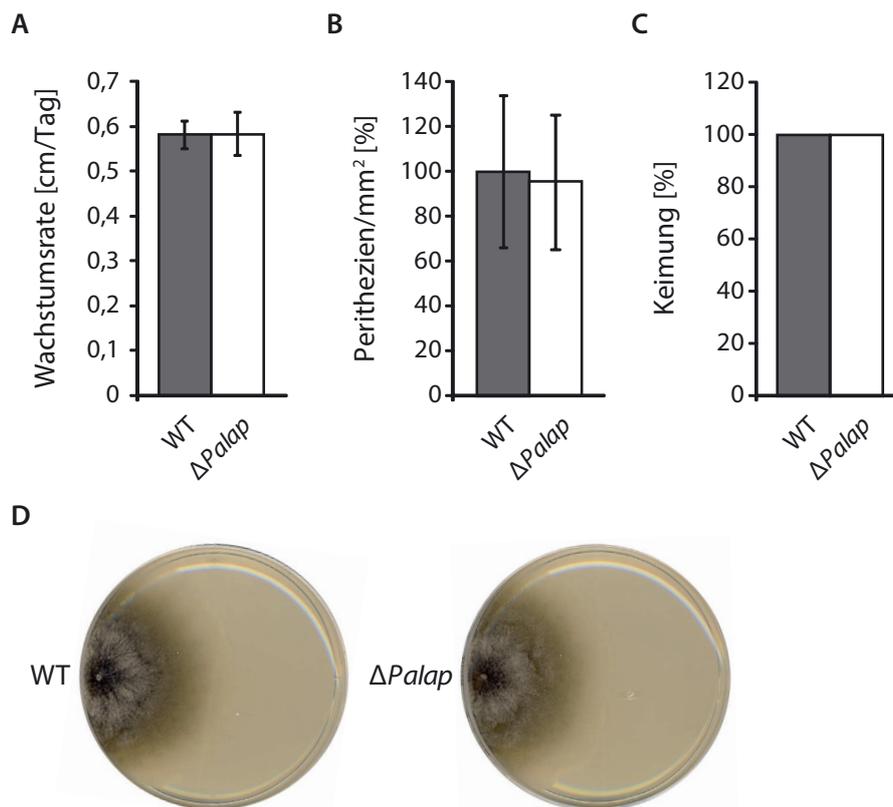
#### 4.1.4 Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms unter Standardbedingungen

Um zu überprüfen, wie sich der Verlust von PalAP als Teil des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems auf *P. anserina* auswirkt, wurden zunächst verschiedene energieabhängige Prozesse unter Standardbedingungen (27°C) untersucht, die ein Maß für die Fitness des Pilzes darstellen.

##### Phänotypische Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms

Zunächst wurden die Wachstumsraten des Wild- und des *Palap*-Deletionsstamms bestimmt (Abb. 9A). Dazu wurden frisch isolierte, monokaryotische Isolate auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C inkubiert. Die durchschnittliche Wachstumsrate der beiden Stämme unterscheidet sich nicht voneinander. Ein weiterer Parameter zur Überprüfung der Fitness ist die weibliche Fertilität. Dafür wurden juvenile Isolate von Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Stämmen auf M2-Festmedium angezogen und die ausgewachsenen Myzelien mit einer Spermarien-Suspension des Wildstamms mit entgegengesetztem Paarungstyp (s<sup>+</sup>F18261 bzw. s<sup>+</sup>F18260) inkubiert (Abb. 9B). Nach zweitägiger Inkubation bei 27°C wurde die Zahl der Perithezien pro mm<sup>2</sup> bestimmt, die sich nicht unterscheidet zwischen dem Wild- und *Palap*-Deletionsstamm. Darüber hinaus scheint sowohl die Menge der Ascosporen enthaltenden Asci pro Perithezium (Daten nicht gezeigt), als auch die Keimungsrate unverändert zu sein (Abb. 9C). Zur Bestimmung der Keimungsrate wurden dikaryotische Sporen aus reinen Wildstamm- bzw. *Palap*-Deletionsstammkreuzungen analysiert, die drei Tage auf BMM mit Ammoniumacetat bei 27°C inkubiert wurden. Sowohl beim Wildstamm als auch bei den  $\Delta$ *Palap*-Isolaten keimen 100 % der Sporen, die jeweils als ~ 1,4 cm große Kolonien sichtbar sind. Auch auf die Myzelmorphologie und -pigmentierung hat der Verlust von *Palap* keinen Einfluss, da sich diese nicht zwischen den  $\Delta$ *Palap*-Isolaten und dem Wildstamm unterscheiden (Abb. 9D).

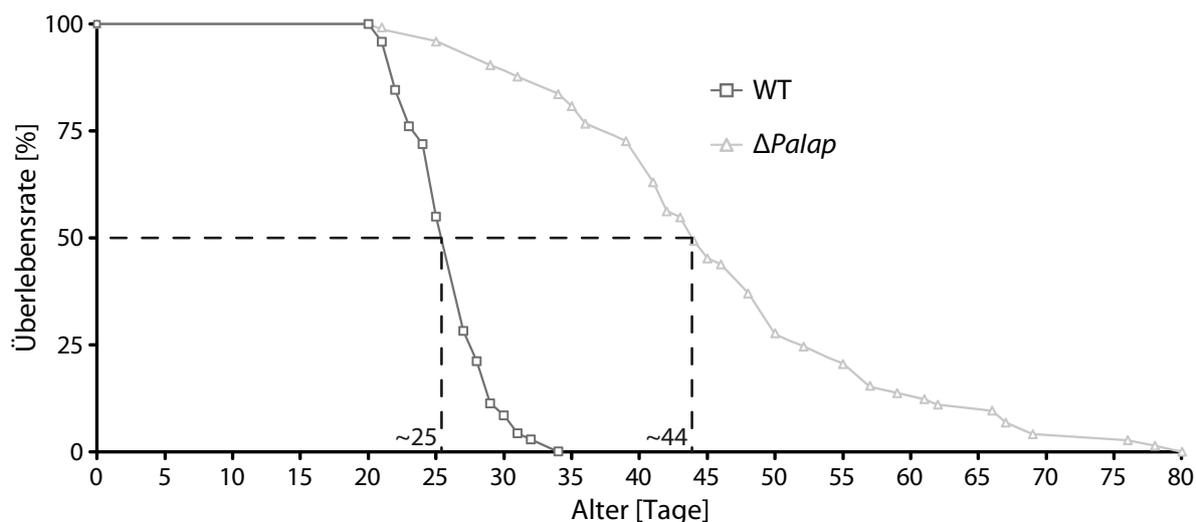
Unter Standardbedingungen hat der Verlust der i-AAA Protease bezüglich der Myzelmorphologie, des Wachstums, der Fruchtkörperbildung und der Keimung der Sporen keine nachteiligen Auswirkungen auf *P. anserina*.



**Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms bei 27°C.** (A) Die Wachstumsrate des Wildstamms (WT; 0,58 cm/Tag ± 0,03; n = 71) wurde auf Rennrohren mit M2-Festmedium untersucht und unterscheidet sich nicht von der des *Palap*-Deletionsstamms ( $\Delta Palap$ ; 0,58 cm/Tag ± 0,03; n = 73;  $p > 0,05$ ). (B) Die Bildung von Perithezien ist auf M2-Festmedium bei  $\Delta Palap$  (95,3 % ± 30; n = 12) nicht beeinträchtigt verglichen mit dem Wildstamm (100 % ± 33,9; n = 12;  $p > 0,05$ ). Der Mittelwert der Perithezienmenge des Wildstamms wurde auf 100 % gesetzt und mit dem Mittelwert der Perithezienmenge der *Palap*-Deletionsmutante verglichen. (C) Die Keimungsrate der Sporen des  $\Delta Palap$ -Stamms (100 %; n = 19) unterscheidet sich nicht von der des Wildstamms (100 %; n = 19;  $p > 0,05$ ). (D) Die Myzelmorphologie und -pigmentierung des *Palap*-Deletionsstamms entsprechen denen des Wildstamms (hier auf M2-Festmedium angezogen; modifiziert nach Weil et al. 2011).

### Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms

Um die Bedeutung der i-AAA Protease PalAP für die Alterung von *P. anserina* zu untersuchen, wurden Lebensspannenanalysen durchgeführt. Dazu wurden frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und unter Standardbedingungen (27°C und Dauerlicht) bis zum Einstellen des Wachstums inkubiert. In Abb. 10 ist das Ergebnis von drei unabhängigen Lebensspannen-Experimenten dargestellt. Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied in den Lebensspannen des  $\Delta Palap$ -Stamms und des Wildstamms. Die mediane Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms ist mit ~ 44 Tagen im Vergleich zu der des Wildstamms mit ~ 25 Tagen um 76 % verlängert. Die maximale Lebensspanne der  $\Delta Palap$ -Isolate (80 Tage) ist um 135 % verlängert verglichen mit der des Wildstamms (34 Tage).



**Abb. 10: Analyse der Lebensspanne des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms bei 27°C.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wild- (WT; n = 71) und des *Palap*-Deletionsstamms ( $\Delta Palap$ ; n = 73) wurden auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und im Dauerlicht bei 27°C bis zum Einstellen des Wachstums inkubiert. Die Überlebensrate ist in Prozent angegeben, die Lebensspanne in Tagen. Die mediane Lebensspanne des Wildstamms beträgt 25,4 Tage, die des *Palap*-Deletionsstamms ist mit 43,8 Tagen deutlich verlängert ( $p < 0,001$ ; modifiziert nach Weil et al. 2011).

Der Verlust von *Palap* ist unter Standardbedingungen vorteilhaft für *P. anserina*, da er zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt ohne physiologische Vorgänge wie das Wachstum, die Fertilität oder die Myzelmorphologie zu beeinflussen.

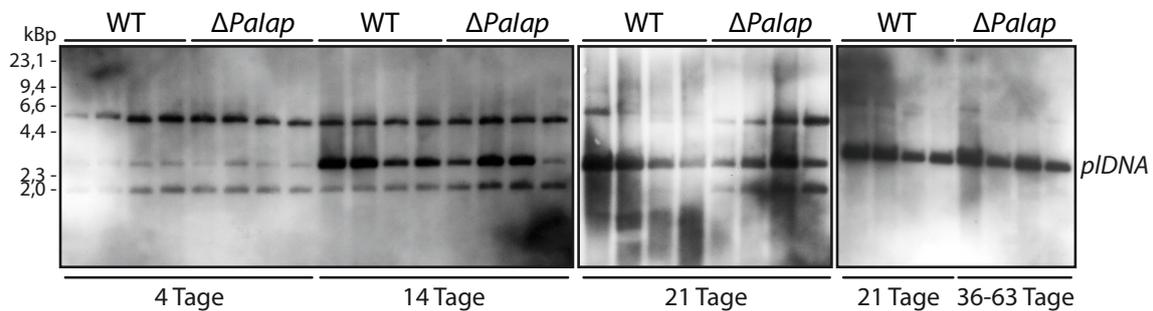
### Reorganisation der mtDNA und mitochondriale Morphologie beim *Palap*-Deletionsstamm

Sowohl die Reorganisation der mtDNA als auch die Fragmentierung der Mitochondrien treten bei langlebigen *P. anserina*-Mutanten häufig verzögert auf (vgl. 1.5; Scheckhuber et al. 2007; Luce & Osiewacz 2009). Aufgrund des Phänotyps des *Palap*-Deletionsstamms wurden diese beiden Merkmale des Alters ebenfalls untersucht.

Zur Überprüfung der mtDNA-Integrität der  $\Delta Palap$ -Stämme wurden Southern Blot-Analysen mit aus Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen in verschiedenen Altersstadien isolierter DNA durchgeführt (Abb. 11). Die Menge an pDNA, die als Seneszenzmarker bei *P. anserina* angesehen wird (Kück et al. 1985), kann dabei durch Hybridisierung mit einer pDNA-spezifischen Sonde nachgewiesen werden (Stahl et al. 1982).

Während in den juvenilen Stämmen (4 Tage) hauptsächlich intakte mtDNA (Signale bei 1,9 und 4,5 Bp) vorhanden und das pDNA-Signal (bei 2,5 kbp) nur schwach erkennbar ist, weisen 14 Tage alte Wild- und *Palap*-Deletionsstämme bereits deutliche Anzeichen von Reorganisation der mtDNA auf. In seneszenten Wildstämmen (21 Tage) liegt die mtDNA vollständig reorganisiert vor. Dagegen ist in 21 Tage alten  $\Delta Palap$ -Isolaten neben der freigesetzten pDNA immer noch intakte mtDNA nachweisbar. Erst im

seneszenten Stadium, nach 36 - 63 Tagen, ist die mtDNA komplett reorganisiert, sodass nur noch freie pDNA detektiert wird.

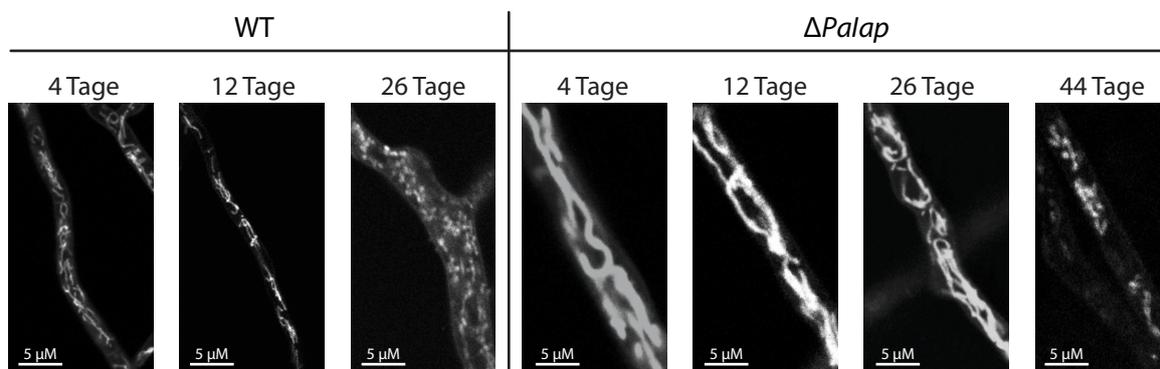


**Abb. 11: Die mtDNA des *Palap*-Deletionsstamms bleibt länger intakt.** Zur Überprüfung der Stabilität der mtDNA wurden die Wild- (WT; n = 4; \*F114151, \*F114170, F114171, F114181) und *Palap*-Deletionsstämme ( $\Delta Palap$ ; n = 4; \*F114301, \*F114321, F114331, F114341) auf M2-Festmedium bei 27°C und Dauerlicht angezogen. DNA wurde aus 4 Tage, 14 Tage und 21 Tage alten Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolaten, bzw. aus 36 - 63 Tage alten  $\Delta Palap$ -Stämmen isoliert. Jeweils 500 ng DNA wurde mit *Bgl*II geschnitten und auf 0,8 %igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf Nylonmembranen wurden diese mit einer DIG-markierten Sonde gegen die Sequenz des ersten Introns des mitochondrialen *PaCoxI*-Gens aus dem Plasmid pSP17 (Stahl et al. 1982) hybridisiert. Während in den 4 Tage alten Stämmen noch hauptsächlich intakte mtDNA bei 1,9 und 4,5 kBp detektiert wird, werden in den 14 Tage alten Stämmen bereits deutliche pDNA-Signale (bei 2,5 kBp) sichtbar. Nach 21 Tagen ist bei den Wildstämmen größtenteils nur noch pDNA vorhanden, während bei den *Palap*-Deletionsstämmen immer noch nicht-reorganisierte mtDNA (bei 1,9 und 4,5 kBp) erkennbar ist. Diese verschwindet jedoch bei  $\Delta Palap$  mit zunehmendem Alter (36 - 63 Tage; \*F114301 49 Tage; \*F114321 63 Tage; F114331 36 Tage; F114341 57 Tage). Als Größenstandard wurde DIG-markierter  $\lambda$ HindIII-Marker verwendet.

Die Untersuchung der Stabilität der mtDNA zeigt, dass bei den  $\Delta Palap$ -Stämmen länger intakte, nicht-reorganisierte mtDNA vorhanden ist. Dagegen ist die Freisetzung von pDNA vergleichbar mit dem Wildstamm. Die hohe mtDNA-Stabilität trägt möglicherweise zur Langlebigkeit der  $\Delta Palap$ -Isolate bei, da die genetische Information länger erhalten bleibt.

Die mitochondriale Morphologie unterliegt dynamischen Prozessen und kann je nach Anforderung der Zelle, z.B. während des Alterns, angepasst werden. Zur Untersuchung des Einflusses der Deletion von *Palap* auf die mitochondriale Morphologie von *P. anserina* wurden Isolate des Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamms auf Muldenobjektträgern mit M2-Medium (1:1 mit 2 %iger Agarose vermischt) bei 27°C in einer feuchten Kammer angezogen. Nach zwei Tagen wurde das Myzel mit dem Membranpotential-abhängigen Mitochondrien-Farbstoff ‚Mitotracker Red CMXMRos‘ (Molecular Probes) inkubiert und die Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 12). Dabei zeigt sich, dass die Mitochondrienmorphologie des  $\Delta Palap$ -Stamms nicht von der des Wildstamms unterscheidbar ist. Während in juvenilen (4 Tage) und 12 Tage alten Stämmen (entspricht mittelalten Wildtypisolaten) überwiegend lange, filamentöse Mitochondriennetzwerke sichtbar werden, sind die Mitochondrien in seneszenten Wildstämmen (26 Tage) größtenteils fragmentiert. Demgegenüber weisen 26 Tage alte  $\Delta Palap$ -Isolate

immer noch filamentöse Mitochondrien auf. Im seneszenten Stadium (44 Tage) können jedoch, wie beim Wildstamm, hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien nachgewiesen werden.



**Abb. 12: Mitochondrienmorphologie in Hyphen des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms.** 4 Tage, 12 Tage und 26 Tage alte Wild- (WT) und  $\Delta Palap$ -Isolate ( $\Delta Palap$ ), bzw. 44 Tage alte  $\Delta Palap$ -Isolate wurden auf M2-Festmedium angezogen und zur Analyse der mitochondrialen Morphologie auf Objektträgern angeimpft, deren Mulde mit flüssigem M2 und 2 %iger Agarose (1:1) gefüllt war. Die Objektträger wurden zwei Tage in einer Feuchtekammer bei 27°C inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit einer 1  $\mu$ M Lösung ‚Mitotracker Red CMXMRos‘ (Molecular Probes) gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. In 4 und 12 Tage alten Stämmen werden lange, filamentöse Mitochondrien sichtbar. Während seneszente Wildstämme (26 Tage) hauptsächlich fragmentierte Mitochondrien aufweisen, sind die von 26 Tage alten  $\Delta Palap$ -Isolaten größtenteils immer noch filamentös. Mit zunehmendem Alter der  $\Delta Palap$ -Stämme können jedoch auch fragmentierte Mitochondrien beobachtet werden (4Tage: WT n = 4,  $\Delta Palap$  n = 4; 12 Tage: WT n = 4,  $\Delta Palap$  n = 4; ~ 26 Tage: WT n = 2,  $\Delta Palap$  n = 1; ~ 44 Tage:  $\Delta Palap$  n = 2).

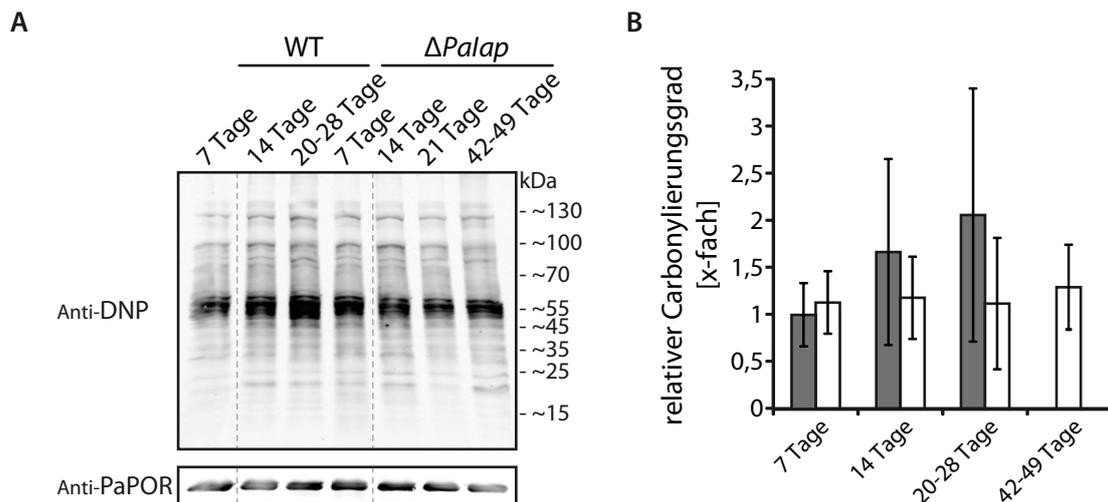
Die *Palap*-Deletionsstämme zeigen im Verlauf des Alterns einen den Wildstämmen entsprechenden Übergang von filamentösen zu fragmentierten Mitochondrien, jedoch erreichen die  $\Delta Palap$ -Isolate das seneszente Stadium sehr viel später als die Wildstammisolate.

### Modifikation von Proteinen (Carbonylierung) während des Alterns des *Palap*-Deletionsstamms

In einigen Organismen konnte gezeigt werden, dass die Menge an durch Carbonylierung irreversibel modifizierten Proteinen im letzten Drittel der Lebensspanne deutlich ansteigt (Levine 2002). Dies erfolgt durch die zunehmende oxidative Schädigung der Proteine. Einige langlebige *P. anserina*-Stämme weisen dagegen verglichen mit dem Wildstamm eine geringere Menge an carbonylierten Proteinen auf (Kunstmann & Osiewacz 2008; Luce & Osiewacz 2009). Da die i-AAA Protease am Abbau geschädigter Membranproteine beteiligt ist (vgl. 1.4.2), wurde die Auswirkung des Verlusts von PalAP auf die Carbonylierung mitochondrialer Proteine durch ‚Oxyblot‘-Analysen untersucht.

Mitochondriale Proteinextrakte des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms verschiedener Altersstadien, die zunächst auf M2-Fest- und dann in CM-Flüssigmedium angezogen wurden, wurden mit DNPH derivatisiert und durch Western Blot-Analysen mit einem DNP-spezifischen Antikörper überprüft (Abb.

13). Während die Gesamtintensität der Signale bei den Wildstammisolen im Alter tendenziell (nicht signifikant) ansteigt, bleibt die Menge an carbonylierten Proteinen bei den  $\Delta Palap$ -Stämmen in den untersuchten Altersstadien konstant. Zur Analyse der Veränderung einzelner Proteine müsste jedoch das mitochondriale Proteom der Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämme durch 2D-,Oxyblot'-Analysen untersucht werden (Luce & Osiewacz 2009; Weckmann 2010).



**Abb. 13: Altersabhängige Carbonylierung im mitochondrialen Proteom des Wild- und des  $Palap$ -Deletionsstamms. (A)** Western Blot-Analyse. Mitochondriale Proteinextrakte wurden aus 7 Tage, 14 Tage und 20 - 28 Tage alten Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen, sowie von 42 - 49 Tage alten  $\Delta Palap$ -Stämmen isoliert, die auf M2-Fest- und anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C angezogen wurden. Die gelelektrophoretische Auftrennung von je 20 µg mitochondrialer Proteinextrakte erfolgte durch 10 und 16%ige biphasische SDS-PAGE. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen folgte die Detektion der mit DNPH derivatisierten Carbonylgruppen der Proteine mit einem Anti-DNP Antikörper. SM0671 wurde als Größenstandard aufgetragen. Porin (PaPOR) dient zur Normierung der densitometrischen Auswertung. **(B)** Quantitative Auswertung der ‚Oxyblot‘-Analysen. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte des relativen Carbonylierungsgrads der Wild- (grau; n = 4; \*F114231, F114240, F114261, \*F114280) und  $\Delta Palap$ -Stämme (weiß; n = 4; F114390, \*F114431, \*F114441, F114450) der verschiedenen Altersstadien ± Standardabweichung. Der Mittelwert der 7 Tage alten Wildstämme wurde auf 1 gesetzt. Der relative Carbonylierungsgrad unterscheidet sich nicht zwischen den Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen (Wildstamm 7 Tage:  $1 \pm 0,34$ ; 14 Tage:  $1,67x \pm 0,99$ ; 20, 23, 24 bzw. 28 Tage:  $2,06x \pm 1,35$ ;  $\Delta Palap$  7 Tage:  $1,13x \pm 0,33$ ; 14 Tage:  $1,18x \pm 0,44$ ; 21 Tage:  $1,12x \pm 0,70$ ; 42, 45, 46 bzw. 49 Tage:  $1,29x \pm 0,45$ ; p jeweils > 0,05).

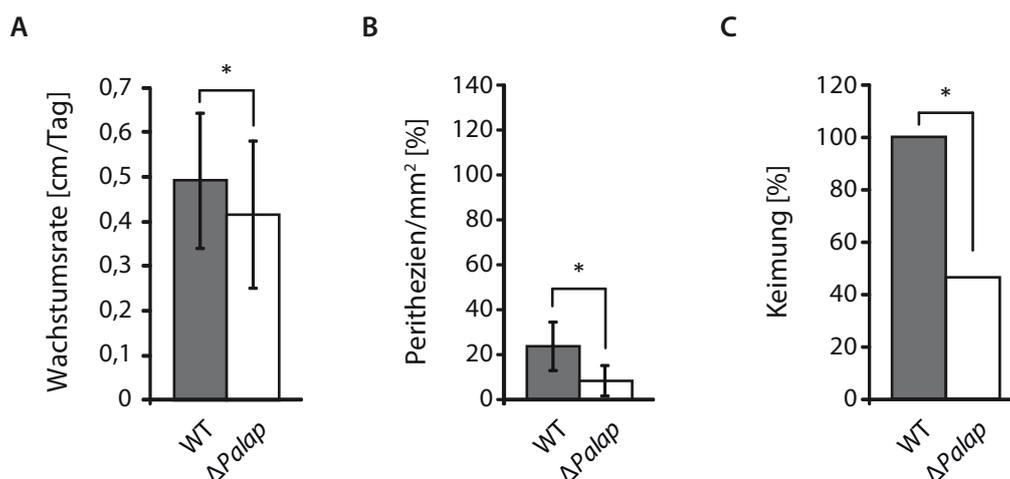
Obwohl kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, ist es möglich, dass die gegenüber dem Wildstamm tendenziell verringerte Proteinschädigung der  $\Delta Palap$ -Isolate zur Lebensverlängerung der Stämme beiträgt.

#### 4.1.5 Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms bei Hitzestress

Da die i-AAA Protease als wichtige Komponente des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems am Abbau membrangebundener Proteine beteiligt ist (Leonhard et al. 1996), ist die Beobachtung, dass die Deletion der i-AAA Protease eine unbeeinträchtigte Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina* auslöst, zunächst unerwartet. Aus *S. cerevisiae* und *N. crassa* existieren jedoch Hinweise, dass der Verlust der i-AAA Protease zu einem hitzesensitiven Phänotyp führt, weshalb der Einfluss von Hitzestress (37°C) auf den  $\Delta Palap$ -Stamm überprüft wurde.

#### Phänotypische Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms

Zunächst wurde die Auswirkung von Hitzestress auf einige der energieabhängigen Prozesse beim Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamm untersucht, die unter Standardbedingungen (27°C) nicht verändert sind (vgl. 4.1.4). Zur Bestimmung der Wachstumsrate der Stämme bei 37°C wurden monokaryotische Kulturen auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und zunächst bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Kulturen in einen 37°C warmen Brutschrank überführt (Abb. 14A). Ab diesem



**Abb. 14: Hitzestress beeinträchtigt lebenswichtige Funktionen beim *Palap*-Deletionsstamm. (A)** Zur Bestimmung der Wachstumsrate des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms bei Hitzestress wurden die auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpften Isolate zunächst zwei Tage bei 27°C angezogen, worauf die Inkubation bei 37°C folgte. Dabei ist die Wachstumsrate des *Palap*-Deletionsstamms ( $\Delta Palap$ ; 0,42 cm/Tag  $\pm$  0,16; n = 45) signifikant verringert im Vergleich zu der des Wildstamms (WT; 0,49 cm/Tag  $\pm$  0,15; n = 45; p < 0,05). **(B)** Um den Einfluss von Hitzestress auf die Perithezienbildung von  $\Delta Palap$  auf M2-Festmedium zu bestimmen, wurden die Wild- und *Palap*-Deletionsstämme vor der Spermatisierung fünf Tage bei 37°C inkubiert, spermatisiert und nach zwei Tagen bei 27°C die Anzahl der gebildeten Perithezien bestimmt. Die *Palap*-Deletionsstämme (8,4 %  $\pm$  6,8; n = 8) bilden signifikant weniger Fruchtkörper als die Wildstämme (23,7 %  $\pm$  10,8; n = 8; p < 0,05). Der Mittelwert der Perithezienmenge des Wildstamms bei 27°C (Abb. 9) wurde auf 100 % gesetzt und mit den Mittelwerten des Wildstamms und der *Palap*-Deletionsmutante nach Inkubation bei 37°C verglichen. Alle Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Messung an. **(C)** Die Keimungsrate der Sporen des *Palap*-Deletionsstamms (n = 15) nach drei Tagen bei 37°C unterscheidet sich deutlich von der des Wildstamms (n = 20; p < 0,01; modifiziert nach Weil et al. 2011).

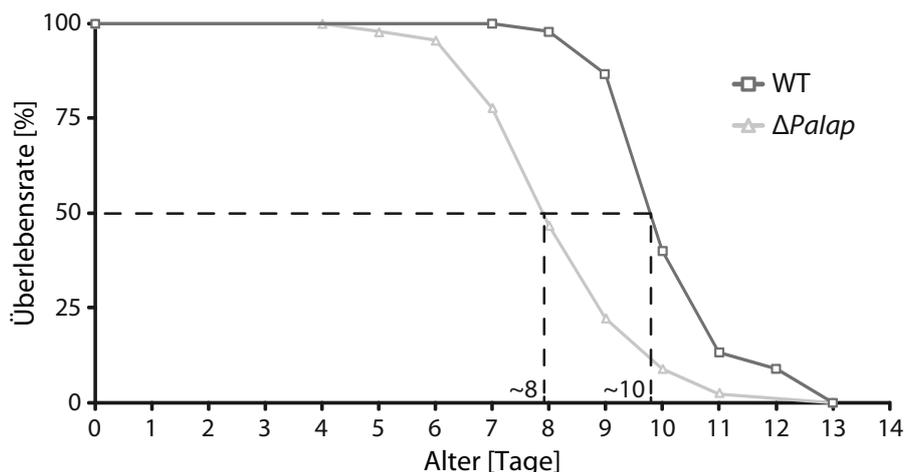
Zeitpunkt wurde die Wachstumsrate im Bereich linearen Wachstums bestimmt. Anders als bei Inkubation bei 27°C wachsen die  $\Delta Palap$ -Isolate bei 37°C mit 0,42 cm/Tag signifikant langsamer als die Wildstammisolate (0,49 cm/Tag). Dies entspricht einer Verminderung um ~ 14 %. Auch die Zahl der gebildeten Perithezien ist nach fünftägigem Hitzestress bei den *Palap*-Deletionsstämmen (8,4 % der durchschnittlich vom Wildstamm bei 27°C gebildeten Fruchtkörper) deutlich geringer als bei den Wildstämmen (23,7 % der Perithezienmenge bei 27°C; Abb. 14B). Neben der verminderten Anzahl an gebildeten Fruchtkörpern ist auch die Fähigkeit zur Keimung reduziert. Während bei 27°C alle untersuchten  $\Delta Palap$ -Isolate keimen, ist die Keimungsrate des Deletionsstamms bei Inkubation der Sporen bei 37°C ebenfalls deutlich reduziert verglichen mit der der Wildstämme (Abb. 14C). Die aus dikaryotischen Wildstammssporen bei 37°C gewachsenen Myzelkolonien sind zwar kleiner als die bei 27°C inkubierten Kolonien (Daten nicht gezeigt), jedoch sind alle Sporen gekeimt. Dagegen können nur ~ 50 % der  $\Delta Palap$ -Sporen nach Inkubation bei 37°C keimen.

Die Untersuchungen bei 37°C zeigen deutlich, dass der  $\Delta Palap$ -Stamm hitzesensitiver ist als der Wildstamm und die Deletion von *Palap* demnach bei Hitzestress nachteilig ist für *P. anserina*.

#### **Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms**

Die Bestimmung des Einflusses von Hitzestress auf die Lebensspanne der  $\Delta Palap$ -Isolate erfolgte wie bei der Bestimmung der Wachstumsrate bei 37°C. Die Lebensspanne jedes Individuums setzt sich dabei aus der zweitägigen Keimung und der zweitägigen Anzucht auf Rennrohren mit M2-Festmedium bei 27°C, sowie der darauf folgenden Inkubation bei 37°C bis zum Einstellen des Wachstums zusammen (Abb. 15). Die dargestellte Lebensspannen-Analyse ergibt sich aus zwei unabhängigen Experimenten. Anders als bei 27°C führt die Inkubation bei 37°C zu einer um ~ 20 % verkürzten medianen Lebensspanne des  $\Delta Palap$ -Stamms (7,9 Tage) gegenüber der des Wildstamms (9,8 Tage). Verglichen mit den medianen Lebensspannen bei 27°C entspricht dies einer Verringerung um das ~ 2,5fache beim Wildstamm, während die des  $\Delta Palap$ -Stamms deutlich stärker um das ~ 5,5fache verringert ist. Die maximalen Lebensspannen des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms unterscheiden sich dagegen nicht und betragen bei beiden 13 Tage. Eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 40°C war nicht möglich, da *P. anserina* bei dieser Temperatur nicht mehr wachsen konnte.

Entgegen der unerwarteten Lebensverlängerung, die die Deletion von *Palap* bei Inkubation bei 27°C verursacht, ist die Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms bei 37°C signifikant verkürzt.



**Abb. 15: Analyse der Lebensspanne des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms bei 37°C.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wild- (WT; n = 45) und des *Palap*-Deletionsstamms ( $\Delta Palap$ ; n = 45) wurden auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und nach zwei Tagen bei 27°C im Dauerlicht bei 37°C bis zum Einstellen des Wachstums inkubiert. Die Überlebensrate ist in Prozent angegeben, die Lebensspanne in Tagen. Die mediane Lebensspanne des Wildstamms beträgt 9,8 Tage, die des *Palap*-Deletionsstamms ist reduziert auf 7,9 Tage ( $p < 0,01$ ). Die maximale Lebensspanne (13 Tage) unterscheidet sich jedoch nicht (modifiziert nach Weil et al. 2011).

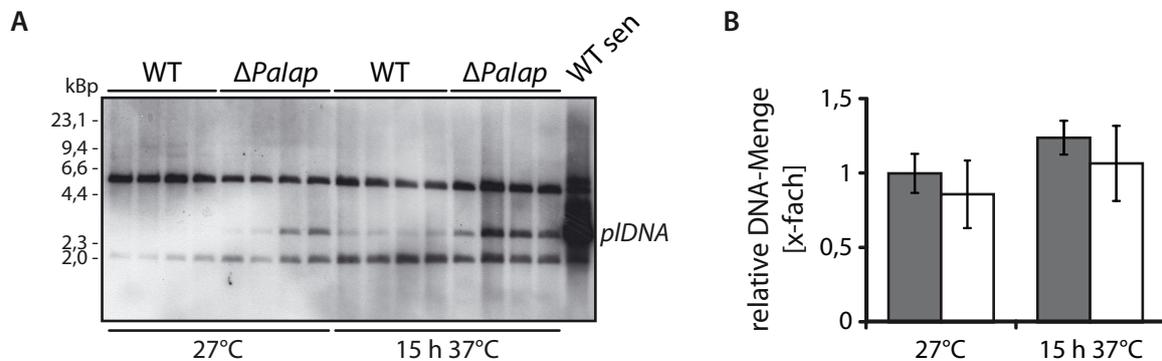
### Stabilität der mtDNA beim *Palap*-Deletionsstamm

Um zu überprüfen, ob die zuvor untersuchten energieabhängigen Prozesse bei Hitzestress aufgrund von mtDNA-Schädigung bzw. Verlust von mtDNA im *Palap*-Deletionsstamm nachteilig betroffen sind, wurde sowohl die plDNA-Freisetzung als auch das Verhältnis eines Kern-kodierten Gens zu einem mitochondrial-kodierten Gen bestimmt (Abb. 16).

Zur Analyse der Stabilität der mtDNA bei Hitzestress wurde DNA aus juvenilen Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen isoliert und durch Southern Blot untersucht (Abb. 16A). Dabei wurde das Myzel der Stämme bei 27°C bzw. 15 Stunden vor der Isolation der DNA bei 37°C inkubiert. Während die juvenilen, bei 27°C angezogenen Wildstämme nur intakte mtDNA (Signale bei 1,9 und 4,5 kBp) aufweisen, wird bei den *Palap*-Deletionsstämmen bereits ein schwaches Signal bei ~ 2,5 kBp sichtbar, welches amplifizierter plDNA entspricht. Dieses wird durch Hitzestress bei den  $\Delta Palap$ -Isolaten deutlich stärker, wogegen bei den hitzestressierten Wildstämmen lediglich ein schwaches Signal erkennbar wird. Intakte mtDNA ist sowohl bei 27°C als auch nach Hitzestress in den Stämmen vorhanden.

In einem zweiten Ansatz wurde die isolierte DNA durch quantitative „real-time PCR“ untersucht (Abb. 16B). Dazu wurde die Menge des mitochondrial-kodierten Gens *PaLsu* mit der des Kern-kodierten Gens *PaUdg* verglichen, um das Verhältnis mitochondrialer Genome zu Kerngenomen zu bestimmen (Selle et al. 2007). Weder bei 27°C noch nach Inkubation bei 37°C wird ein signifikanter Unterschied im

Verhältnis der mitochondrialen Genome zu den Kerngenomen beim Wild- und *Palap*-Deletionsstamm deutlich. Jedoch steigt die Menge an mitochondrialen Genomen bei Hitzestress in den Stämmen tendenziell an.



**Abb. 16: Einfluss von Hitzestress auf die mtDNA von Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolaten.** (A) Stabilität der mtDNA. Je 500 ng *Bgl*III-verdaute DNA von 4 Tage alten Wildstämmen ( $n = 4$ ) und *Palap*-Deletionsstämmen ( $n = 4$ ), die bei 27°C bzw. 15 Stunden vor der DNA-Isolation bei 37°C auf M2-Festmedium inkubiert wurden, wurden auf einem 0,8 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt und nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran mit einer DIG-markierten pDNA-Sonde hybridisiert (vgl. Abb. 11). Die *Palap*-Deletionsstämmen weisen bereits bei 27°C ein schwaches Signal bei 2,5 kBp auf, welches der pDNA entspricht und in den Wildstämmen fehlt. Durch Hitzestress kommt es bei  $\Delta Palap$  zu einer deutlichen Zunahme der pDNA-Freisetzung, während das Signal bei den Wildstämmen nur schwach sichtbar wird. Als Positivkontrolle dient ein seneszenten Wildstamm (WT sen). DIG-markierter  $\lambda$ HindIII-Marker wurde als Größenstandard verwendet. (B) Überprüfung des Verlusts von mtDNA. Um den Verlust von mtDNA zu analysieren, wurde das Verhältnis des mitochondrial-kodierten Gens *PaLsu* zum Kern-kodierten Gen *PaUdg* bestimmt (Sellem et al. 2007). Die verwendete DNA wurde aus juvenilen Wild- (grau; 27°C:  $n = 3$ ; 15 h 37°C:  $n = 4$ ) und  $\Delta Palap$ -Stämmen (weiß;  $n = 4$ ) isoliert, die bei 27°C (27°C) bzw. 15 Stunden vor der Isolation bei 37°C (15 h 37°C) und Dauerlicht auf M2-Festmedium angezogen wurden. Die Analyse der DNA-Mengen erfolgte durch „real-time PCR“. Der Mittelwert der Wildstämmen bei 27°C wurde auf 1 gesetzt. Das relative Verhältnis der DNA-Mengen von *PaLsu* zu *PaUdg* unterscheidet sich weder bei 27°C noch nach Inkubation bei 37°C zwischen den Wild- (27°C:  $1x \pm 0,12$ ; 15 h 37°C:  $1,24x \pm 0,11$ ) und *Palap*-Deletionsstämmen (27°C:  $0,86x \pm 0,23$ ;  $p > 0,05$ ; 15 h 37°C:  $1,07x \pm 0,25$ ;  $p > 0,05$ ). Bei 37°C ist die *PaLsu*-Menge bei den Wildstämmen geringfügig höher als bei 27°C ( $p < 0,05$ ). Alle Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Messung an.

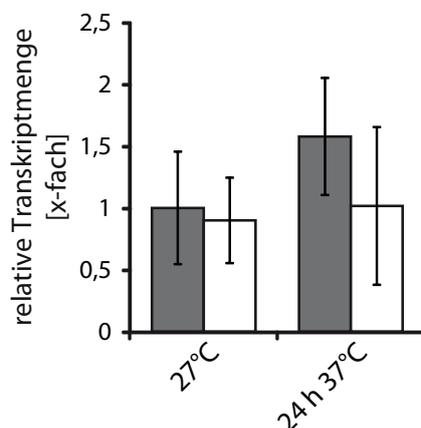
Obwohl Hitzestress bei den  $\Delta Palap$ -Isolaten zur vermehrten Freisetzung von pDNA und dadurch zu größerer mtDNA-Schädigung führt, ist das Verhältnis von Kern-kodiertem zu mitochondrial-kodiertem Gen und somit der mtDNA-Gehalt nicht verändert.

#### 4.1.6 Auswirkung der Deletion von *Palap* auf die Regulation der m-AAA Protease

Um zu überprüfen, ob die m-AAA Protease PaMAP bei *P. anserina* ähnlich wie bei *S. cerevisiae* den Verlust der i-AAA Protease PaIAP kompensieren kann (vgl. 1.4.2.1), wurde die Expression von *PaMap* im Wild- und *Palap*-Deletionsstamm untersucht (Abb. 17). Da kein PaMAP-spezifischer Antikörper vorhanden war, wurde die Transkriptmenge analysiert.

Die RNA wurde aus 14 Tage altem Myzel von durchgängig auf M2-Festmedium angezogenen Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen isoliert. Die Stämme wurden bei 27°C inkubiert bzw. 24 Stunden vor der Isolation der RNA Hitzestress ausgesetzt, um den Einfluss erhöhter Temperatur auf die Transkriptmenge von *PaMap* festzustellen. Normiert wurde auf die *PaPor*-Transkriptmenge, die von der Deletion von *Palap* nicht beeinflusst werden sollte. Während bei 27°C verglichen mit den Wildstämmen kein Hinweis auf eine veränderte Genregulation von *PaMap* in den  $\Delta Palap$ -Isolaten festgestellt werden kann, scheint die mRNA-Menge von *PaMap* im Wildtyp nach Hitzestress tendenziell (nicht signifikant) erhöht zu sein, während sie in Abwesenheit von PalAP in den  $\Delta Palap$ -Isolaten konstant bleibt.

Die Ergebnisse deuten nicht auf eine kompensatorische Hochregulation von *PaMap* im *Palap*-Deletionsstamm hin. Jedoch könnte die tendenzielle Hochregulierung der *PaMap*-Transkriptmenge beim Wildstamm bei Hitzestress zu dem hitzesensitiveren Phänotyp der  $\Delta Palap$ -Stämme beitragen.



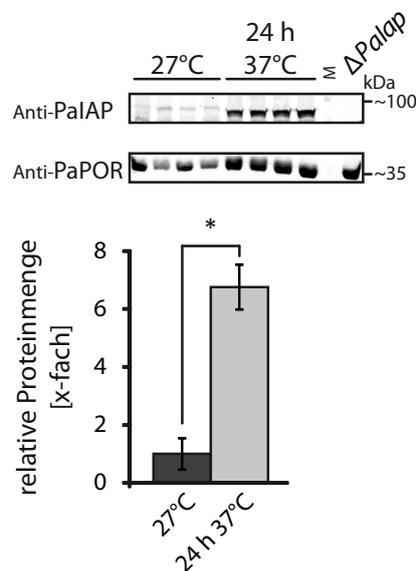
**Abb. 17: Analyse der Transkriptmenge von *PaMap* in Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolaten.** Zum Vergleich der Transkriptmenge von *PaMap* wurde RNA aus 14 Tage alten Wild- (grau, n = 4) und *Palap*-Deletionsstämmen (weiß, n = 4) isoliert, die durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C (27°C) und Dauerlicht bzw. 24 Stunden vor der RNA-Isolation Hitzestress bei 37°C (24 h 37°C) ausgesetzt wurden. Die aus der RNA synthetisierte cDNA wurde durch „real-time RT-PCR“ analysiert. Normiert wurde auf die relative *PaPor*-Transkriptmenge. Der Mittelwert der Wildstämmen bei 27°C wurde auf 1 gesetzt. Weder nach Anzucht bei 27°C (WT  $1x \pm 0,45$ ;  $\Delta Palap$   $0,9x \pm 0,35$ ;  $p > 0,05$ ), noch nach Inkubation bei 37°C (WT  $1,58x \pm 0,47$ ;  $\Delta Palap$   $1,02x \pm 0,64$ ;  $p > 0,05$ ) wird ein signifikanter Unterschied zwischen den Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen deutlich. Alle Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Messung an.

#### 4.1.7 Regulation von PalAP bei Hitze

Die durch den Verlust von *Palap* ausgelöste Hitzesensitivität von *P. anserina* deutet darauf hin, dass die i-AAA Protease PalAP eine wichtige Rolle bei erhöhten Temperaturen spielt. Dies ist naheliegend, da Hitze die Struktur von Proteinen beeinflusst, was zur Fehlfaltung und Inaktivierung führt (Wickner et al. 1999). Um die Akkumulation irreversibel fehlgefalteter Proteine zu verhindern, sind Proteasen

wie die i-AAA Protease notwendig. Daher wurde die Regulation von PaIAP bei Hitze untersucht (Abb. 18). 14 Tage alte Wildstämme wurden durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C und Dauerlicht bzw. 24 Stunden vor der Isolation der mitochondrialen Proteine bei 37°C angezogen. Die Überprüfung der PaIAP-Menge erfolgte durch Western Blot-Analyse mit einem PaIAP-spezifischen Antikörper. Dabei zeigt sich, dass die Proteinmenge von PaIAP durch die Inkubation bei 37°C um mehr als das 6fache höher ist als bei 27°C.

Die starke Zunahme der PaIAP-Menge in Mitochondrien des Wildstamms nach Inkubation bei 37°C deutet auf eine Beteiligung der i-AAA Protease PaIAP bei der Hitzestressantwort von *P. anserina* hin.



**Abb. 18: Analyse der Regulation von PaIAP bei Hitzestress im Wildstamm.** Western Blot-Analyse mit je 100 µg mitochondrialen Proteinextrakten aus 14 Tage alten Wildstämmen. Das Myzel wurde durchgängig auf M2-Festmedium angezogen und bei 27°C (27°C) bzw. 24 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C (24 h 37°C) inkubiert. Jede Wildstammprobe besteht aus dem Myzel von drei unterschiedlichen Wildstämmen, die identisch angezogen wurden (F115091, F115100, F115101, F115121, F115130, F115131, F115140, F115160, F115161, F115171, F115181, F115190). Vor der Isolation der mitochondrialen Proteine wurde das Myzel zu gleichen Gewichtsmengen zusammengegeben. Nach der Auftrennung der Proteine durch 12 %ige SDS-PAGE wurden diese auf PVDF-Membranen übertragen. Die Menge an PaIAP wurde mit einem PaIAP-spezifischen Antikörper detektiert. Mitochondriale Proteinextrakte von  $\Delta Palap$  wurden als Negativkontrolle aufgetragen. Porin (PaPOR) dient zur Normierung. Der Mittelwert der Wildstammisolate bei 27°C wurde auf 1 gesetzt ( $1x \pm 0,54$ ). Inkubation der Wildstammisolate bei 37°C führt zu einer deutlich erhöhten relativen Menge an PaIAP ( $6,76x \pm 0,77$ ;  $p < 0,001$ ; modifiziert nach Weil et al. 2011). M – Marker SM0671.

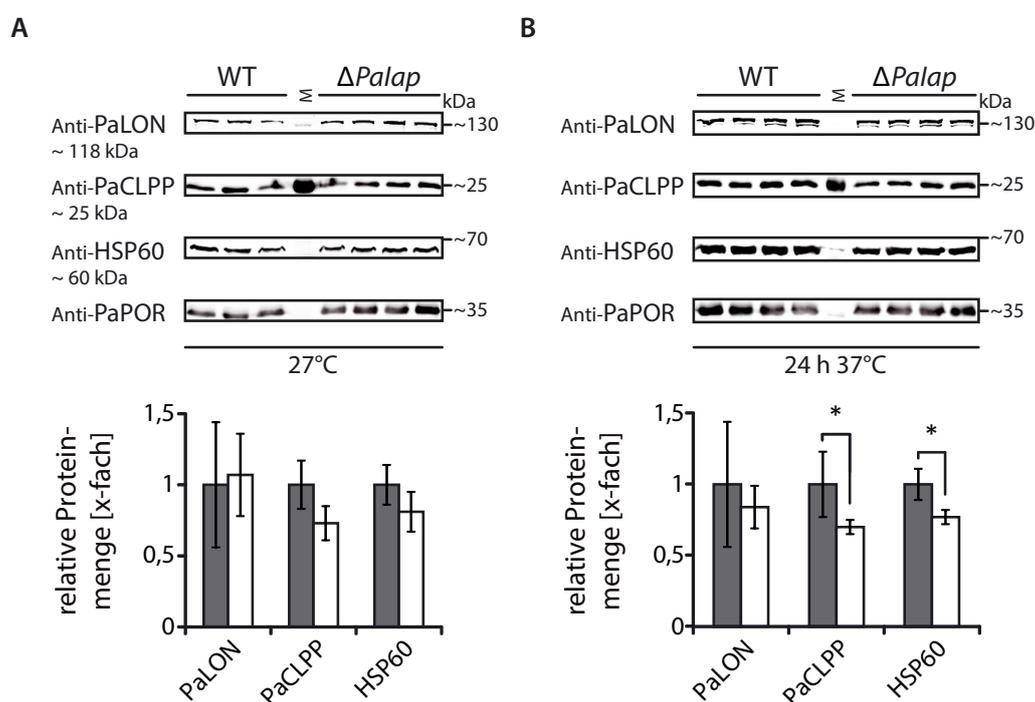
#### 4.1.8 Analyse des mitochondrialen Proteoms des *Palap*-Deletionsstamms

Um Hinweise auf die Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf andere Proteine des mitochondrialen Proteoms von *P. anserina* zu erhalten und so eine Erklärung für die beobachteten Phänotypen des  $\Delta Palap$ -

Stamms zu finden, wurden sowohl gezielt die Proteinmengen von Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle untersucht, als auch vergleichende Analysen der mitochondrialen Proteome vom Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamm durchgeführt.

#### 4.1.8.1 Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf Komponenten des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems

Zur Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase haben einige Proteine teilweise redundante Funktionen. Um zu überprüfen, ob der Verlust von PaIAP andere Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems beeinflusst, wurden mitochondriale Proteine von 14 Tage alten



**Abb. 19: Einfluss der Deletion von *Palap* auf andere Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems.**

Western Blot-Analysen mit je 30  $\mu$ g mitochondrialen Proteinextrakten von 14 Tage alten Wild- (grau) und *Palap*-Deletionsstämmen (weiß). Die Anzucht des Myzels erfolgte wie in Abb. 18 beschrieben. Die  $\Delta Palap$ -Proben bestehen ebenfalls aus dem Myzel von drei unterschiedlichen *Palap*-Deletionsstämmen, die wie in Abb. 18 beschrieben behandelt wurden (WT aus Abb. 18,  $\Delta Palap$ : F114780, F114800, F114831, \*F114840, \*F114851, \*F114871, \*F114900, \*F114910, F114921, F114930, \*F114940, \*F114981). Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine durch 12 %ige SDS-PAGE wurden diese auf PVDF-Membranen transferiert. Zum Nachweis wurden ein PaLON- bzw. PaCLPP-spezifischer Antikörper sowie ein HSP60-Antikörper verwendet. Die Detektion von Porin (PaPOR) dient zur Normierung. Der Mittelwert der verwendeten Wildstämmen wurde jeweils auf 1 gesetzt. Alle Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der Messung an. **(A)** Nach Anzucht bei 27°C werden keine signifikanten Unterschiede in den relativen Proteinmengen von PaLON (WT  $1x \pm 0,44$ ;  $\Delta Palap$   $1,07x \pm 0,29$ ;  $p > 0,05$ ), PaCLPP (WT  $1x \pm 0,17$ ;  $\Delta Palap$   $0,73x \pm 0,12$ ;  $p > 0,05$ ) und HSP60 (WT  $1x \pm 0,30$ ;  $\Delta Palap$   $0,81x \pm 0,14$ ;  $p > 0,05$ ) zwischen den Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolaten sichtbar. **(B)** Inkubation bei 37°C führt zu signifikant reduzierten Proteinmengen von PaCLPP (WT  $1x \pm 0,23$ ;  $\Delta Palap$   $0,7x \pm 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) und HSP60 (WT  $1x \pm 0,11$ ;  $\Delta Palap$   $0,77x \pm 0,05$ ;  $p < 0,01$ ) in den *Palap*-Deletionsstämmen, während die PaLON-Proteinmenge (WT  $1x \pm 0,44$ ;  $\Delta Palap$   $0,84x \pm 0,15$ ;  $p > 0,05$ ) mit der des Wildstamms vergleichbar ist (modifiziert nach Weil et al. 2011). M – Marker SM0671.

Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 19). Die Stämme wurden dabei durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C angezogen. Daraufhin wurden die relativen Proteinmengen der Matrixproteasen PaLON und der PaCLPP-Proteaseuntereinheit der PaCLXP-Protease, sowie des Chaperonins PaHSP60 überprüft. Während sich bei 27°C die Proteinmenge von PaLON nicht zwischen den Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen unterscheidet (Abb. 19A), weisen die  $\Delta$ *Palap*-Isolate verglichen mit den Wildtypisolaten tendenziell geringere Mengen an PaCLPP und PaHSP60 auf. Nach Inkubation bei 37°C enthalten die Mitochondrien der  $\Delta$ *Palap*-Isolate signifikant weniger PaCLPP und PaHSP60 als die Wildstämme (Abb. 19B), während die PaLON-Menge der im Wildstamm vorliegenden Proteinmenge entspricht.

Während sich die Proteinmengen von PaLON, PaCLPP und PaHSP60 in mitochondrialen Proteinextrakten der Wild- und *Palap*-Deletionsstämme bei 27°C nicht unterscheiden, sind die PaCLPP- und PaHSP60-Mengen in den Mitochondrien hitzestresser *Palap*-Deletionsstämme deutlich reduziert.

Als weitere, indirekte Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems wurde die Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf die Prohibitine 1 und 2 untersucht. Diese bilden in *S. cerevisiae* einen hochmolekularen Komplex mit der m-AAA Protease und regulieren diese (vgl. 1.4.1; Steglich et al. 1999). Nicht-assemblierte Prohibitin-Untereinheiten werden dagegen von YME1 abgebaut (Kambach et al. 2005). Dementsprechend wurden in initialen Western Blot-Analysen die relativen Mengen an PaPHB1 und PaPHB2 in den mitochondrialen Proteinextrakten der Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Stämme untersucht (Anhang Abb. 46). Dazu wurden Peptidantikörper verwendet, die gegen die homologen Proteine in *S. cerevisiae* generiert wurden. Anders als in *S. cerevisiae* wird in den  $\Delta$ *Palap*-Stämmen weder bei 27°C noch nach 24stündiger Inkubation bei 37°C eine Akkumulation von PaPHB1 und PaPHB2 sichtbar verglichen mit den Wildstämmen. In *P. anserina* scheinen die Prohibitine demnach nicht von PaIAP abgebaut zu werden.

#### **4.1.8.2 Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf Proteinmodifikationen des hitzestressen mitochondrialen Proteoms von *P. anserina***

In Rosettenblättern von *A. thaliana* ruft der Verlust von *AtFtsH4* unter Kurztagbedingungen eine Akkumulation carbonylierter Proteine hervor, während unter Langtagbedingungen (optimale Bedingungen) kein Unterschied zum Wildstamm festgestellt werden kann (vgl. 1.4.2.4; Gibala et al. 2009). Da Hitzestress zu oxidativem Stress führt, der vor allem von der mitochondrialen Atmungskette verursacht wird (Davidson & Schiestl 2001), wurde die Proteinmodifikation mitochondrialer Proteinextrakte von sieben Tage alten Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten untersucht. Diese wurden auf M2-Fest- und dann in CM-Flüssigmedium bei 27°C bzw. 15 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C angezogen. Bei

der Western Blot-Analyse wurden sowohl die Carbonylierung als auch die Ubiquitinierung der mitochondrialen Proteine überprüft (Anhang Abb. 47). Dabei wird, ähnlich wie bei Inkubation bei 27°C (vgl. 4.1.4), auch bei 37°C kein signifikanter Unterschied in der Menge an carbonylierten Proteinen zwischen den Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen erkennbar (Anhang Abb. 47A). Tendenziell bleibt die Menge an geschädigten Proteinen in den Deletionsstämmen vergleichbar mit der bei 27°C, während sie in den Wildstämmen durch Hitzestress zuzunehmen scheint. Dagegen nimmt die Menge ubiquitiniertes mitochondrialer Proteine nach Inkubation bei 37°C verglichen mit der Ubiquitinierung bei 27°C in den Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Stämmen signifikant zu (Anhang Abb. 47B). Dennoch unterscheiden sich weder das Bandenmuster noch die Intensitäten der Banden zwischen den Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Stämmen bei 27°C bzw. nach Hitzestress.

Der Verlust der i-AAA Protease PaIAP hat auch bei Hitzestress keinen Einfluss auf die Proteinmodifikation (Carbonylierung und Ubiquitinierung) mitochondrialer Proteine von *P. anserina*.

#### **4.1.8.3 Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf das mitochondriale Proteom von *P. anserina***

Um einen generellen Überblick über die Folgen der Deletion von *Palap* auf das mitochondriale Proteom von *P. anserina* zu erhalten, wurden vergleichende Proteomanalysen durchgeführt. Dazu wurden mitochondriale Proteinextrakte von Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten mit 2D-DIGE und ICAT untersucht (in Kooperation mit Dr. I. Wittig und Dr. H. Heide, beide AK Brandt, Molekulare Bioenergetik, Frankfurt).

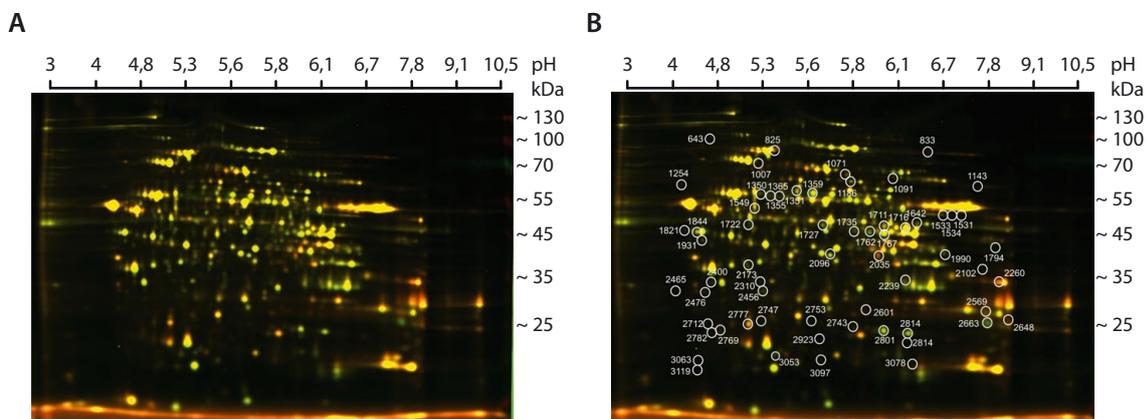
#### **2D-DIGE**

Zur Proteomanalyse mit 2D-DIGE wurden mitochondriale Proteinextrakte aus 14 Tage alten Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen isoliert, die zunächst auf M2-Fest- und anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C angezogen wurden. Vor der Durchführung der 2D-PAGE wurden die Extrakte durch Western Blot-Analysen mit einem PaPRE3-spezifischen und einem PaCLPP-spezifischen Antikörper auf die Reinheit und Intaktheit der Mitochondrien überprüft (Daten nicht gezeigt). PaPRE3 dient als cytosolisches Protein dem Nachweis der Reinheit der mitochondrialen Fraktion, während PaCLPP als Matrixprotein zur Überprüfung der Intaktheit der Mitochondrien verwendet wurde.

2D-DIGE („2-dimensional difference gel electrophoresis“) ist eine auf 2D-PAGE basierende Methode. Der Vorteil gegenüber klassischer 2D-PAGE ist die Möglichkeit der gleichzeitigen Auftrennung von zwei oder mehr Proben. Gleiche Mengen dieser Proben werden zunächst mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die mit Lysin-Seitenketten in den Proteinen reagieren. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die zu vergleichenden Proben vereinigt und gemeinsam nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht aufgetrennt. Dadurch sind die Proben direkt vergleichbar, da Variationen zwischen den Gelen wegfallen. Beim Vergleich von zwei Proben kann ein interner Standard mitgeführt werden, der ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert wurde. Dieser Standard setzt sich aus gleichen Teilen der beiden Proben zusammen. Bei Verwendung der Cy-Farbstoffe Cy2,

Cy3 und Cy5 wird der gelbe Cy2-Farbstoff meistens für den internen Standard verwendet. Die Proben werden mit Cy3 (rot) bzw. Cy5 (grün) markiert. Nach der Auftrennung der Proteine erscheinen die ‚Proteinspots‘ dementsprechend grün oder rot, wenn ein Protein in einer der Proben in größerer Menge vorhanden ist verglichen mit der anderen Probe, bzw. in der Mischfarbe gelb wenn die Proteinmengen in beiden Proben übereinstimmen.

Nach der Auftrennung der isoelektrisch fokussierten Proteine der Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolate und der Detektion durch einen Laserscanner wurden die sechs Gele mit dem Programm ‚DeCyder™‘ (GE Healthcare) ausgewertet (Abb. 20). Als Kriterien für ein differenziell gebildetes Protein musste der ‚Protein-spot‘ in den analysierten Wildstamm- $\Delta Palap$ -Stamm-Pärchen signifikant verändert sein und sich um mindestens 20 % unterscheiden. Nach diesen Kriterien wurden 49 ‚Proteinspots‘ ausgewählt, die in Abb. 20B eingezeichnet sind, und massenspektrometrisch analysiert.



**Abb. 20: Vergleichende Analyse des mitochondrialen Proteoms von Wildstamm- und  $\Delta Palap$ -Isolaten durch 2D-DIGE.** Zur Analyse des mitochondrialen Proteoms von Wild- (n = 5; F93891, F93910, F93940, F93950, F93960) und *Palap*-Deletionsstämmen (n = 6; F93541, F93551, F93600, F93630, F93670, F93691) wurden mitochondriale Proteine aus 14 Tage alten Myzelien isoliert. Die Myzelien wurden zunächst auf M2-Fest- und anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C angezogen. Je 50 µg mitochondriale Proteinextrakte von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen wurden mit fluoreszierenden Cy-Farbstoffen (Cy3 und Cy5) markiert. Zusätzlich wurden je 25 µg jeder Probe gemischt und als interner Standard mit Cy2 markiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion wurden die mit Cy3 bzw. Cy5 markierten Proteine je eines Wildstamms mit denen mit Cy5 bzw. Cy3 markierten eines  $\Delta Palap$ -Isolats vereinigt und je 50 µg des internen Standards dazugegeben. Darauf folgte die isoelektrische Fokussierung (pH 3-10; nicht linear) und die gelelektrophoretische Auftrennung in der zweiten Dimension durch 12,5%ige SDS-PAGE. Als Marker wurde SM0671 verwendet. Nach der Auftrennung wurden die fluoreszenzmarkierten Proteine mit einem Laserscanner dokumentiert (A). Die Auswertung erfolgte mit dem Programm ‚DeCyder™‘ (GE Healthcare) (B). Das in (A) und (B) exemplarisch dargestellte 2D-DIGE-Gel zeigt den mit Cy5 markierten (grün) Wildstamm F93960 und den Cy3-markierten (rot) *Palap*-Deletionsstamm F93691. Der Cy2-markierte interne Standard ist gelb dargestellt. Insgesamt wurden 49 ‚Proteinspots‘ ausgewählt und massenspektrometrisch untersucht. Der Wildstamm F93940 wurde in zwei Ansätzen verwendet.

In den 49 ausgewählten ‚Proteinspots‘ wurden jeweils 5 - 40 Proteine identifiziert, sodass zunächst das für die unterschiedliche Fluoreszenz verantwortliche, differenziell gebildete Protein identifiziert werden musste. Dazu wurde die Wahrscheinlichkeit der mitochondrialen Lokalisation der Aminosäu-

resequenz, sowie das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt der Sequenz ohne Signalpeptid bestimmt und mit der Lage im Gel verglichen. Weiterhin wurden die Zahl der identifizierten Peptide und die Güte der massenspektrometrischen Identifizierung berücksichtigt. Nach diesen Kriterien wurden 21 Proteine identifiziert, die in Tabelle 21 aufgelistet sind. Teilweise war ein Protein in mehreren, nebeneinander liegenden ‚Proteinspots‘ vorhanden, was z.B. auf Isoformen des Proteins hindeutet, bzw. es war nicht in jedem Fall möglich dem ‚Proteinspot‘ ein Protein zuzuordnen.

Von den 21 identifizierten Proteinen ist die Menge im  $\Delta Palap$ -Stamm bei 16 Proteinen erhöht gegenüber dem Wildstamm. Die Proteine lassen sich verschiedenen Stoffwechselwegen zuordnen. Die größte Gruppe bilden dabei die Proteine, die am Aminosäure-Metabolismus beteiligt sind. Diese sind sowohl an der Synthese von Lysin (Homoisocitrat-Dehydrogenase) und der reversiblen Umwandlung von Serin zu Glycin (Serin-Hydroxymethyltransferase) beteiligt, als auch an der Synthese bzw. dem Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin (Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase, Verzweigtkettige-Aminosäuren Aminotransferase und Acetolactat-Synthase). Dabei sind alle Enzyme mit Ausnahme der  $\alpha$ -Kette der Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase in der Deletionsmutante in größerer Menge vorhanden als im Wildstamm.

Eine weitere Gruppe bilden die Proteine der mitochondrialen Atmungskette, von denen die beiden Untereinheiten der ATP-Synthase in den  $\Delta Palap$ -Isolaten in größerer Menge vorhanden sind als in den Wildstämmen. Dagegen ist die Menge des Homolog der 24 kDa-Untereinheit der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase reduziert.

Die Enzyme des Methanol-Metabolismus und des Fettsäurestoffwechsels sind in ähnlicher Weise betroffen und liegen in den Mutanten vermehrt vor. Die  $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins wurde ebenfalls zum Fettsäurestoffwechsel gezählt, obwohl dieses Protein Elektronen nicht nur auf Flavoprotein-Dehydrogenasen des Fettsäure-, sondern auch auf Flavoprotein-Dehydrogenasen des Aminosäure-Metabolismus überträgt (Roberts et al. 1996).

Bei den Enzymen des Citratzyklus ist die Menge der mitochondrialen Malat-Dehydrogenase in den  $\Delta Palap$ -Isolaten reduziert, während die der Succinyl-CoA-Ligase (Succinyl-CoA-Synthase) verglichen mit dem Wildstamm erhöht ist.

In der Gruppe der Chaperone liegen die Proteine HSP60 und AFG1 vermehrt vor, während die Prohibitin 1-Menge stark vermindert ist. AFG1 ist eine mitochondriale ATPase, die der i-AAA und m-AAA Protease ähnelt, jedoch fehlt ihr die charakteristische Zink-Protease-Domäne (Lee & Wickner 1992).

**Tabelle 21: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der durch 2D-DIGE ausgewählten ‚Proteinspots‘.** Von den pro ‚Proteinspot‘ (Abb. 20) identifizierten Proteinen wurde anhand der Aminosäuresequenz die mitochondriale Lokalisation überprüft (‚MitoProtII‘) und sowohl das theoretische Molekulargewicht als auch der isoelektrische Punkt ohne mitochondriale Signalsequenz bestimmt und mit der Lage des ‚Proteinspots‘ im Gel verglichen (vgl. Anhang Tabelle 23). Zusätzlich wurde die Güte der massenspektrometrischen Analyse berücksichtigt. Das nach diesen Kriterien passendste Protein wurde ausgewählt und einem Stoffwechselweg zugeordnet. Die Menge gibt das relative Verhältnis im *Palap*-Deletions- verglichen mit dem Wildstamm an. Die ‚UniProt‘-Identifizierungsnummern sind in Klammern angegeben.

Proteinname und Stoffwechselweg	Menge ( $\Delta Palap/WT$ )
<b>Atmungskette</b>	
• putatives Homolog der 24 kDa-Untereinheit der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (B2B4L4)	-21 %
• putativer Vorläufer der mitochondrialen ATP-Synthase Untereinheit 4 (B2AU12)	+32 %
• putative mitochondriale ATP-Synthase Untereinheit D (B2AT17)	+88 %
<b>Citratzyklus</b>	
• mitochondriale Malat-Dehydrogenase (B2AZV9)	-39 %
• putativer Vorläufer der $\beta$ -Kette der mitochondrialen Succinyl-CoA-Ligase [GDP-bildend] (B2B0Y1)	+23-82 %
<b>Aminosäure-Metabolismus</b>	
• putativer Vorläufer der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Acetolactat-Synthase (B2B064)	+72 %
• putativer Vorläufer der mitochondrialen Homoisocitrat-Dehydrogenase (B2AB72)	+23 %
• Verzweigt-kettige-Aminosäuren Aminotransferase (B2AR54)	+35 %
• putative $\alpha$ -Kette der mitochondrialen Methylcrotonoyl-CoA-Carboxylase (B2ATC1)	-30 %
• putativer Vorläufer der mitochondrialen Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase [acylierend] (B2A8W9)	+22-87 %
• Serin-Hydroxymethyltransferase (B2ADB9)	+22-31 %
<b>Methanol-Metabolismus</b>	
• putative Format-Dehydrogenase (B2B7M8)	+23-67 %
• putative Alkohol-Dehydrogenase (B2APT2)	+33 %
<b>Chaperone</b>	
• putativer Vorläufer des mitochondrialen Hitzeschockproteins 60 (B2B270)	+22-39 %
• putatives AFG1 (B2B3P4)	+27 %
• putatives Prohibitin 1 (B2B7Z4)	-72 %
<b>Fettsäure-Metabolismus</b>	
• Vorläufer der mitochondrialen Enoyl-CoA-Hydratase (B2AXD7)	+28 %
• putative $\alpha$ -Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins (B2B318)	+37 %
<b>Ergosterol-Biosynthese</b>	
• putative NADH-Cytochrom $b_5$ -Reduktase (B2AYM6)	-52 %
<b>Synthese von Häm</b>	
• Ferrochelatase (B2B2B8)	+29 %
<b>Import</b>	
• putativer Vorläufer der $\beta$ -Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (B2AB90)	+23 %

Das an der Ergosterol-Biosynthese beteiligte Flavoenzym NADH-Cytochrom  $b_5$ -Reduktase liegt in den Mitochondrien der  $\Delta Palap$ -Isolate in verminderter Menge vor. Dagegen weisen die Mitochondrien der Mutanten erhöhte Proteinmengen der an der Häm-Synthese beteiligten Ferrochelatase sowie der Prozessierungspeptidase auf, die die Präsenz neu in die Mitochondrien importierter Proteine entfernt.

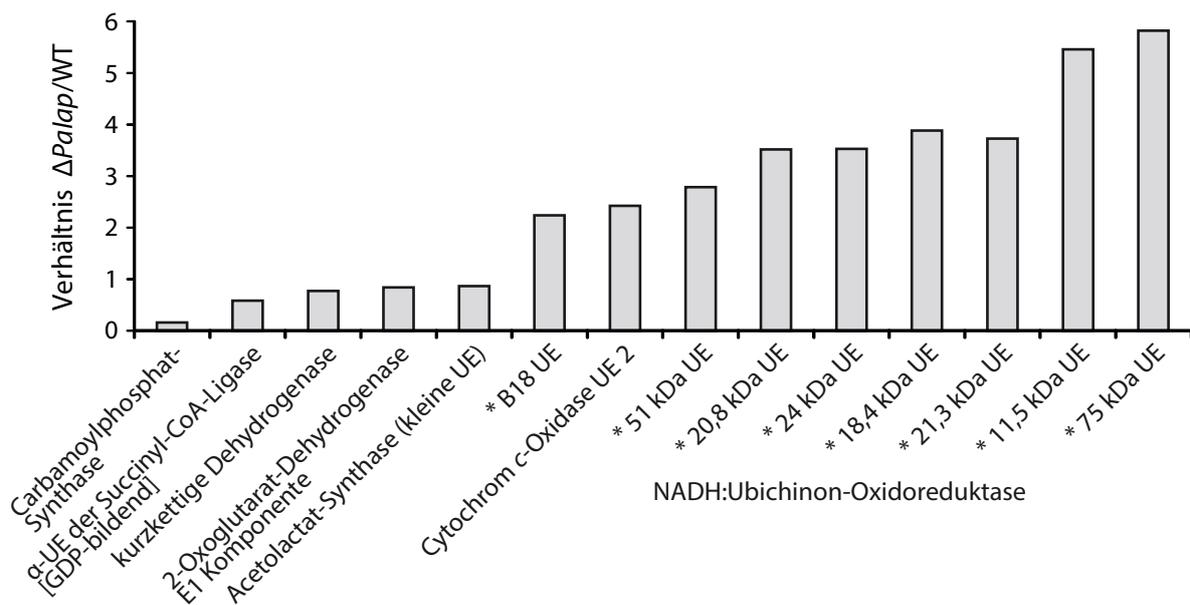
Der Vergleich der mitochondrialen Proteome von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen zeigt, dass sich die Mengen einiger Proteine unterscheiden. Darauf aufbauende Experimente wie z.B. Western Blot-Analysen werden weitere Hinweise liefern, ob dies durch den Verlust von PalAP hervorgerufen wird.

## ICAT

Da die bisher identifizierten Substrate der i-AAA Protease größtenteils membrangebunden sind (vgl. Tabelle 1), wurde eine weitere Methode zur quantitativen Analyse komplexer Proteingemische zweier Proben angewendet. Mitochondriale Proteinextrakte eines 14 Tage alten Wild- und eines *Palap*-Deletionsstamms, die durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C angezogen wurden, wurden mit der ICAT-Technik untersucht (Abb. 21).

ICAT steht für „*isotope-coded affinity tag*“ und dient zur relativen Quantifizierung von Proteinen aus komplexen Proteingemischen, wie z.B. dem mitochondrialen Proteom. Zunächst werden jeweils identische Mengen der zu vergleichenden Proben mit reaktiven Sonden markiert, die unterschiedliche stabile Kohlenstoffisotope enthalten. Eine Probe wird mit einer  $^{12}\text{C}$ -Sonde und die andere mit einer  $^{13}\text{C}$ -Sonde markiert. Dabei erfolgt eine kovalente Bindung an Cysteine im Protein. Nach dem Abstoppen der Reaktion werden die beiden Proben vereinigt und mit Trypsin verdaut. Nach der chromatographischen Auftrennung und Anreicherung der markierten Peptide folgt eine massenspektrometrische Analyse. Dabei können sowohl die Proteine identifiziert als auch deren Verhältnis zueinander ermittelt werden. Dies erfolgt durch den relativen Vergleich der Signalintensitäten der mit den unterschiedlichen Isotopen markierten Peptide (Gygi et al. 1999). Der Vorteil gegenüber 2D-PAGE ist, dass Proteine mit extrem sauren oder basischen isoelektrischen Punkten, sehr geringem oder hohem Molekulargewicht, selten vorkommende Proteine und membrangebundene Proteine besser in der ICAT-Analyse vertreten sind.

Die Auswertung der identifizierten, differenziell gebildeten Proteine zeigt, dass vor allem Untereinheiten von Atmungskettenkomplexen in größerer Menge (2 - 6fache Menge) im  $\Delta Palap$ -Stamm vorhanden sind. Von den neun identifizierten Atmungskettenkomplex-Untereinheiten können acht Komplex I zugewiesen werden, während COX2 eine Untereinheit von Komplex IV (Cytochrom *c*-Oxidase) darstellt. Dagegen sind die Mengen der Carbamoylphosphat-Synthase, die an der Harnstoffsynthese beteiligt ist, der kurzkettigen Dehydrogenase, die den ersten Schritt der Oxidation von Fettsäuren katalysiert, der kleinen Untereinheit der Acetolactat-Synthase, des ersten Enzyms der Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren, sowie der beiden Enzyme des Citratzyklus Succinyl-CoA-Ligase und 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase im *Palap*-Deletionsstamm verringert.



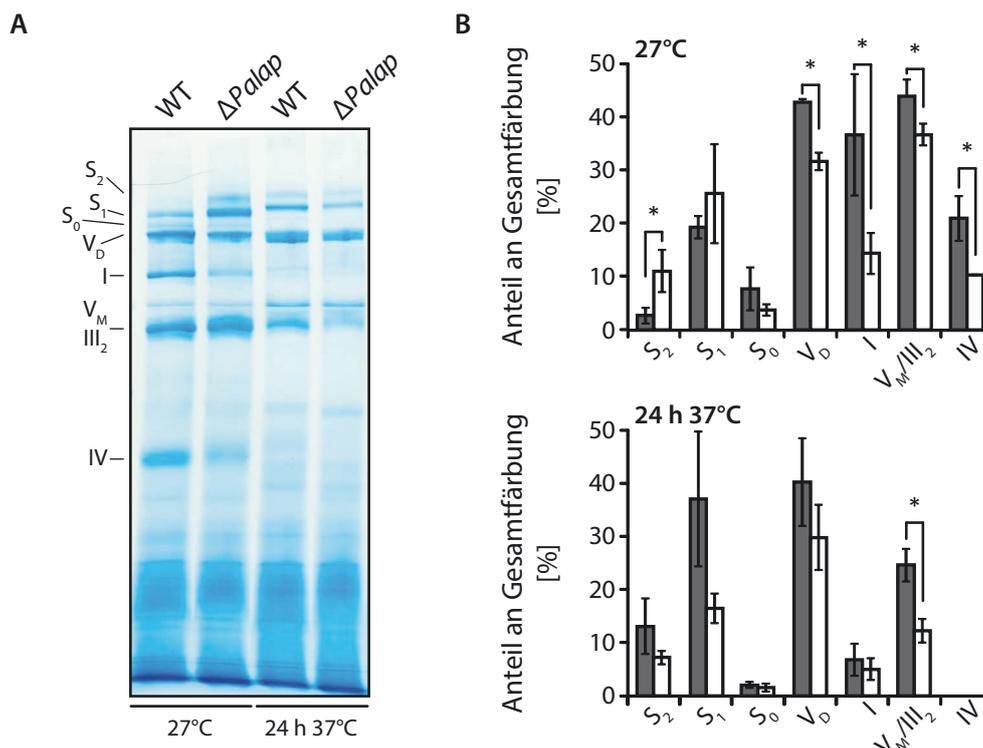
**Abb. 21: Vergleichende Analyse des mitochondrialen Proteoms eines Wild- und  $\Delta Palap$ -Stamms durch ICAT.** Zur initialen Analyse des mitochondrialen Proteoms des Wild- ( $n = 1$ ) und  $\Delta Palap$ -Deletionsstamms ( $n = 1$ ) wurden mitochondriale Proteine aus 14 Tage altem Myzel isoliert, das durchgängig bei 27°C auf M2-Festmedium angezogen wurde. Je 100  $\mu\text{g}$  mitochondriale Proteine wurden mit dem schweren bzw. dem leichten ICAT-Reagenz markiert, sodass die Probe des Wildstamms F128450 mit  $^{12}\text{C}$  und die des  $\Delta Palap$ -Isolats F128150 mit  $^{13}\text{C}$  markiert wurde. Anschließend wurden die Proteine vereinigt, mit Trypsin verdaut, affinitätsgereinigt und die Peptide massenspektrometrisch untersucht. Das Balkendiagramm zeigt, dass vor allem Peptide von Untereinheiten (UE) der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I; mit \* markiert) im  $\Delta Palap$ -Deletionsstamm in größerer Menge vorliegen verglichen mit dem Wildstamm. Die „UniProt“-Identifizierungsnummern sind im Anhang in Tabelle 24 aufgelistet.

Wie bei der 2D-DIGE-Analyse liefert die initiale ICAT-Analyse des mitochondrialen Proteoms der Deletionsmutante interessante Einblicke in mögliche Aufgaben von PalAP, z.B. bei der Kontrolle der Verfügbarkeit der Untereinheiten zur Assemblierung der Atmungskettenkomplexe (vgl. 1.4.2.5). Dies muss jedoch noch abgesichert werden, was z.B. durch Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen geeignete Untereinheiten von Komplex I erfolgen könnte.

#### 4.1.9 Auswirkung der Deletion von *Palap* auf die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe

Als membrangebundene Proteasen sind sowohl die i-AAA als auch die m-AAA Protease am Abbau, aber auch an der Assemblierung bzw. Stabilisierung von Membranproteinen beteiligt (Leonhard et al. 2000; Kolodziejczak et al. 2007). In *S. cerevisiae* und *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass der Verlust der i-AAA Protease Einfluss auf Komplexe der Atmungskette hat (Pearce & Sherman 1995; Kolodziejczak et al. 2007). Aus diesem Grund wurde überprüft, wie sich die Deletion von *Palap* auf die Atmungskettenkomplexe von *P. anserina* auswirkt.

Dazu wurden mitochondriale Proteine aus 14 Tage alten Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen isoliert, die durchgängig auf M2-Festmedium angezogen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C. Zur Analyse der Atmungskettenkomplexe wurden diese mit dem milden Detergenz Digitonin aus der inneren mitochondrialen Membran herausgelöst und durch blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) in einem Gradientengel aufgetrennt (Abb. 22A und Anhang Abb. 48).



**Abb. 22: Untersuchung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei Wild- und  $\Delta Palap$ -Deletionsstämmen.** BN-PAGE mit je 100  $\mu$ g mitochondrialen Proteinen von 14 Tage alten Wild- ( $n = 3$ ) und  $\Delta Palap$ -Kulturen ( $n = 3$ ) aus Abb. 19. Die membrangebundenen Proteine wurden mit Digitonin im Verhältnis 3 g Digitonin/g Protein solubilisiert und durch BN-PAGE mit einem Gradientengel (3,5 - 13 %) aufgetrennt (A). Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt und mit Wasser entfärbt, wodurch die Atmungskettenkomplexe I,  $V_M$  und  $III_2$ ,  $V_0$ , IV, sowie die Superkomplexe  $S_{0-2}$  ( $S_0$ :  $I_1 III_2 IV_0$ ;  $S_1$ :  $I_1 III_2 IV_1$ ;  $S_2$ :  $I_1 III_2 IV_2$ ) sichtbar werden. (B) Die densitometrische Auswertung der BN-PAGE erfolgte mit dem Programm „Quantity One“ (Bio-Rad). Zur Normierung wurde die Gesamtfärbung der jeweiligen Bahn verwendet. Bei 27°C sind die Proteinmengen der Komplexe IV (WT 20,9 %  $\pm$  4,2;  $\Delta Palap$  10,3 %  $\pm$  0,1;  $p < 0,05$ ),  $V_M/III_2$  (WT 43,9 %  $\pm$  3,5;  $\Delta Palap$  36,6 %  $\pm$  2,1;  $p < 0,05$ ), I (WT 36,6 %  $\pm$  11,4;  $\Delta Palap$  14,3 %  $\pm$  3,8;  $p < 0,05$ ) und  $V_0$  (WT 42,7 %  $\pm$  0,5;  $\Delta Palap$  31,6 %  $\pm$  1,6;  $p < 0,001$ ) bei den  $\Delta Palap$ -Isolaten (weiß) signifikant reduziert verglichen mit den Wildstämmen (grau). Die Menge an Superkomplex  $S_2$  ist dagegen erhöht (WT 2,6 %  $\pm$  1,5;  $\Delta Palap$  11 %  $\pm$  3,9;  $p < 0,05$ ), während weder die Mengen an Superkomplex  $S_0$  (WT 7,6 %  $\pm$  4;  $\Delta Palap$  3,7 %  $\pm$  1,1;  $p > 0,05$ ) noch an  $S_1$  (WT 19,3 %  $\pm$  2,1;  $\Delta Palap$  25,5 %  $\pm$  9,3;  $p > 0,05$ ) signifikant verändert sind. Hitzestress beeinflusst die Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe sowohl bei den Wild- als auch bei den  $\Delta Palap$ -Deletionsstämmen. Während sich die Mengen an Superkomplex  $S_0$  (WT 2 %  $\pm$  0,6;  $\Delta Palap$  1,5 %  $\pm$  0,7;  $p > 0,05$ ),  $S_1$  (WT 36,9 %  $\pm$  12,6;  $\Delta Palap$  16,4 %  $\pm$  2,8;  $p > 0,05$ ) und  $S_2$  (WT 13 %  $\pm$  5,2;  $\Delta Palap$  7,2 %  $\pm$  1,3;  $p > 0,05$ ), sowie von Komplex  $V_0$  (WT 40,1 %  $\pm$  8,2;  $\Delta Palap$  29,8 %  $\pm$  6,1;  $p > 0,05$ ), I (WT 6,7 %  $\pm$  3;  $\Delta Palap$  5 %  $\pm$  2;  $p > 0,05$ ) und IV (WT 0 %;  $\Delta Palap$  0 %) nicht signifikant unterscheiden, weisen die Wildstämmen signifikant mehr Komplex  $V_M/III_2$  (24,6 %  $\pm$  3,1) auf verglichen mit den  $\Delta Palap$ -Isolaten (12,2 %  $\pm$  2,2;  $p < 0,01$ ; modifiziert nach Weil et al. 2011).

Die Coomassie-Färbung des Gels zeigt die für *P. anserina* typische Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe (Krause et al. 2004). Allerdings werden bereits bei Anzucht bei 27°C Unterschiede in den Mengen der einzelnen Komplexe zwischen Wild- und *Palap*-Deletionsstamm deutlich (Abb. 22B). So sind in den Mitochondrien der  $\Delta$ *Palap*-Isolate die Mengen der monomeren Komplexe I und IV mit ~ 40 % bzw. ~ 50 % der Wildstamm-Menge am stärksten reduziert. Auch die Intensitäten des Dimers von Komplex V sowie dessen Monomer, welches mit den gewählten Gelelektrophoresebedingungen nicht vom Dimer von Komplex III getrennt werden kann, sind in den  $\Delta$ *Palap*-Stämmen schwächer verglichen mit den Signalstärken der Wildstämme. Dagegen ist die Menge an Superkomplex  $S_2$  ( $I_1III_2IV_2$ ) in den  $\Delta$ *Palap*-Stämmen stark erhöht und auch bei Superkomplex  $S_1$  ( $I_1III_2IV_1$ ) ist eine erhöhte Tendenz sichtbar. Die Intensität von Superkomplex  $S_0$  ( $I_1III_2IV_0$ ) unterscheidet sich dagegen nicht zwischen den Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen.

Die Inkubation bei 37°C beeinflusst die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenproteine sowohl bei den Wild- als auch bei den *Palap*-Deletionsstämmen. Die Monomere von Komplex I und Komplex IV und Superkomplex  $S_0$  sind kaum noch detektierbar. Während sich die Mengen des Dimers von Komplex V zwischen der Mutante und dem Wildstamm nicht unterscheiden, ist die aus dem Monomer von Komplex V und dem Dimer von Komplex III bestehende Bande in den  $\Delta$ *Palap*-Stämmen signifikant schwächer vertreten als beim Wildstamm. Bei den Superkomplexen  $S_1$  und  $S_2$  sind die Signalintensitäten tendenziell beim Wildstamm stärker, jedoch ist der Unterschied zur Mutante nicht signifikant. Dagegen sind die Signalintensität der beiden Superkomplexe beim Wildstamm verglichen mit den Intensitäten bei 27°C ebenfalls deutlich erhöht.

Der Verlust von PalAP hat deutliche Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe von *P. anserina*. Während die Gesamtmenge der Komplexe in den Mitochondrien der *Palap*-Deletionsstämme bei 27°C im Wesentlichen unverändert ist, kommt es zu einer deutlichen Verschiebung der monomeren Komplexe zu stabileren Superkomplexen. Hitzestress scheint in den Mitochondrien der Wildstämme eine ähnliche Tendenz zur Bildung von Superkomplexen auszulösen, wogegen in den  $\Delta$ *Palap*-Isolaten die Mengen aller Komplexe abnehmen verglichen mit den Mengen bei 27°C.

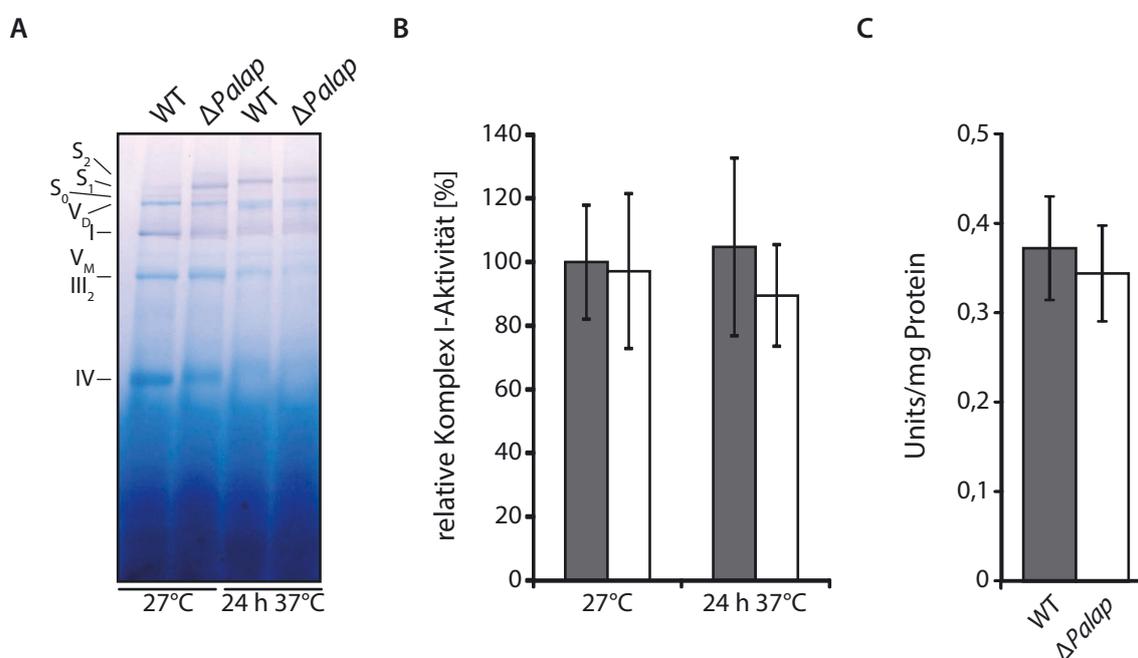
Zur Überprüfung, ob die veränderte Zusammensetzung der Elektronentransportkette in den Mitochondrien der  $\Delta$ *Palap*-Stämme die Aktivität der Komplexe beeinflusst, wurden die Aktivitäten von Komplex I und Komplex IV, sowie der Sauerstoffverbrauch und die Komplex I-Hemmbarkeit mit Rotenon bestimmt.

Die Messung der katalytischen Aktivität von Komplex I erfolgte durch *in-gel*-Färbung und durch photometrische Messung. Zur *in-gel*-Bestimmung der Komplex I-Aktivität wurden die mitochondrialen Prote-

ine der Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolate wie zuvor solubilisiert und durch BN-PAGE aufgetrennt (Abb. 23A und Anhang Abb. 49A). Anschließend wurde das Gel in NADH-haltiger Substratlösung inkubiert.

In Bereichen mit Komplex I-Aktivität wird das Substrat umgesetzt und die Elektronen von NADH auf Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT<sup>2+</sup>) übertragen, wodurch dieses zu NBT reduziert wird und als violettes Präzipitat ausfällt (Jung et al. 2000). Dabei eignet sich diese Methode nur zur Bestimmung der Gesamtmenge an assembliertem Komplex I. Aussagen zur katalytischen Aktivität des Holoenzym können nicht getroffen werden, da nur die initiale NADH-Dehydrogenase-Domäne (N-Modul, Brandt 2006) an der im Test untersuchten Elektronenübertragung beteiligt ist.

Weder nach Anzucht bei 27°C noch nach Hitzestress unterscheidet sich die Gesamtaktivität von Komplex I und der Superkomplexe  $S_{0-2}$  der Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen voneinander (Abb. 23B). Nach Hitzestress ist die Aktivität in den Wildstämmen leicht erhöht, während sie in den  $\Delta Palap$ -Isolaten etwas geringer ist als bei 27°C, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant.



**Abb. 23: Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim  $Palap$ -Deletionsstamm auf die Aktivität von Komplex I.** Die Aktivität von Komplex I wurde sowohl im Gel als auch photometrisch bestimmt. **(A)** *In-gel*-Aktivität von Komplex I in Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen. Dazu wurden die Stämme aus Abb. 22 verwendet und die Proben wie dort beschrieben vorbereitet. Nach der Auftrennung der nativen Proteine wurde das Gel in Komplex I-Färbelösung im Dunkeln inkubiert bis violette Banden sichtbar wurden, welche durch Komplex I-Aktivität entstanden sind. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der *in-gel*-Komplex I-Aktivität. Dazu wurde die optische Dichte aller Banden einer Probe mit Komplex I-Aktivität ( $I$ ,  $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ) addiert und auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Bahn normiert. Der Mittelwert der Aktivität der Wildstämmen bei 27°C wurde 100 % gesetzt. Weder bei 27°C (WT: grau; 100 % ± 17,9;  $\Delta Palap$ : weiß; 97,1 % ± 24,3;  $p > 0,05$ ) noch nach Inkubation bei 37°C (WT: 104,7 % ± 27,9;  $\Delta Palap$ : 89,5 % ± 16;  $p > 0,05$ ) unterscheidet sich die Aktivität von Komplex I zwischen den Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen. **(C)** Zur photometrischen Bestimmung der Aktivität von Komplex I wurde sowohl die NADH:HAR- als auch die dNADH:DBQ-Aktivität von je 50  $\mu$ g bzw. 100  $\mu$ g mitochondrialer Proteinextrakte der Wild- ( $n = 3$ ) und  $\Delta Palap$ -Isolate ( $n = 3$ ) bei 27°C bestimmt und auf die NADH:HAR-Aktivität normiert. Die Komplex I-Aktivität der  $\Delta Palap$ -Stämme (0,35 Units/mg Protein ± 0,05) unterscheidet sich nicht von der der Wildstämmen (0,37 Units/mg Protein ± 0,06;  $p > 0,05$ ; A und B modifiziert nach Weil et al. 2011).

Dies wird durch die photometrische Bestimmung der Komplex I-Aktivität bestätigt (Abb. 23C, durchgeführt in Kooperation mit Dr. S. Dröse, AK Brandt, Molekulare Bioenergetik, Frankfurt). Die Messung wurde ebenfalls mit mitochondrialen Proteinen von 14 Tage alten Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen durchgeführt, die durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C angezogen wurden.

Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität von Komplex I wird die Oxidoreduktase-Aktivität durch die Oxidation von NADH bzw. deamino-NADH (dNADH) bestimmt (Tocilescu et al. 2007). Bei der Oxidation von NADH wird HAR als Elektronenakzeptor eingesetzt, da NADH auch von der in Pflanzen und Pilzen vorkommenden alternativen NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase NDH2 oxidiert werden kann, die die Elektronen jedoch nicht auf HAR übertragen kann (Kerscher et al. 1999). Da jedoch zur Übertragung der Elektronen nur die Funktionalität des N-Moduls benötigt wird, wird die NADH:HAR-Aktivität zur Abschätzung des Komplex I-Gehalts der Probe verwendet. In einem zweiten Ansatz wird die Oxidation von dNADH als Komplex I-spezifischem Substrat (Matsushita et al. 1987) mit DBQ als Elektronenakzeptor bzw. mit dem Inhibitor DQA gemessen. Die Komplex I-Aktivität in Gegenwart des Inhibitors DQA wird von der dNADH:DBQ-Aktivität abgezogen und spiegelt den Inhibitor-sensitiven Teil der Ubichinon-Reduktase-Aktivität. Zuletzt wird zum Vergleich verschiedener Proben die Aktivität auf den Komplex I-Gehalt (NADH:HAR-Aktivität) normiert.

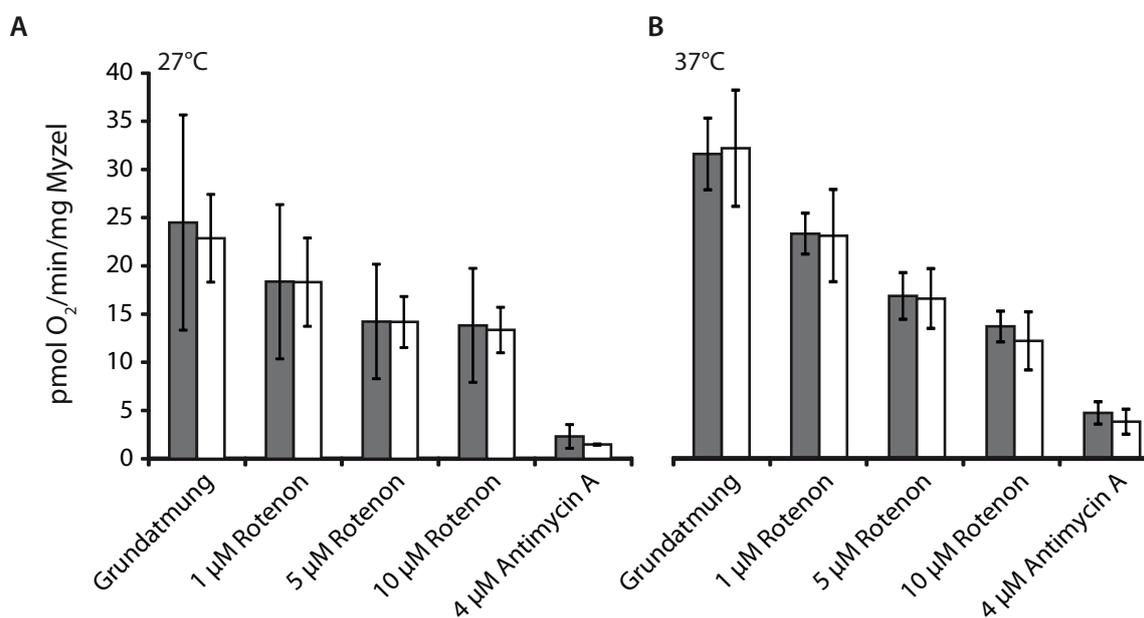
Die Gesamtaktivität von Komplex I ist trotz der veränderten Organisation der Atmungskettenkomplexe in den Mitochondrien der  $\Delta Palap$ -Stämme nicht beeinflusst.

Um den Sauerstoffverbrauch von Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen zu analysieren, wurden 14 Tage alte Myzelien verwendet, die durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Messung mit dem Oxygraph-2k Respirometer (Oroboros) bei 37°C angezogen wurden (Abb. 24). Während der Messung wurden steigende Mengen des Komplex I-Inhibitors Rotenon und zuletzt der Komplex III-Inhibitor Antimycin A zugegeben. Dadurch wird die Elektronenzufuhr zu Komplex IV inhibiert.

*P. anserina* besitzt wie viele Pilze eine alternative Oxidase (AOX), die eine alternative, Komplex IV-unabhängige Atmung ermöglicht (Vanlerberghe & McIntosh 1997). Die AOX erhält die Elektronen direkt von Ubichinon und überträgt diese auf molekularen Sauerstoff. Unter den gewählten Versuchsbedingungen setzt sich der Rest-Sauerstoffverbrauch nach Antimycin A-Zugabe demnach aus dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (z.B. durch Glukose-Oxidasen) und dem Sauerstoffverbrauch durch die AOX zusammen. *PaAox* wird beim Wildstamm jedoch nur unter bestimmten Bedingungen exprimiert (Borghouts et al. 2001). Darüber hinaus konnte durch die Zugabe des AOX-Inhibitors SHAM (Salizylhydroxaminsäure) gezeigt werden, dass die Aktivität von *PaAOX* beim Wildstamm für nur etwa 20 % des Sauerstoffverbrauchs verantwortlich ist (Gredilla et al. 2006).

Insgesamt unterscheidet sich der Sauerstoffverbrauch der Myzelien der Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolate bei steigender Rotenonzugabe weder nach Anzucht bei 27°C (Abb. 24A) noch nach 24stündigem Hitzestress voneinander (Abb. 24B). Jedoch sind die Grundatmung der Myzelien und auch die Atmung nach Rotenonzugabe nach Inkubation bei 37°C tendenziell höher als bei 27°C, wobei der Unterschied nur bei der Grundatmung des Wildstamms signifikant ist.

Die durch den Verlust von PalAP verursachte Veränderung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette hat keine Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber Rotenon.



**Abb. 24: Sauerstoffverbrauch des Wild- und  $\Delta Palap$ -Deletionsstamms mit steigender Rotenonzugabe.** Zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs von Wild- (n = 4) und  $\Delta Palap$ -Isolaten (n = 4) wurde Myzel von 14 Tage alten Stämmen verwendet, die durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C (27°C) bzw. 24 Stunden vor Messung bei 37°C (37°C) und Dauerlicht angezogen wurden. Die Messungen erfolgten bei 27°C bzw. bei 37°C in flüssigem M2-Medium mit dem Oxygraph-2k Respirometer (Oroboros). Der Sauerstoffverbrauch ist in pmol O<sub>2</sub>/min pro mg Myzel (Frischgewicht) angegeben. Die Grundatmung stellt den physiologischen Sauerstoffverbrauch des Myzels dar. Während der Messung wurden steigende Mengen des Komplex I-Inhibitors Rotenon zugegeben (1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M). Weder bei 27°C (A) noch nach Inkubation bei 37°C (B) unterscheidet sich der Sauerstoffverbrauch der  $\Delta Palap$ -Deletionsstämme (weiß) nach Rotenonzugabe von dem der Wildstämme (grau; p jeweils > 0,05), wobei der Verbrauch bei 37°C tendenziell, nicht signifikant höher ist. Lediglich beim Wildstamm ist der Unterschied bei der Grundatmung signifikant (p < 0,05).

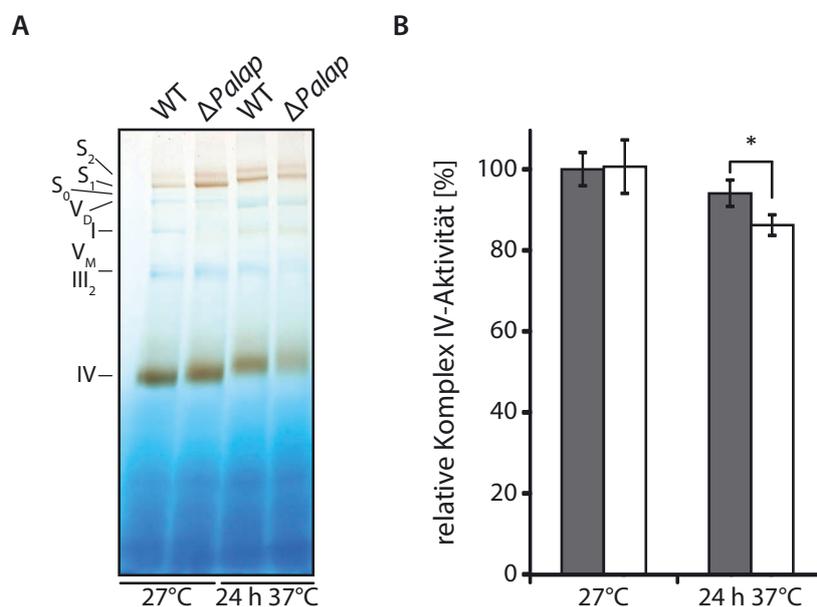
Da in den Mitochondrien der  $\Delta Palap$ -Isolate auch für Komplex IV eine Verschiebung der monomeren Komplexe zu Superkomplexen beobachtet wird (Abb. 22), wurde Komplex IV durch *in-gel*-Färbung analysiert (Abb. 25 und Anhang Abb. 49B). Die Färbung basiert dabei auf den Peroxidase-Eigenschaften kovalent gebundener Häm-Gruppen und kann mit Diaminobenzidin nachgewiesen werden. Somit repräsentiert die Färbung die Komplex IV-Menge mit intakten Hämen.

Die *in-gel*-Färbung der Häm-Gruppen von Komplex IV liefert erste Hinweise auf die Aktivität des Komplexes und erlaubt die Analyse der Verteilung in freie Komplexe bzw. Superkomplexe. Zur Messung der Aktivität von Komplex IV müssten isolierte Mitochondrien wie z.B. bei David et al. (David et al. 2005) photometrisch analysiert werden.

Dabei wird deutlich, dass trotz der geringen Coomassie-Färbbarkeit der Komplex IV-Monomere in Mitochondrien des Deletionsstamms bei 27°C und nach Hitzestress beim Wild- und  $\Delta Palap$ -Deletionsstamm

dennoch vergleichbare Mengen mit intakten Hämen und vermutlich ähnlicher Aktivität vorhanden sind (Abb. 25A). Unter Standardbedingungen unterscheidet sich die Gesamtintensität der Häm-Färbung von Komplex IV in den Mitochondrien der Wild- und  $\Delta Palap$ -Isolate nicht voneinander (Abb. 25B). Dagegen ist die Gesamtfärbung nach Hitzestress in den Deletionsstämmen um  $\sim 10\%$  reduziert verglichen mit der Aktivität in den Wildstämmen.

Trotz der veränderten Organisation der Komplexe in den Mitochondrien der  $\Delta Palap$ -Isolate unterscheidet sich die Intensität der mitochondrialen Gesamtfärbung von Komplex IV bei  $27^\circ\text{C}$  nicht zwischen dem Wild- und  $\Delta Palap$ -Deletionsstamm. Nach Hitzestress weisen die  $\Delta Palap$ -Stämme jedoch eine geringfügig reduzierte Komplex IV-Färbung auf.

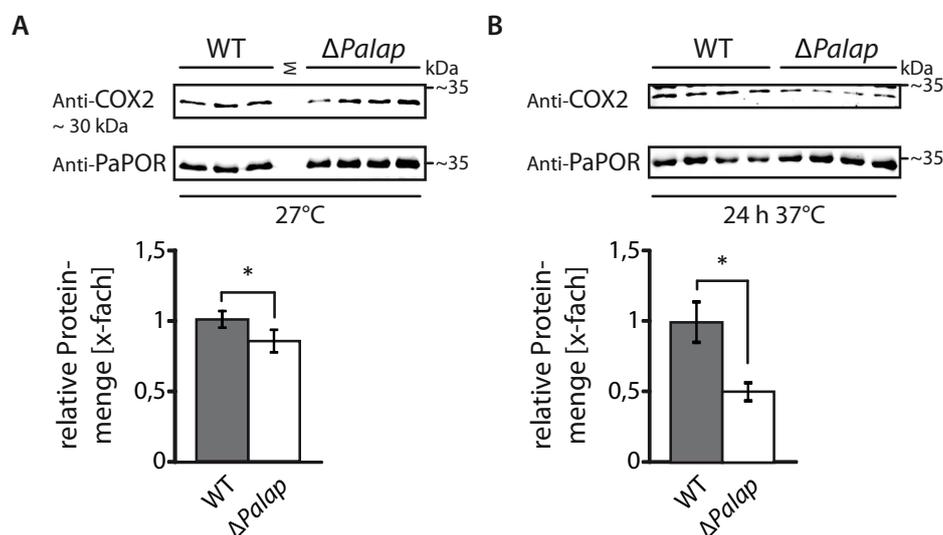


**Abb. 25: Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim  $\Delta Palap$ -Deletionsstamm auf die Aktivität von Komplex IV. (A) *In-gel*-Färbung von Komplex IV in Wild- und  $\Delta Palap$ -Deletionsstämmen. Dazu wurden die Stämme aus Abb. 22 verwendet und die Proben wie dort beschrieben vorbereitet. Nach der Auftrennung der nativen Proteine wurde das Gel in Komplex IV-Färbelösung im Dunkeln inkubiert bis braune Banden sichtbar wurden, welche durch die Oxidation von DAB durch die Häm-Gruppen entstanden sind. (B) Densitometrische Quantifizierung der *in-gel*-Komplex IV-Färbung. Dazu wurde die optische Dichte aller Banden einer Probe mit Komplex IV-Färbung (IV,  $S_1$ ,  $S_2$ ) addiert und auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Bahn normiert. Der Mittelwert der Färbung der Wildstämmen bei  $27^\circ\text{C}$  wurde 100 % gesetzt. Nach Anzucht bei  $27^\circ\text{C}$  gibt es keinen Unterschied in der Intensität der Färbung von Komplex IV zwischen den Wild- (grau;  $100\% \pm 4,1$ ) und  $\Delta Palap$ -Deletionsstämmen (weiß;  $100,6\% \pm 6,6$ ;  $p > 0,05$ ), jedoch nach Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  unterscheidet sich die Färbung von Komplex IV zwischen den Wild- ( $94\% \pm 3,2$ ) und  $\Delta Palap$ -Isolaten ( $86,2\% \pm 2,6$ ;  $p < 0,05$ ; modifiziert nach Weil et al. 2011).**

In *S. cerevisiae* ist nicht-assembliertes COX2 der Cytochrom *c*-Oxidase ein Substrat von YME1, welches in Abwesenheit von *Yme1* stabilisiert wird (Pearce & Sherman 1995; Weber et al. 1996). Aufgrund des beobachteten Effekts der Deletion von *Palap* auf die Zusammensetzung der Atmungskette, und um ein mögliches Substrat zu identifizieren, wurde die relative Proteinmenge von PaCOX2 in den Mitochon-

drien der  $\Delta Palap$ -Isolate bestimmt. Dazu wurden mitochondriale Proteine von 14 Tage alten Wild- und  $Palap$ -Deletionsstämmen durch Western Blot-Analysen mit einem COX2-spezifischen Antikörper analysiert (Abb. 26). Die Stämme wurden durchgängig auf M2-Festmedium bei 27°C bzw. 24 Stunden vor der Isolation der Mitochondrien bei 37°C inkubiert. Bereits unter Standardbedingungen wird ein geringer Unterschied in der PaCOX2-Proteinmenge zwischen den Wild- und  $\Delta Palap$ -Stämmen sichtbar (Abb. 26A), die jedoch in den  $\Delta Palap$ -Isolaten reduziert ist. Dieser Unterschied verstärkt sich durch Hitzestress (Abb. 26B). Nach Inkubation bei 37°C ist die PaCOX2-Menge in den  $\Delta Palap$ -Stämmen 50 % niedriger als in den Wildstämmen.

Anders als in Hefe, in der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase nach Verlust der i-AAA Protease stabilisiert wird, nimmt die PaCOX2-Menge in *P. anserina* durch die Deletion von *Palap* ab.



**Abb. 26: Auswirkung der Deletion von *Palap* auf die Proteinmenge von COX2.** Western Blot-Analyse mit je 30 µg mitochondrialen Proteinextrakten von 14 Tage alten Wild- (WT) und *Palap*-Deletionsstämmen ( $\Delta Palap$ ). Die Anzucht des Myzels erfolgte wie in Abb. 18 und Abb. 19 beschrieben. Die Proteinextrakte wurden durch 12 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurde die Untereinheit PaCOX2 der Cytochrom *c*-Oxidase mit einem COX2-spezifischen Antikörper detektiert. Porin (PaPOR) dient zur Normierung. Der Mittelwert der Wildstämmen wurde jeweils auf 1 gesetzt. Gezeigt ist die Standardabweichung. **(A)** Nach Inkubation bei 27°C (27°C) ist die relative COX2-Proteinmenge bei den  $\Delta Palap$ -Isolaten ( $0,85x \pm 0,08$ ) geringfügig reduziert verglichen mit den Wildstämmen ( $1x \pm 0,06$ ;  $p < 0,05$ ). **(B)** Nach 24 Stunden bei 37°C (24 h 37°C) ist die relative Proteinmenge von COX2 in den *Palap*-Deletionsstämmen ( $0,5x \pm 0,06$ ) deutlich stärker reduziert verglichen mit den Wildstämmen ( $1x \pm 0,14$ ;  $p < 0,001$ ). M – Marker SM0671.

## Fazit

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die Deletion der mitochondrialen i-AAA Protease *Palap* bei *P. anserina* zu einer Mutante mit deutlichen Phänotypen führt. Unter Standardbedingungen scheint PalAP nicht benötigt zu werden, da physiologische Funktionen trotz z.B. einer veränderten Zusammen-

setzung der Atmungskettenkomplexe nicht beeinträchtigt sind. Vielmehr scheint die i-AAA Protease die Lebensspanne von *P. anserina* zu begrenzen, da die Lebensspanne der Deletionsstämme deutlich verlängert ist. Dagegen ist die Gegenwart von PalAP bei Hitzestress essenziell für *P. anserina*. Bei Hitzestress sind die  $\Delta$ Palap-Isolate gegenüber den Wildstammisolaten deutlich benachteiligt, was auf wichtige Funktionen der i-AAA Protease bei höheren Temperaturen hinweist.

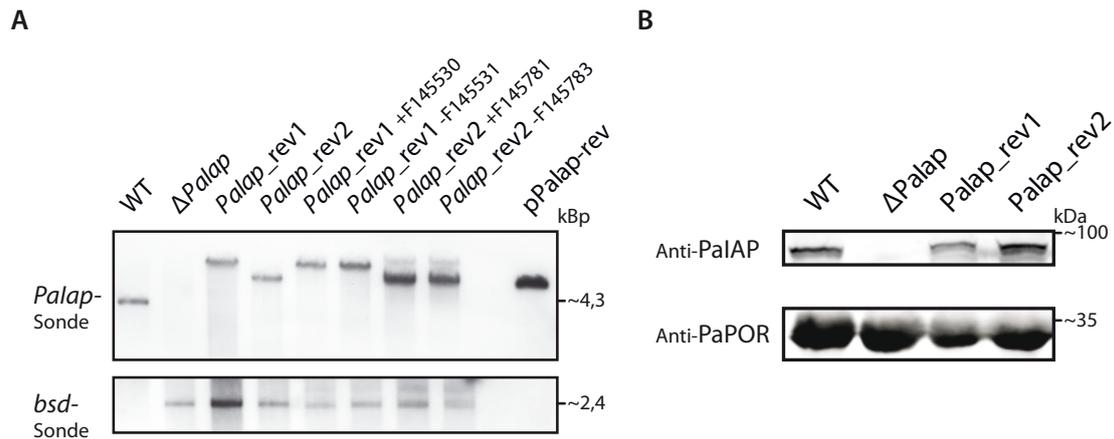
## 4.2 Reversion der Deletion von *Palap*

Um zu bestätigen, dass die in *P. anserina* nach der Deletion von *Palap* beobachtete Verlängerung der Lebensspanne unter Standardbedingungen durch den Verlust der i-AAA Protease verursacht wird, wurde eine Revertante hergestellt. Dazu wurde das *Palap*-Gen mit dem angrenzenden Promotorbereich und der Terminatorregion in den  $\Delta$ Palap-Stamm transformiert. Durch die Wiedereinführung des Gens der i-AAA Protease sollte die Lebensspanne wieder Wildtyp-artig werden.

### 4.2.1 Herstellung von *Palap*-Revertantenstämmen

Zur Herstellung des Reversionsvektors pPalap-rev wurden neben dem offenen Leserahmen von *Palap* ein an das Startkodon angrenzender, etwa 1.000 Bp langer Promotorbereich, sowie ein dem Stoppkodon folgender etwa 500 Bp langer Terminatorbereich amplifiziert. Aufgrund der Größe des Fragments von fast 4 kbp, wurde dieses an einer natürlich im *Palap*-Gen vorkommenden *Pst*I-Schnittstelle in zwei Fragmente geteilt, die in getrennten PCR-Durchgängen amplifiziert wurden. Das den Promotorbereich und den 5'-Bereich des offenen Leserahmens von *Palap* enthaltende Fragment wurde mit den Oligonukleotiden *Palap-Kpn*I-for und *Palap-Pst*I-rev amplifiziert, wodurch am 5'-Ende des Amplikons eine *Kpn*I-Schnittstelle eingefügt wurde. Das den 3'-Bereich des *Palap*-Gens und die Terminatorregion enthaltende Fragment wurde mit den Oligonukleotiden *Palap-Pst*I-for und *Palap-Eco*RV-rev amplifiziert, der am 3'-Ende eine *Eco*RV-Schnittstelle einfügt. Aufgrund der bereits im Deletionsstamm vorhandenen Phleomycin-Resistenz wurden die beiden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdauten Fragmente in den mit *Kpn*I und *Eco*RV geöffneten Vektor pKO7-KU ligiert, welcher zur Selektion in *P. anserina* eine Hygromycin-Resistenzkassette enthält (Abb. 27A). Nach der Transformation des Ligationsansatzes in *E. coli* und der Identifizierung Ampicillin-resistenter, positiver Kolonien, wurde das Reversionsplasmid pPalap-rev isoliert und zur Kontrolle mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut (Abb. 27B). Die Fragmentgrößen stimmen mit den erwarteten Größen des Vektors pPalap-rev überein (Abb. 27C). Um die korrekte Basenabfolge zu verifizieren, wurde das Plasmid pPalap-rev vom 5'-Ende des Promotors bis zum 3'-Ende des Terminators von *Palap* durch SRD (SRD GmbH, Bad Homburg) sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass die *Eco*RV-Schnittstelle am 3'-Ende der Terminatorregion durch eine Punkt-





**Abb. 28: Überprüfung der Reversion der Deletion von *Palap*.** (A) Southern Blot-Analyse zum Nachweis der Integration von *Palap* in das Genom des *Palap*-Deletionsstamms F114341. Je 750 ng DNA des Wildstamms ,s' (WT), des  $\Delta$ *Palap*-Stamms F114341, der Primärtransformanten *Palap\_rev1* und *Palap\_rev2*, sowie von jeweils zwei Sekundärtransformanten wurde mit *Bgl*III verdaut und auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran folgte die Hybridisierung mit einer *Palap*-spezifischen, DIG-markierten Sonde, sowie nach deren Entfernung mit einer *bsd*-spezifischen Sonde zum Nachweis der Resistenzkassette. Die endogene Kopie von *Palap* fehlt bei  $\Delta$ *Palap* und in den Revertanten, die jeweils eine Einzelintegration von *Palap* aufweisen. Als Positivkontrolle wurden 5 ng des mit *Bgl*III verdauten Plasmids p*Palap-rev* aufgetragen. (B) Western Blot-Analyse zum Nachweis der Expression von *Palap* in den Revertanten. Je 100  $\mu$ g mitochondriale Proteine des Wildstamms ,s' (WT), eines  $\Delta$ *Palap*-Isolats, sowie der Primärtransformanten *Palap\_rev1* und *Palap\_rev2* wurden auf einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. PalAP wurde durch einen PalAP-spezifischen Antikörper sowohl im Wildstamm als auch in den beiden *Palap*-Revertanten detektiert. Porin (PaPOR) dient als Ladekontrolle.

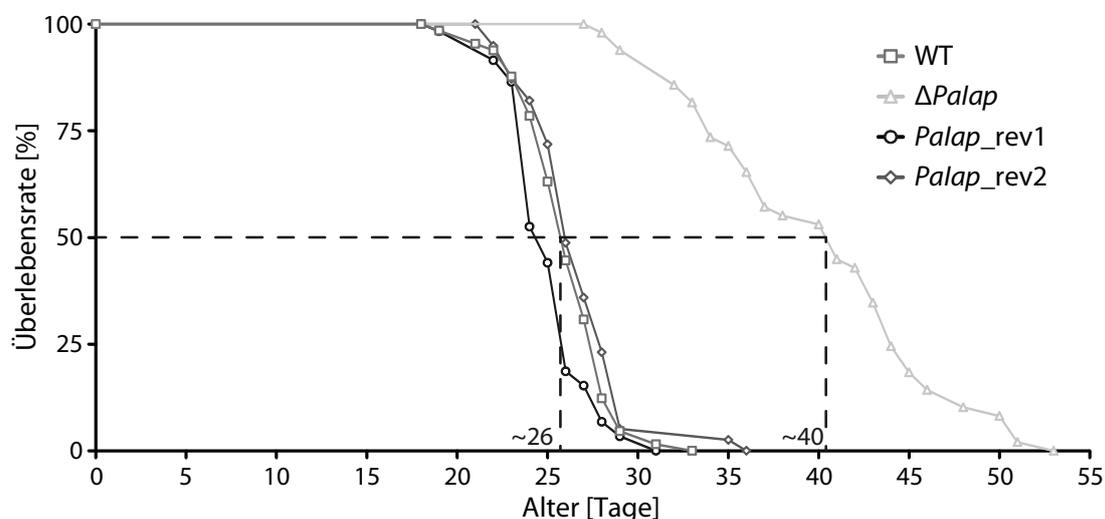
Das im Wildstamm bei  $\sim 4,3$  kbp detektierbare Fragment fehlt sowohl im *Palap*-Deletionsstamm F114341 als auch in den Revertanten *Palap\_rev1*, *Palap\_rev2* und deren Nachkommen. Dagegen enthalten die transgenen Stämme jeweils ein Fragment, welches eine vom Wildstamm-Fragment abweichende Größe aufweist. Zur Kontrolle wurde auch das Plasmid p*Palap-rev* mit *Bgl*III verdaut und analysiert. Da die Plasmidgröße von den Fragmentgrößen der integrierten *Palap*-Sequenzen abweicht, können tandemartige Integrationen ausgeschlossen werden. Zudem wurde mit einer in der Phleomycin-Resistenzkassette bindenden Sonde (*bsd*-Sonde) die statt des Wildstammgens *Palap* eingefügte Resistenzkassette nachgewiesen.

Zum Nachweis der Expression von *Palap* in den Revertanten *Palap\_rev1* und *Palap\_rev2* wurden mitochondriale Proteine isoliert und mit Western Blot-Analyse mit einem PalAP-spezifischen Antikörper untersucht (Abb. 28B). Während in den mitochondrialen Proteinen des zur Kontrolle aufgetragenen  $\Delta$ *Palap*-Stamms kein Protein detektiert werden kann, kann PalAP in beiden Revertanten und im Wildstamm nachgewiesen werden.

Die beiden unabhängigen Revertanten *Palap\_rev1* und *Palap\_rev2* enthalten jeweils eine Einzelintegration des Gens *Palap*, welches in beiden Stämmen exprimiert und in die Mitochondrien importiert werden kann. Die Nachkommen dieser beiden Primärtransformanten wurden für die folgenden Versuche verwendet.

#### 4.2.2 Charakterisierung der *Palap*-Revertanten

Zur Überprüfung, ob die Lebensspanne der Revertanten wieder der des Wildstamms entspricht und somit beim  $\Delta$ *Palap*-Stamm tatsächlich auf dem Verlust der i-AAA Protease beruht, wurden frisch isolierte, monokaryotische Kulturen der Stämme *Palap\_rev1* und *Palap\_rev2* auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bis zum Einstellen des Wachstums bei 27°C und Dauerlicht inkubiert (Abb. 29). Dargestellt sind die Werte von drei unabhängigen Analysen. Dabei zeigt sich, dass die medianen Lebensspannen der *Palap\_rev1*- und *Palap\_rev2*-Isolate mit 24,3 bzw. 25,9 Tagen mit der der Wildstammisolate (25,7 Tage) übereinstimmen, wogegen die mediane Lebensspanne der  $\Delta$ *Palap*-Isolate wie erwartet deutlich verlängert ist (40,4 Tage). Während sich die mittleren Lebensspannen des Wildstamms und der Revertante *Palap\_rev2* nicht unterscheiden, ist die der Revertante *Palap\_rev1* signifikant verkürzt gegenüber dem Wildstamm, wobei der Unterschied nur ~ 6 % beträgt.



**Abb. 29: Analyse der Lebensspanne der *Palap*-Revertantenstämme.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wildstamms (WT; n = 65), des *Palap*-Deletionsstamms ( $\Delta$ *Palap*; n = 49) und der Revertanten *Palap\_rev1* (n = 59) und *Palap\_rev2* (n = 39) wurden auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C im Dauerlicht inkubiert. Die Überlebensrate ist in Prozent angegeben, die Lebensspanne in Tagen. Die mediane Lebensspanne des Wildstamms beträgt 25,7 Tage, die von *Palap\_rev1* liegt bei 24,3 Tagen ( $p < 0,01$ ), und die von *Palap\_rev2* bei 25,9 ( $p > 0,05$ ). Dagegen ist die mediane Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms mit 40,4 Tagen deutlich verlängert ( $p < 0,001$ ). Die Reversion der Deletion von *Palap* führt zu einer Wildstamm-artigen Lebensspanne der *Palap*-Revertantenstämme (modifiziert nach Weil et al. 2011).

Die mediane Lebensspanne des  $\Delta Palap$ -Stamms wird durch die Wiedereinführung von *Palap* ins Genom des Deletionsstamms revertiert, sodass der Effekt auf die Modulation der Expression von *Palap* zurückgeführt werden kann.

Die Wachstumsrate von *P. anserina* ist von der Deletion von *Palap* unter Standardbedingungen nicht beeinflusst. Dementsprechend unterscheiden sich auch die im Rahmen der Lebensspannen-Experimente bestimmten Wachstumsraten der Revertanten *Palap\_rev1*- und *Palap\_rev2* nicht von der des Wildstamms (Anhang Abb. 50A).

### Fazit

Durch die Wiedereinführung von *Palap* wird die durch den Verlust von *Palap* verlängerte Lebensspanne wieder vergleichbar mit der des Wildstamms. Der Phänotyp der  $\Delta Palap$ -Stämme kann somit auf den Verlust von *Palap* zurückgeführt werden.

## 4.3 Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP

Die i-AAA Protease YME1 aus *S. cerevisiae* weist neben der proteolytischen Aktivität eine Chaperonartige Aktivität auf (vgl. 1.4.2.1; Leonhard et al. 1999). Dabei scheint vor allem der Verlust der proteolytischen Funktion für die Eigenschaften *Yme1*-defizienter Stämme verantwortlich zu sein, da die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität zu ähnlichen Phänotypen führt (Thorsness et al. 1993; Weber et al. 1996). Um herauszufinden, ob das Fehlen der Proteaseaktivität von PalAP oder der Verlust der AAA-Domäne mit der Chaperon-artigen Funktion für die verlängerte Lebensspanne des  $\Delta Palap$ -Stamms verantwortlich ist, wurde eine Punktmutation im konservierten Metallbindemotiv von PalAP eingeführt, die bei YME1 zur proteolytischen Inaktivierung führt (Weber et al. 1996).

### 4.3.1 Strategie zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP durch *in-vitro*-Mutagenese

In *S. cerevisiae* führt der Austausch von Glutaminsäure (E) im Metall-bindenden Motiv HExxH durch Glutamin (Q) zur Inaktivierung der Proteaseaktivität von YME1 (Weber et al. 1996). Da die Aminosäuresequenz von YME1 und PalAP im Bereich des Metallbindemotivs identisch ist (Anhang Abb. 44), sollte bei PalAP Glutaminsäure an Position 540 der Sequenz durch Glutamin ersetzt werden (Abb. 30). Durch eine Punktmutation in dem für Glutaminsäure kodierenden Codon Guanin an Position 1 sollte dieses in Cytosin umgewandelt werden, sodass aus dem Basentriplett GAG das für Glutamin kodierende Triplett CAG wird und das mutierte Gen *Palap*<sup>E540Q</sup> entsteht (Abb. 30A und C).

**A** *Palap* im Wildstammgenom

```

5 \ ...ATG ACT GCC TAC CAC GAG GCC GGC CAC GCC CTT GTT...3 \
3 \ ...TAC TGA CGG ATG GTG CTC CGG CCG GTG CCG GAA CAA...5 \
      ...H E A G H...

```

**B** Strategie zur Einführung der Punktmutation

```

          PvuII           EheI
5 \ ...GCC TAC CAC CAGCTGAA TTTGGGGCC GGC CAC GCC CTT...3 \
3 \ ...CGG ATG GTG GTCGACTT AAACCGCCG CCG GTG CCG GAA...5 \

```

**C** *Palap*<sup>E540Q</sup>

```

5 \ ...ATG ACT GCC TAC CAC CAG GCC GGC CAC GCC CTT GTT...3 \
3 \ ...TAC TGA CGG ATG GTG GTC CGG CCG GTG CCG GAA CAA...5 \
      ...H Q A G H...

```

**D** *Palap*<sup>E540QG</sup>

```

          EheI
5 \ ...ACT GCC TAC CAC CAG GGC GCC GGC CAC GCC CTT GTT...3 \
3 \ ...TGA CGG ATG GTG GTC CCG CGG CCG GTG CCG GAA CAA...5 \
      ...H Q G A G H...

```

**Abb. 30: Schematische Darstellung der Strategie zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP.** Gezeigt sind der DNA-Abschnitt von *Palap*, in dem sich die für das Metallbindemotiv der proteolytischen Domäne kodierende Sequenz befindet, sowie die Aminosäuresequenz des Metallbindemotivs im Einbuchstabencode (**A**). Zur Inaktivierung von PalAP sollte das für Glutaminsäure (E) kodierende Basentriplett GAG durch eine Punktmutation zu CAG mutiert werden, welches für Glutamin (Q) kodiert. Dazu wurde ein Teil des offenen Leserahmens von *Palap* in zwei Fragmenten amplifiziert (**B**). Am 3'-Ende des vorderen Fragments sollte durch die Einführung einer *PvuII*-Schnittstelle die Mutation von Guanin zu Cytosin erfolgen. Das nach dem Verdau entstandene glatte Ende sollte mit dem mit *EheI* verdauten 5'-Ende des zweiten Fragments ligiert werden, wodurch die mutierte Sequenz *Palap*<sup>E540Q</sup> entsteht (**C**). Bei *Palap*<sup>E540QG</sup> erfolgte zusätzlich zur Punktmutation die Einführung eines weiteren Basentriplets (GGC), welches für Glycin (G) kodiert (**D**). Dadurch wurde eine zweite *EheI*-Schnittstelle eingefügt.

Dazu wurde das Wildtypgen *Palap* in zwei Fragmente unterteilt, wobei das für Glutaminsäure (E) kodierende Basentriplett das 3'-Ende des einen Fragments darstellt und das darauf folgende, für Alanin (A) kodierende Basentriplett das 5'-Ende des anderen Fragments bildet (Abb. 30B). Beim ersten Klonierungsdurchgang wurde jedoch neben der Punktmutation ein zusätzliches Basentriplett eingeschoben, welches für Glycin (G) kodiert (Abb. 30C). Bei der Translation dieses Gens (*Palap*<sup>E540QG</sup>) wird die Aminosäuresequenz des Metall-bindenden Motivs zu HQGAGH verändert. Das zusätzliche Basentriplett wurde in einem zweiten Klonierungsdurchgang entfernt, sodass das gewünschte Gen *Palap*<sup>E540Q</sup> in Protoplasten des *Palap*-Deletionsstamms transformiert werden konnte.

**4.3.2 In-vitro-Mutagenese zur Herstellung der Plasmide pPalap-E540Q und pPalap-E540QG**

Zur Einführung der Punktmutation in den offenen Leserahmen von *Palap* wurde das Plasmid pPalap-rev verwendet (vgl. 4.2.1), da dieses bereits den offenen Leserahmen von *Palap* mit der ~ 1.000 Bp langen

Promotorregion und dem ~ 500 Bp langen Terminatorbereich enthält. Zur Einführung der Punktmutation wurde ein Teil des offenen Leserahmens von *Palap* in zwei Fragmenten amplifiziert. Das vordere Fragment wurde mit den Oligonukleotiden *Palap\_MunI\_for* und *Palap\_PvuII\_rev* amplifiziert, wobei die *MunI*-Schnittstelle natürlich in der Sequenz von *Palap* vorkommt, während die Einführung der *PvuII*-Schnittstelle zu der gewünschten Punktmutation von Guanin zu Cytosin führt. Das hintere Fragment wurde mit den Oligonukleotiden *Palap\_EheI\_for* und *Palap-EcoRV\_rev* amplifiziert. Der Verdau erfolgte jedoch mit *EheI* und *BglII*, da der Vektor p*Palap*-rev aufgrund einer Punktmutation in der *EcoRV*-Schnittstelle am 3'-Ende des Terminatorbereichs nicht mit *EcoRV* geöffnet werden kann (vgl. 4.2.1). Stattdessen wurde die natürlich in der Terminatorregion enthaltene *BglII*-Schnittstelle verwendet. In einem ersten Klonierungsdurchgang wurden die mit *MunI* und *PvuII* bzw. *EheI* und *BglII* verdauten Fragmente mit dem mit *MunI* und *BglII* geöffneten Vektor p*Palap*-rev ligiert (Abb. 31A) und in elektrokompetente *E. coli* XL1 Blue-Zellen transformiert. Mit einer Schnellisolationmethode („*cracking*“-Methode) wurden daraufhin 90 Ampicillin-resistente Kolonien überprüft (Daten nicht gezeigt). Aus Klonen, bei denen die Plasmidgröße von der des Ursprungsvektors abwich, wurde durch „Mini“-Plasmidpräparation (STET-Plasmidpräparation) Plasmid-DNA isoliert und durch einen Testverdau mit *PstI* untersucht (Daten nicht gezeigt). Bei einer Kolonie zeigten die Fragmente die erwarteten Größen, sodass aus dieser durch „Mini“-Plasmidpräparation (Qiagen) Plasmid-DNA isoliert und zur Kontrolle mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut wurde (Abb. 31C und E). Dabei und bei der Sequenzierung des offenen Leserahmens durch SRD (SRD GmbH, Bad Homburg) zeigte sich, dass zwischen den für Glutamin und Alanin kodierenden Basentriplets ein zusätzliches, für Glycin kodierendes Triplet eingefügt worden war. *PvuII* und *EheI* erzeugen jeweils glatte Enden, sodass die beiden Schnittstellen nach der Ligation nicht mehr vorhanden sind. Das Plasmid p*Palap*-E540QG enthält jedoch durch das zusätzliche Basentriplet eine zweite *EheI*-Schnittstelle, wodurch die Aminosäuresequenz des Metall-bindenden Motivs statt zu HQAGH zu HQGAGH verändert wurde.

Daher wurde das Plasmid p*Palap*-E540QG in einem weiteren Klonierungsdurchgang mit *EheI* und *MunI* geöffnet und mit dem mit *MunI* und *PvuII* verdauten Fragment des offenen Leserahmens von *Palap* ligiert (Abb. 31B). Nach der Transformation in elektrokompetente *E. coli* XL1 Blue wurde die Plasmid-DNA aus Ampicillin-resistenten Klonen durch „Mini“-Plasmidpräparation (STET-Plasmidpräparation) isoliert und durch einen Testverdau mit *EheI* analysiert (Daten nicht gezeigt). Nach erfolgreicher Ligation sollte nur noch ein Fragment statt zwei detektierbar sein. Durch „Mini“-Plasmidpräparation (Qiagen) wurde DNA aus einem positiven Klon isoliert und das Plasmid p*Palap*-E540Q mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut (Abb. 31D und F). Da sowohl die Fragmentgrößen als auch die Sequenzierung durch SRD (SRD GmbH, Bad Homburg) den Erwartungen entsprachen, wurden die Plasmide p*Palap*-E540Q und p*Palap*-E540QG in Protoplasten des *Palap*-Deletionsstamms F114341 transformiert.



aufgetrennt. In **(D)** wurden je 100 ng des zur Ligation verwendeten Fragments des Plasmids pPalap-E540QG (pPalap-E540Q *MunI/EheI*: 7.282 Bp) und des 5'-seitigen *Palap*-Fragments (*Palap MunI/PvuII*: 1.045 Bp) aufgetragen. Als Größenstandard wurden je 5 µl der Marker  $\lambda$ HindIII und 100 bp + eingesetzt. **(E)** und **(F)** Tabelle der zu erwartenden Fragmentgrößen der Restriktionsanalyse.

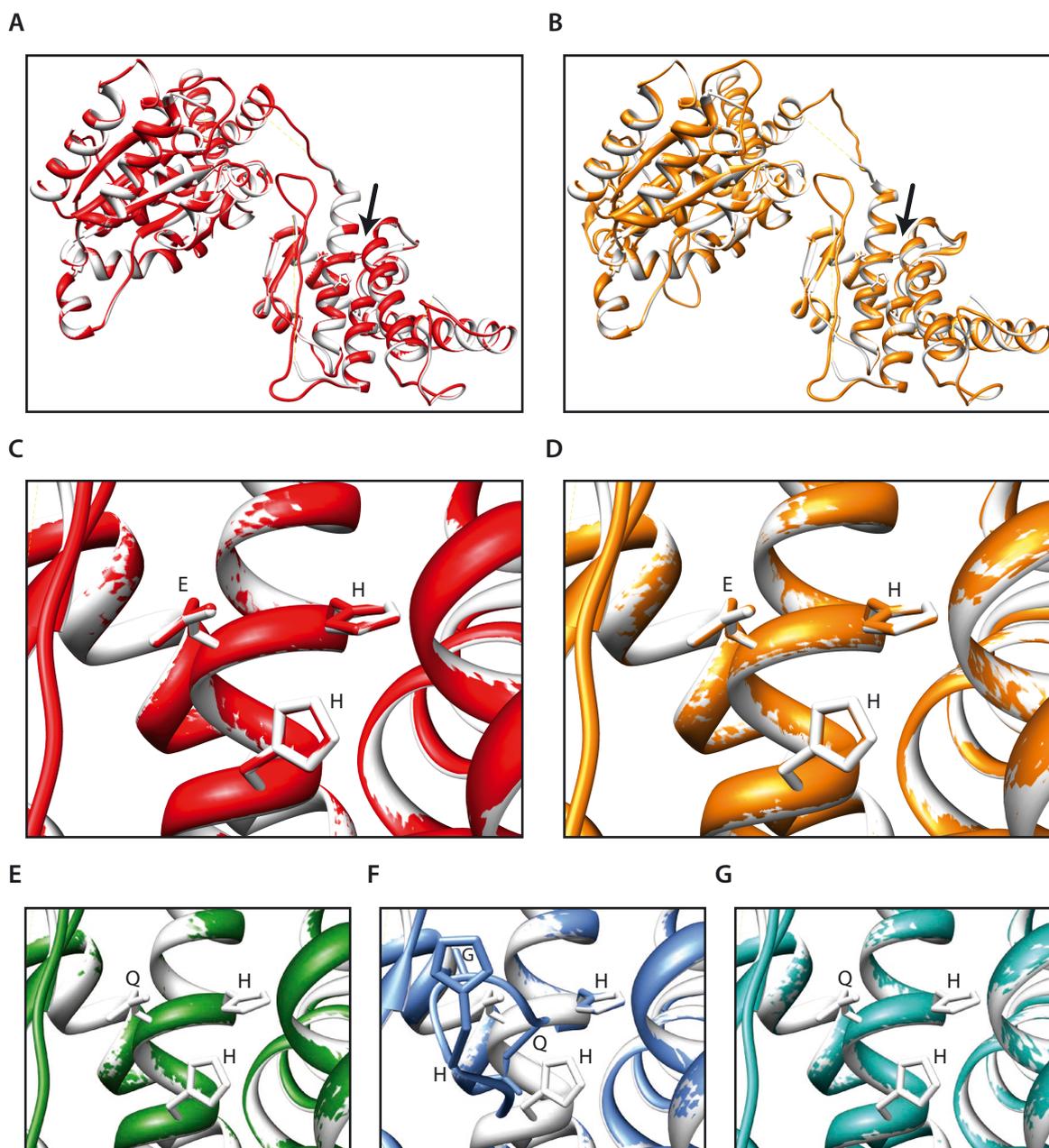
---

### 4.3.3 Einfluss der Mutationen auf die Struktur von PalAP

Um die Auswirkungen der Mutationen des Metallbindemotivs auf die Struktur der i-AAA Protease-Untereinheit PalAP und die möglichen Folgen der Einführung einer zusätzlichen Aminosäure zu analysieren, wurden *in-silico*-Modelle der Proteinstrukturen von PalAP und YME1 angefertigt. Diese wurden mit der Kristallstruktur des löslichen Teils des Homologs FtsH aus *Thermotoga maritima* (Bieniossek et al. 2006) verglichen (Abb. 32).

Zum Vergleich der Strukturen wurden Aminosäuresequenzvergleiche von PalAP, YME1 und FtsH aus *T. maritima* durchgeführt und diese mit SWISS-MODEL prozessiert (Arnold et al. 2006b). Die Kristallstruktur des löslichen Teils von FtsH aus *T. maritima* dient dabei als Referenz (Bieniossek et al. 2006). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen FtsH (weiß) und PalAP (rot) bzw. zwischen FtsH und YME1 (orange; jeweils 62 %) weisen auch die molekularen Modelle große Ähnlichkeit auf (Abb. 32A und B). In Bereichen, in denen die Modellstrukturen von PalAP bzw. YME1 mit der Kristallstruktur von FtsH übereinstimmen, ist die Sekundärstruktur in rot-weiß bzw. orange-weiß dargestellt, während Aminosäuresequenzbereiche mit vermutlich abweichender Sekundärstruktur einfarbig erscheinen. Die Vergrößerung des Bereichs um das proteolytische Zentrum zeigt, dass sich dieses sowohl bei PalAP als auch bei YME1 wie bei FtsH in einer Helix befindet (Abb. 32C und D). Die Punktmutation von Glutaminsäure zu Glutamin hat vermutlich weder bei PalAP (grün) noch bei YME1 (türkis) eine Auswirkung auf die Konformation des Proteins (Abb. 32E und G). Dagegen ist es nicht ausgeschlossen, dass die Einführung von Glycin in das Metall-bindende Motiv von PalAP (blau) die Struktur der Helix verändert (Abb. 32F). Im Modell weicht die Form der Helix deutlich von der der Kristallstruktur von FtsH ab, was sich möglicherweise auf die Gesamtstruktur der Untereinheit auswirken könnte.

Während die Mutation von Glutaminsäure zu Glutamin keinen Einfluss auf die Konformation von PalAP und YME1 hat, ist es möglich, dass die Einführung der zusätzlichen Aminosäure Glycin die Struktur der Helix verändert. Dies könnte sich möglicherweise auf die Konformation der Untereinheiten der i-AAA Protease PalAP auswirken, wodurch wiederum die Funktion des Komplexes beeinträchtigt sein könnte.



**Abb. 32: Modell der Proteinstrukturen von PalAP und YME1 verglichen mit deren Homolog FtsH aus *Thermotoga maritima*.** Um den Effekt der Mutation des Metallbindemotivs HExxH auf die Struktur der Proteine zu analysieren, wurden Homologiemodelle der Proteine PalAP, YME1 und FtsH aus dem Bakterium *T. maritima* angefertigt. Die Kristallstruktur des löslichen Teils von FtsH diente dabei als Vorlage (Bieniossek et al. 2006; weiß in A-G), um die Proteinstrukturen in der Cartoon-Darstellung abzubilden. In (A) und (B) ist jeweils eine vollständige Untereinheit der i-AAA Protease PalAP (rot) bzw. YME1 (orange) dargestellt, während in (C) und (D) nur das proteolytische Zentrum mit den Aminosäuren im Einbuchstabencode sichtbar ist. In dem Modell hat ein Austausch von Glutaminsäure (E) zu Glutamin (Q) keine Auswirkung auf die Struktur der Helix von PalAP (grün in E) und YME1 (türkis in G). Dagegen löst die Einführung der zusätzlichen Aminosäure Glycin (G) bei PalAP (blau in F) in dem Modell eine Veränderung in der Struktur der Helix aus, die sich möglicherweise auf die Gesamtstruktur des Proteins auswirken könnte. Die Sequenzvergleiche wurden mit SWISS-MODEL prozessiert und mit USCF Chimera visualisiert (modifiziert nach Weil et al. 2011).

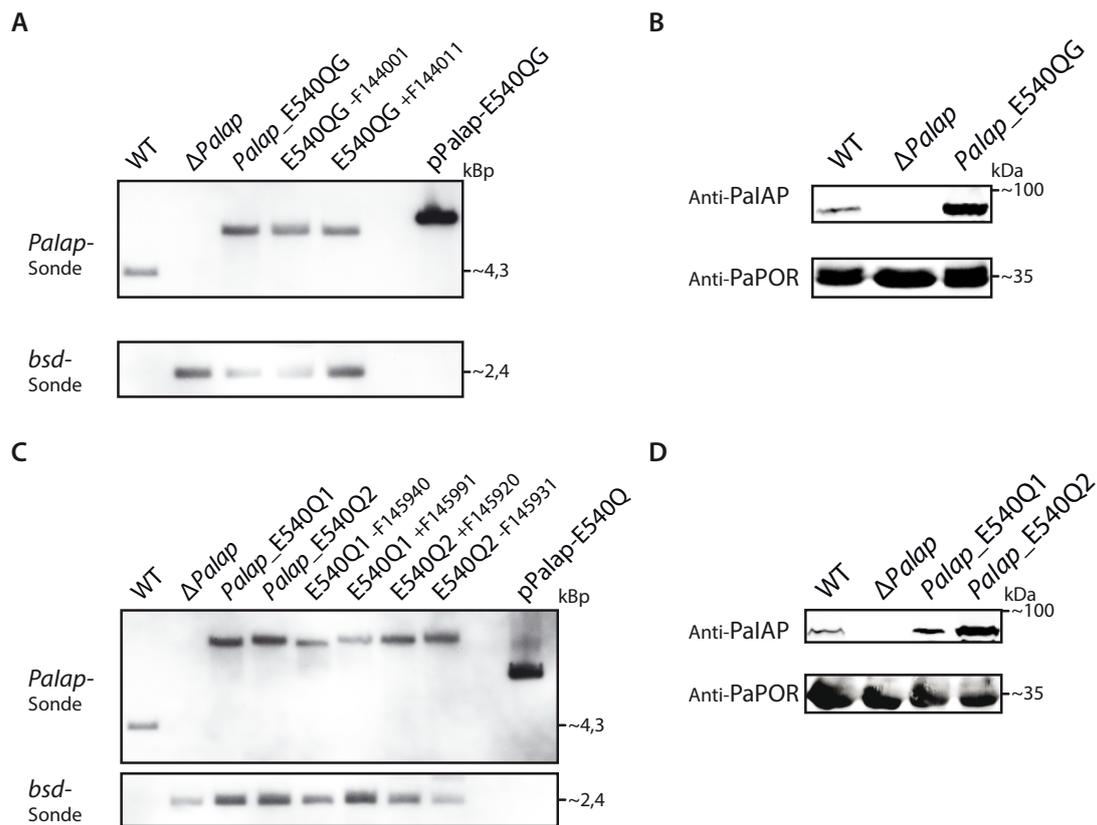
#### 4.3.4 Herstellung von Stämmen mit proteolytisch inaktiver i-AAA Protease

Nach der Transformation der Plasmide pPalap-E540QG und pPalap-E540Q zeigten jeweils mehrere Primärtransformanten sowohl Hygromycin- als auch Phleomycin-Resistenz. Aus diesen Transformanten wurde DNA isoliert und durch Southern Blot-Analysen mit einer *Palap*-spezifischen Sonde untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei wurde eine Primärtransformante identifiziert, die eine Einzelintegration des Gens *Palap*<sup>E540QG</sup> trägt, und zwei Primärtransformanten, die eine Einzelintegration des Gens *Palap*<sup>E540Q</sup> aufweisen. Von diesen Primärtransformanten und von deren Nachkommen wurde DNA mit *Bgl*III verdaut und durch Southern Blot-Analysen untersucht (Abb. 33A und C). Die mit einer *Palap*-spezifischen Sonde detektierten ektopisch integrierten Fragmente, die die mutierten Formen von *Palap* enthalten, sind jeweils deutlich größer als das im Wildstamm detektierbare Fragment, welches im *Palap*-Deletionsstamm fehlt. Zur Kontrolle von Tandemintegrationen wurde zusätzlich das zur Transformation verwendete Plasmid aufgetragen (pPalap-E540QG bzw. pPalap-E540Q). Der Austausch des Wildtypgens in den mutagenen Stämmen *Palap*\_E540QG und *Palap*\_E540Q durch die Phleomycin-Resistenzkassette wurde durch eine mit der Resistenzkassette hybridisierende Sonde (*bsd*-Sonde) bestätigt.

Zur Verifizierung der Expression von *Palap*<sup>E540QG</sup> in der Transformante *Palap*\_E540QG bzw. *Palap*<sup>E540Q</sup> in den Primärtransformanten *Palap*\_E540Q1 und *Palap*\_E540Q2 wurden mitochondriale Proteine durch Western Blot-Analysen mit einem PalAP-spezifischen Antikörper untersucht (Abb. 33B und D). Wie in den Proteinextrakten des Wildstamms, kann PalAP sowohl in Mitochondrien des Stamms *Palap*\_E540QG als auch in denen der Stämme *Palap*\_E540Q1 und *Palap*\_E540Q2 detektiert werden, während im  $\Delta$ *Palap*-Stamm kein Signal sichtbar wird.

Die Signale von PalAP scheinen in den transgenen Stämmen stärker zu sein als im Wildstamm. Auch in *S. cerevisiae* konnte beobachtet werden, dass die Expression der proteolytisch inaktiven Form von *Yme1* unter der Kontrolle des endogenen Promotors höher war als die des Wildstammgens und *Yme1* scheinbar die eigene Expression reguliert (Claypool et al. 2011).

Die Transformante *Palap*\_E540QG, die beiden unabhängigen Primärtransformanten *Palap*\_E540Q1 und *Palap*\_E540Q2, und auch deren Nachkommen weisen jeweils eine Einzelintegration der Gene *Palap*<sup>E540QG</sup> bzw. *Palap*<sup>E540Q</sup> auf, die in den Stämmen exprimiert werden können. Der Nachweis der Proteine in mitochondrialen Proteinextrakten lässt darauf schließen, dass die proteolytisch inaktiven Formen von PalAP in die Mitochondrien importiert werden können und sich dort zu Komplexen zusammenlagern können. Dies ist vor allem im Hinblick auf die möglicherweise veränderte Konformation der PalAP<sup>E540QG</sup>-Untereinheiten wichtig, da die unbeabsichtigte Einführung von Glycin die Komplexbildung nicht zu beeinflussen scheint.

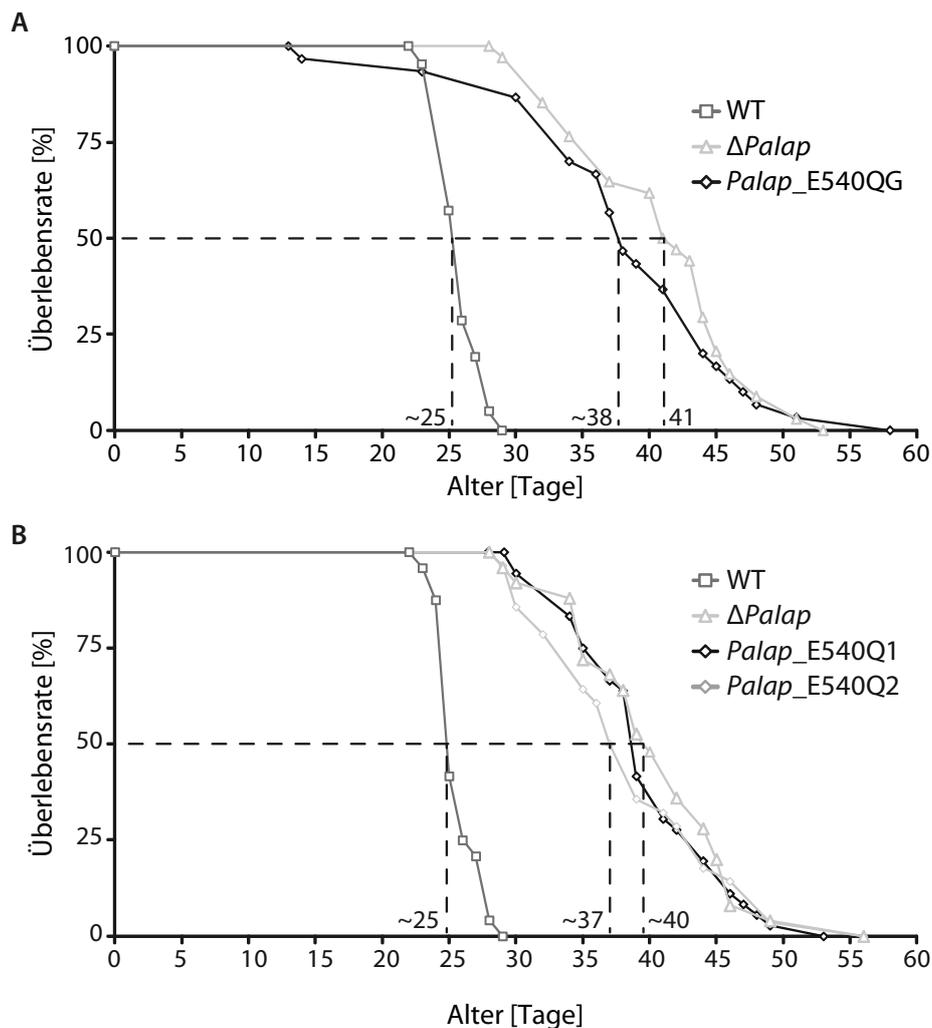


**Abb. 33: Überprüfung der Integration und Expression der proteolytisch inaktiven i-AAA Protease PalAP.** Southern Blot-Analysen zum Nachweis der Integration von *Palap*<sup>E540QG</sup> (A) bzw. *Palap*<sup>E540Q</sup> (C) ins Genom des *Palap*-Deletionsstamms F114341. Je 750 ng DNA des Wildstamms (WT), des  $\Delta$ *Palap*-Stamms F114341, der Primärtransformanten *Palap*<sub>E540QG</sub> (E540QG) (A) bzw. *Palap*<sub>E540Q1</sub> (E540Q1) und *Palap*<sub>E540Q2</sub> (E540Q2) (C), und von jeweils zwei Sekundärtransformanten wurde mit *Bgl*III verdaut und auf 1 %igen TAE-Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente auf Nylonmembranen übertragen und *Palap* mit einer DIG-markierten, *Palap*-spezifischen Sonde detektiert. Nach deren Entfernung folgte die Hybridisierung mit einer *bsd*-spezifischen Sonde zum Nachweis der Resistenzkassette. Die endogene Kopie von *Palap* fehlt sowohl bei  $\Delta$ *Palap* als auch im Genom der Mutanten *Palap*<sub>E540QG</sub>, *Palap*<sub>E540Q1</sub> und *Palap*<sub>E540Q2</sub>, die jedoch jeweils eine Einzelintegration der proteolytisch inaktiven Form von *Palap* tragen. Zusätzlich wurden jeweils 5 ng der mit *Bgl*III verdauten Plasmide p*Palap*-E540QG (A) bzw. p*Palap*-E540Q (C) aufgetragen. (B) und (D) Western Blot-Analysen zum Nachweis der Expression von *Palap* und des Imports der mutierten Formen von PalAP in die Mitochondrien. Je 100  $\mu$ g mitochondriale Proteine des Wildstamms (WT), eines  $\Delta$ *Palap*-Isolats, sowie der Primärtransformanten *Palap*<sub>E540QG</sub> (B) bzw. *Palap*<sub>E540Q1</sub> und *Palap*<sub>E540Q2</sub> (D) wurden durch 12 %ige SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranen übertragen. PalAP wurde durch einen PalAP-spezifischen Antikörper sowohl im Wildstamm als auch in *Palap*<sub>E540QG</sub>, *Palap*<sub>E540Q1</sub> und *Palap*<sub>E540Q2</sub> detektiert. Porin (PaPOR) dient als Ladekontrolle (modifiziert nach Weil et al. 2011).

#### 4.3.5 Charakterisierung von *Palap*<sub>E540QG</sub> und *Palap*<sub>E540Q</sub>

Der komplette Verlust von PalAP führt unter Standardbedingungen zur Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina* (vgl. 4.1.4). Um herauszufinden, ob dies durch den Verlust der proteolytischen Aktivität hervorgerufen wird, wurden die Lebensspannen der Stämme *Palap*<sub>E540QG</sub>, *Palap*<sub>E540Q1</sub> und *Palap*<sub>E540Q2</sub> analysiert (Abb. 34). Dazu wurden frisch isolierte, monokaryotische Nachkommen der

Stämme auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C bis zum Einstellen des Wachstums inkubiert. Sowohl beim Stamm *Palap\_E540QG* (Abb. 34A) als auch bei den Stämmen *Palap\_E540Q1* und *Palap\_E540Q2* (Abb. 34B) ähnelt die mediane Lebensspanne der  $\Delta$ *Palap*-Isolate. Dabei sind die medianen Lebensspannen der *Palap\_E540QG*-Isolate mit 37,6 Tagen bzw. der *Palap\_E540Q1*- (38,6 Tage) und *Palap\_E540Q2*-Isolate (37,2 Tage) um jeweils ~ 50 % verlängert verglichen mit den Wildstammisolate (25,3 bzw. 24,8 Tage). Die medianen Lebensspannen der  $\Delta$ *Palap*-Stämme sind jeweils um ~60% verlängert.



**Abb. 34: Analyse der Abhängigkeit der Lebensspanne von der proteolytischen Aktivität von PalAP.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wildstamms, des *Palap*-Deletionsstamms und der proteolytisch inaktiven Formen von *Palap* exprimierenden Stämme *Palap\_E540QG*, *Palap\_E540Q1* und *Palap\_E540Q2* wurden auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und im Dauerlicht bei 27°C bis zum Einstellen des Wachstums inkubiert. Die Überlebensrate ist in Prozent angegeben, die Lebensspanne in Tagen. **(A)** Die mediane Lebensspanne von *Palap\_E540QG* ( $n = 30$ ;  $p < 0,001$ ) ist mit 37,6 Tagen ähnlich verlängert wie die des *Palap*-Deletionsstamms ( $n = 34$ ) mit 41 Tagen ( $p < 0,001$ ), verglichen mit der des Wildstamms ( $n = 21$ ), die 25,3 Tage beträgt. **(B)** Die mediane Lebensspanne des Wildstamms ( $n = 24$ ) beträgt 24,8 Tage, während die von *Palap\_E540Q1* ( $n = 36$ ;  $p < 0,001$ ) mit 38,6 Tagen und *Palap\_E540Q2* ( $n = 28$ ;  $p < 0,001$ ) mit 37,2 Tagen denen des *Palap*-Deletionsstamms ( $n = 25$ ;  $p < 0,001$ ) mit 39,5 Tagen ähneln und deutlich verlängert sind (modifiziert nach Weil et al. 2011).

Die maximale Lebensspanne der *Palap\_E540QG*-Isolate (58 Tage) ist dagegen im Vergleich zu den Wildstammisolaten (29 Tage) verdoppelt, während die der *Palap\_E540Q1*- (53 Tage) und *Palap\_E540Q2*-Stämme (56 Tage) wie die der  $\Delta$ *Palap*-Isolate (53 bzw. 56 Tage) um 82 % bzw. 93 % verlängert ist. Insgesamt sind die Lebensspannen der Stämme, die eine proteolytisch inaktive Form von *Palap* exprimieren, vergleichbar mit denen der *Palap*-Deletionsstämme. Demzufolge löst die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP und nicht der Verlust der Chaperon-artigen Aktivität den Effekt auf die Lebensspanne von *P. anserina* aus.

Da sich die Wachstumsraten der  $\Delta$ *Palap*-Isolate nicht von denen der Wildtypisolate unterscheiden, sollte, wie auch bei der Reversion der Deletion von *Palap*, die Expression der proteolytisch inaktiven Formen von *Palap* keine Auswirkung auf die Wachstumsrate haben. Diese wurden im Rahmen der Lebensspannen-Experimente bestimmt. Dabei zeigt sich, dass die Wachstumsrate der *Palap\_E540QG*-Isolate verglichen mit den Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten geringfügig erhöht ist (Anhang Abb. 50B). Auch die Wachstumsraten der *Palap\_E540Q1*- und *Palap\_E540Q2*-Isolate sind leicht erhöht verglichen mit den parallel dazu untersuchten Wildstammisolaten (Anhang Abb. 50C). Jedoch ist der Anstieg der Wachstumsraten sowohl bei den *Palap\_E540QG*- als auch bei den *Palap\_E540Q1*- und *Palap\_E540Q2*-Isolaten sehr gering und beträgt jeweils nur ~ 3 %.

#### Fazit

Die Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PalAP führt bei 27°C zu einer ähnlich verlängerten Lebensspanne von *P. anserina* wie die Deletion von *Palap*. Folglich scheint die Lebensspanne beim Wildstamm durch die proteolytische Funktion der i-AAA Protease begrenzt zu werden.

#### 4.4 Auswirkung der Deletion von *Palap* und *PaClpP*

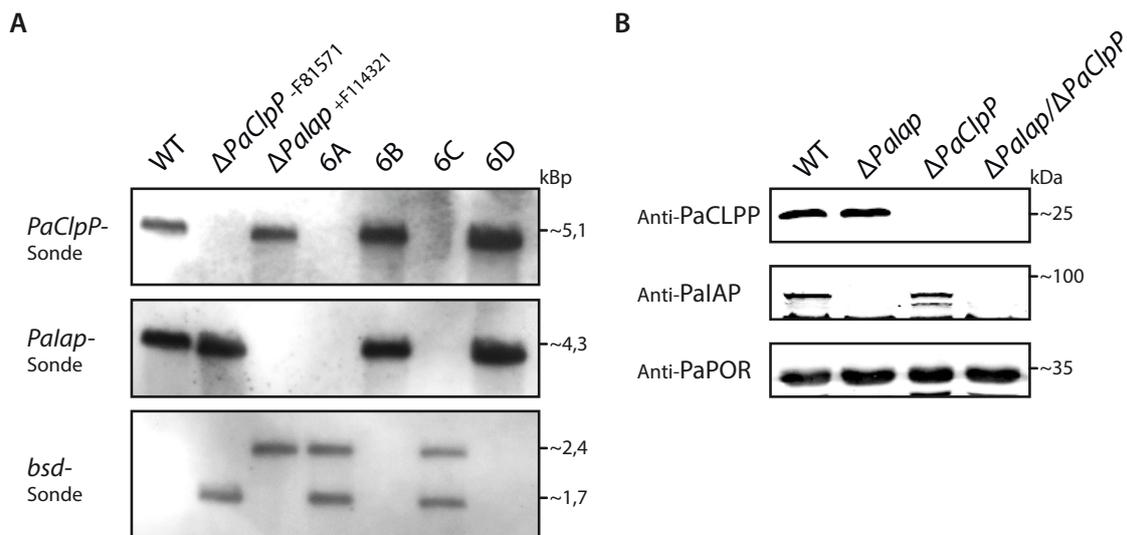
Neben den beiden membrangebundenen Proteasen (i-AAA und m-AAA Protease) stellen die in der Matrix lokalisierten Proteasen LON und CLPXP zwei weitere wichtige Proteasen des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems dar (Tatsuta & Langer 2008). Da die Deletion der Proteaseuntereinheit *PaClpP* bei *P. anserina* teilweise ähnliche Phänotypen hervorruft wie die Deletion von *Palap* (Fischer 2011), wäre es möglich, dass die beiden Proteasen an denselben Reaktionswegen beteiligt sind.

Um dies zu überprüfen wurde durch Kreuzung eine Mutante hergestellt, in der sowohl *Palap* als auch *PaClpP* deletiert ist. Wenn beide Proteasen im selben Reaktionsweg benötigt werden, sollte die Lebensspanne der Doppeldeletionsmutante mit der der Einzelmutanten vergleichbar sein. Wirken die

beiden Proteasen jedoch in unterschiedlichen Stoffwechselwegen, so sollte sich der Effekt auf die Lebensspanne durch die Doppeldeletion verändern.

#### 4.4.1 Herstellung der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante

Die Doppeldeletionsmutante  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$  wurde durch Kreuzung der Einzeldelentionsstämme  $\Delta Palap^+F114321$  und  $\Delta PaClpP^-F81571$  hergestellt. Aus dieser Kreuzung wurden komplette Asci (d.h. Asci mit vier dikaryotischen Sporen) isoliert. Daraufhin wurde die Phleomycin-Resistenz der Sporen überprüft, da beide Gene durch homologe Rekombination durch Phleomycin-Resistenzkassetten ersetzt wurden. Asci, in denen zwei Sporen resistent und zwei sensitiv sind, enthalten somit zwei durch Postreduktion entstandene Sporen, die die Doppeldeletion aufweisen, und zwei Wildtyp-Sporen. Unter  $\sim 50$  Asci zeigten die Sporen eines Ascus die gewünschte Verteilung der Resistenzen. Zur Verifizierung der Deletion von *Palap* und *PaClpP* wurde aus den Myzelien der vier dikaryotischen Stämme DNA isoliert, mit *Bgl*III verdaut und durch Southern Blot-Analysen untersucht (Abb. 35A).



**Abb. 35: Verifizierung der Deletion von *Palap* und *PaClpP* bei *P. anserina*.** (A) Southern Blot-Analyse. Je 750 ng DNA des Wild-, *PaClpP*- und *Palap*-Deletionsstamms, sowie der vier dikaryotischen Sporen des Ascus 6 aus der Kreuzung von  $\Delta PaClpP^-F81571$  und  $\Delta Palap^+F114321$ , von denen zwei Phleomycin-resistent und zwei -sensitiv waren, wurde mit *Bgl*III verdaut und auf einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran wurde diese nacheinander mit einer *PaClpP*-, einer *Palap*- und einer *bsd*-spezifischen, DIG-markierten Sonde inkubiert. Nach der Detektion wurde die jeweilige Sonde entfernt. Von den vier dikaryotischen Sporen kann bei 6A und 6C weder *PaClpP* noch *Palap* detektiert werden, während beide Gene bei 6B und 6D vorhanden sind. Stattdessen können bei 6A und 6C die Resistenzkassetten (*bsd*) visualisiert werden. (B) Western Blot-Analyse. Je 100  $\mu$ g mitochondriale Proteine aus 14 Tage alten Wild-,  $\Delta Palap$ -,  $\Delta PaClpP$ - und  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Kulturen ( $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ ), die zunächst auf M2-Fest- und anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C und Dauerlicht angezogen wurden, wurden mit einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden PaCLPP und PaIAP mit einem PaCLPP- bzw. PaIAP-spezifischen Antikörper detektiert. Keins der beiden Proteine kann in der Doppelmutante nachgewiesen werden. Porin (PaPOR) dient als Ladekontrolle.

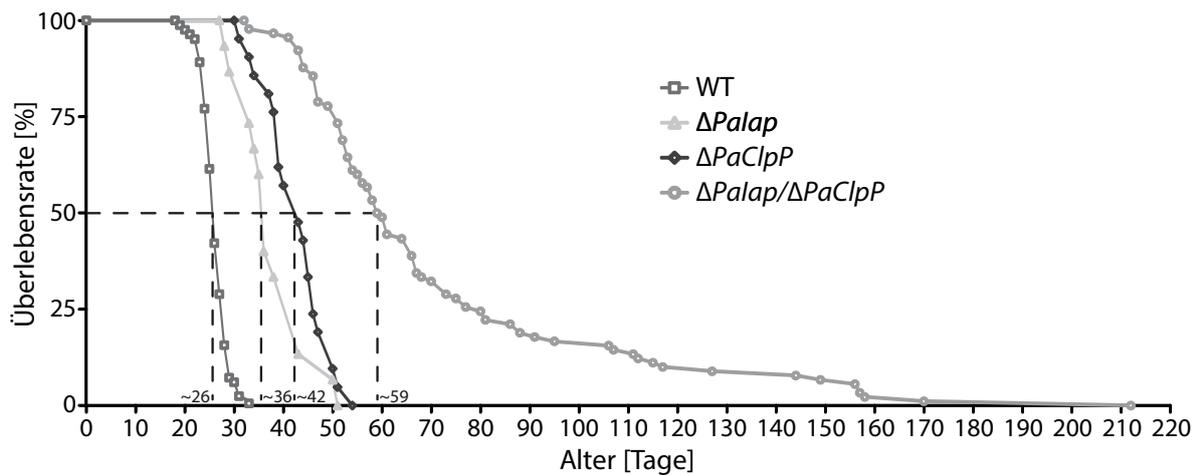
Als Kontrolle wurde DNA der zur Kreuzung verwendeten Stämme  $\Delta Palap^+F114321$  und  $\Delta PaClpP^+F81571$ , sowie DNA des Wildstamms aufgetragen. Während das Signal des *PaClpP*-Fragments bei  $\sim 5,1$  kBp im Wildstamm, im  $\Delta Palap$ -Stamm und in den beiden dikaryotischen Sporen 6B und 6D detektiert werden kann, fehlt dieses im  $\Delta PaClpP$ -Stamm und in den Sporen 6A und 6C. Ebenso kann das *Palap*-Fragment ( $\sim 4,3$  kBp) nur im Wildstamm, im  $\Delta PaClpP$ -Stamm und in den Sporen 6B und 6D detektiert werden, nicht aber im  $\Delta Palap$ -Stamm und in den Sporen 6A und 6C. Wie erwartet können die Resistenzkassetten mit der *bsd*-spezifischen Sonde nur in den Einzeldelentionsstämmen  $\Delta PaClpP$  und  $\Delta Palap$  sowie in den beiden Phleomycin-resistenten Sporen 6A und 6C nachgewiesen werden ( $\sim 2,4$  kBp und  $\sim 1,7$  kBp).

Daraufhin wurden aus monokaryotischen Nachkommen der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Mutanten mitochondriale Proteine isoliert und zusammen mit mitochondrialen Proteinextrakten von Wild-,  $\Delta PaClpP$ - und  $\Delta Palap$ -Stämmen durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 35B). Wie erwartet kann die Serinprotease PaCLPP nur in Extrakten des Wildstamms und des  $\Delta Palap$ -Isolats nachgewiesen werden, während in den Proteinextrakten des  $\Delta PaClpP$ - und des  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolats kein Signal vorhanden ist. Dementsprechend kann die i-AAA Protease PalAP nur im Wild- und  $\Delta PaClpP$ -Stamm nachgewiesen werden, wogegen der  $\Delta Palap$ - und der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stamm keine Bande aufweisen.

#### 4.4.2 Charakterisierung der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante

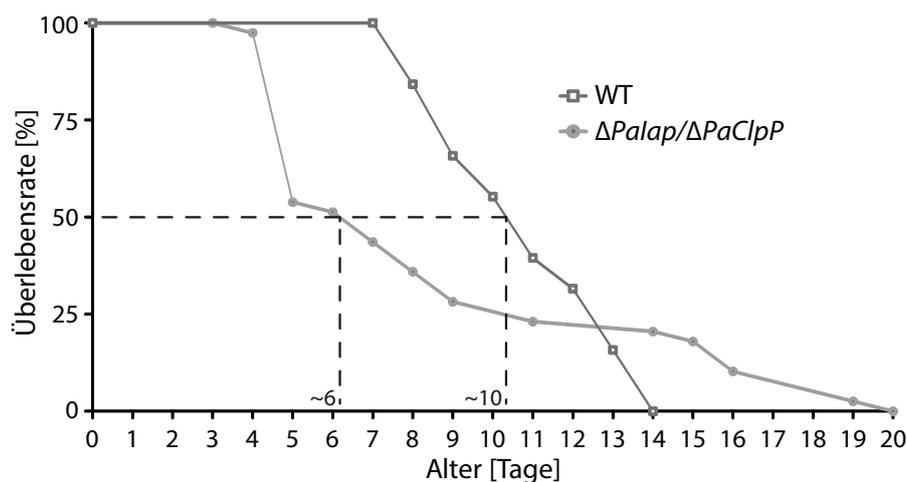
Die Deletion von *Palap* bzw. *PaClpP* führt unter Standardbedingungen zu einer verlängerten Lebensspanne von *P. anserina*. Zur Analyse des Einflusses der Deletion von *Palap* und *PaClpP* auf die Lebensspanne wurden monokaryotische Kulturen des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C inkubiert. Das Experiment wurde vier Mal mit unabhängigen Nachkommen durchgeführt. In Abb. 36 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt. Wie erwartet, sind die medianen Lebensspannen der  $\Delta PaClpP$ - (42,2 Tagen) und  $\Delta Palap$ -Isolate (35,5 Tage) um  $\sim 65$  % bzw.  $\sim 40$  % verlängert verglichen mit den Wildstammisolaten (25,6 Tage). Dagegen ist die der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate (59 Tage) mit  $\sim 130$  % mehr als verdoppelt verglichen mit dem Wildstamm. Dies spiegelt sich auch in der maximalen Lebensspanne. Während die der  $\Delta PaClpP$ - (54 Tage) und  $\Delta Palap$ -Isolate (51 Tage) etwa 1,6x länger ist als beim Wildstamm (33 Tage), ist die der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate (212 Tage) um das 6,4fache verlängert.

Durch den Verlust von *Palap* und *PaClpP* verlängert sich die Lebensspanne von *P. anserina* noch deutlicher als nach dem Verlust eines der beiden Gene. Die Effekte der Einzeldelentionen auf die Lebensspanne scheinen sich zu addieren, was darauf hindeutet, dass PalAP und PaCLPP an unterschiedlichen Reaktionswegen beteiligt sind.



**Abb. 36: Lebensspannenanalyse des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 27°C.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wildstamms (WT; n = 83), des  $\Delta Palap$ - ( $\Delta Palap$ ; n = 15), des  $\Delta PaClpP$ - ( $\Delta PaClpP$ ; n = 21) und des  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stamms ( $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ ; n = 90) wurden auf Rennrohren mit M2-Festmedium angeimpft und bei 27°C im Dauerlicht inkubiert. Die mediane Lebensspanne des Wildstamms beträgt 25,6 Tage, während die von  $\Delta Palap$  mit 35,5 Tage ( $p < 0,001$ ), die von  $\Delta PaClpP$  mit 42,2 Tage ( $p < 0,001$ ) und die des  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stamms mit 59 Tagen ( $p < 0,001$ ) signifikant verlängert sind.

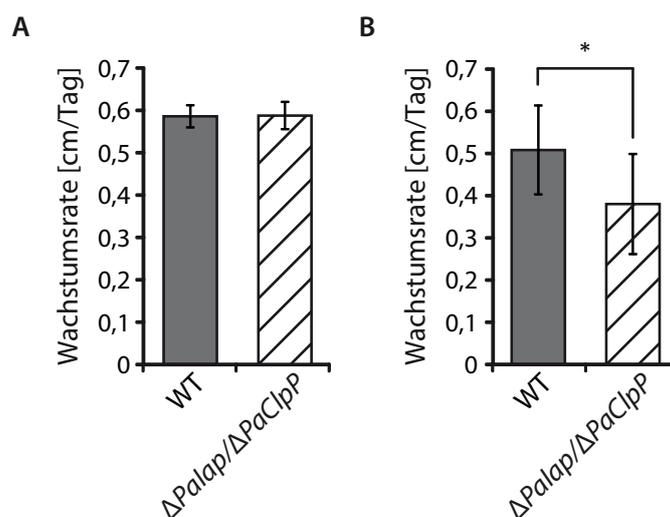
Der  $\Delta Palap$ -Stamm ist bei 37°C deutlich hitzesensitiver als der Wildstamm (vgl. 4.1.5), und auch der  $\Delta PaClpP$ -Stamm ist bei Hitze tendenziell stärker betroffen als der Wildstamm (Fischer 2011). Daher wurde zunächst die Auswirkung von Hitzestress auf die Lebensspanne der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme auf Rennrohren mit M2-Festmedium untersucht (Abb. 37). Dazu wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, wobei die Isolate nach dem Animpfen jeweils zwei Tage bei 27°C und daraufhin bis zum Einstellen des Wachstums bei 37°C inkubiert wurden.



**Abb. 37: Lebensspannenanalyse des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 37°C.** Frisch isolierte, monokaryotische Isolate des Wildstamms (WT; n = 38) und des  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stamms ( $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ ; n = 39) wurden wie in Abb. 15 beschrieben angezogen. Die mediane Lebensspanne des  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stamms ist mit 6,1 Tagen ( $p < 0,001$ ) signifikant reduziert verglichen mit der des Wildstamms (10,3 Tage). Die maximale Lebensspanne (20 Tage) ist dagegen deutlich länger als beim Wildstamm (14 Tage).

Dabei zeigt sich, dass auch die Isolate der Doppeldeletionsmutante  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$  deutlich stärker von Hitzestress betroffen sind als die Wildstammisolate. Die mediane Lebensspanne der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme (6,1 Tage) ist um etwa 40 % reduziert gegenüber der der Wildstämme (10,3 Tage). Verglichen mit den medianen Lebensspannen unter Standardbedingungen entspricht dies beim Wildstamm einer Verringerung um das 2,5fache, während die der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate um das 9,7fache reduziert ist. Dagegen ist die maximale Lebensspanne der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme mit 20 Tagen deutlich länger als die des Wildstamms (14 Tage). Demnach scheinen sich auch bei Hitzestress die Effekte der Einzeldelationen zu addieren, sodass die Hitzesensitivität der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate noch ausgeprägter ist.

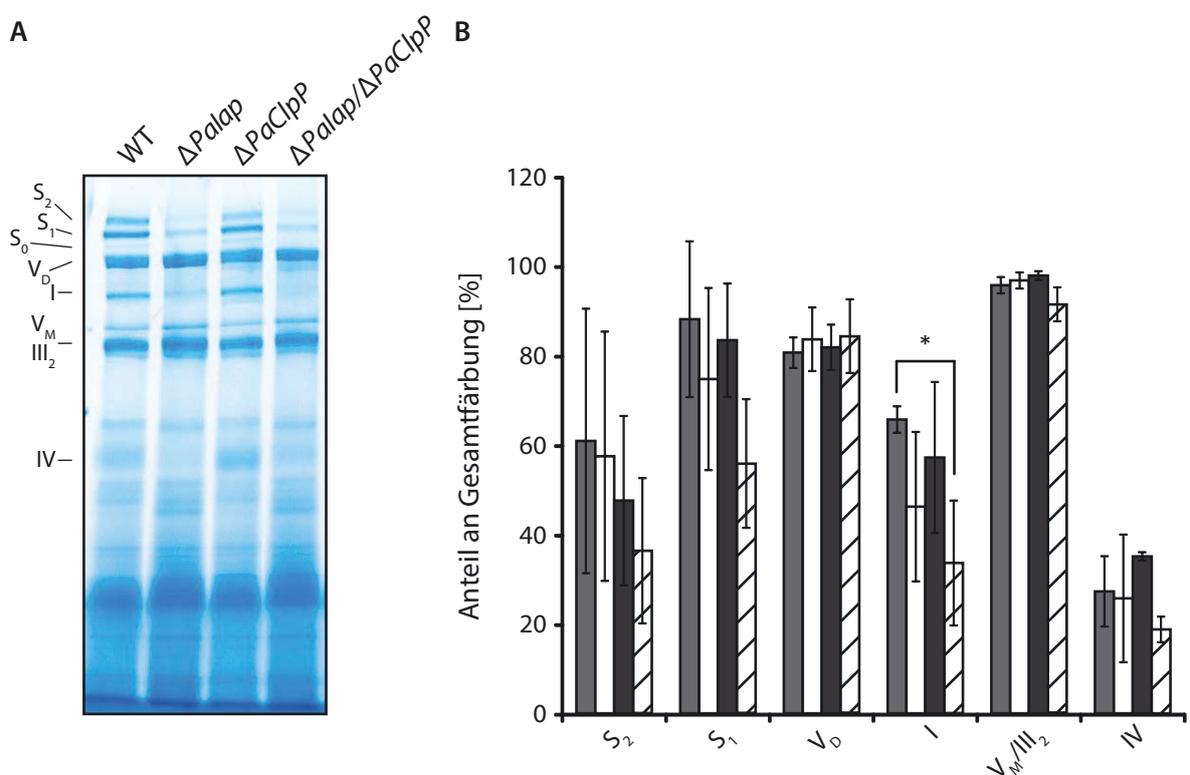
Die Wachstumsraten wurden im Rahmen der Lebensspannen-Experimente der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate bestimmt (Abb. 38). Während sich die Wachstumsraten bei 27°C zwischen Wild- und  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämmen nicht unterscheiden (Abb. 38A), ist die der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate bei Hitzestress um ~ 25 % verringert gegenüber der der Wildstämme (Abb. 38B). Wie auch bei den Lebensspannen-Experimenten addieren sich die Effekte der Einzeldelationen in der Doppeldeletionsmutante, sodass die Wachstumsrate bei Hitzestress weiter vermindert ist.



**Abb. 38: Wachstumsrate des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 27°C und bei 37°C.** Die Anzucht der Stämme erfolgte wie in Abb. 36 und Abb. 37 beschrieben. **(A)** Bei 27°C unterscheiden sich die Wachstumsraten des Wildstamms (WT; 0,59 cm/Tag  $\pm$  0,03; n = 83) und des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms ( $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ ; 0,59 cm/Tag  $\pm$  0,03; n = 90; p > 0,05) nicht. **(B)** Dagegen ist die Wachstumsrate des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms (0,38 cm/Tag  $\pm$  0,12; n = 36; p < 0,001) bei 37°C signifikant reduziert verglichen mit der des Wildstamms (0,51 cm/Tag  $\pm$  0,11; n = 38).

Sowohl der Verlust von *Palap* als auch der von *PaClpP* beeinflussen Komponenten der Atmungskette (vgl. 4.1.9; persönliche Mitteilung K. Luce, AK Osiewacz). Daher wurde die Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Mutante untersucht (Abb. 39 und Anhang Abb. 51). Dazu wurden mitochondriale Proteine aus 14 Tage alten Myzelien isoliert, die zunächst auf M2-Festmedium

und anders als in Abb. 22 anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C angezogen wurden, und wie beschrieben durch BN-PAGE analysiert (Abb. 39A). Die densitometrische Auswertung zeigt, dass die Mitochondrien der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Isolate tendenziell weniger Superkomplex  $S_1$  und  $S_2$  und weniger freien Komplex IV enthalten als die Wildtypisolate, wobei die Unterschiede nicht signifikant sind (Abb. 39B). Die Komplex I-Menge ist dagegen gegenüber den Wildstammisolaten signifikant reduziert (um ~ 50 %). Die Mengen des Dimers von Komplex V und dessen Monomer, das unter den gewählten Bedingungen nicht vom Dimer von Komplex III getrennt wird (vgl. 4.1.9), sind wiederum unverändert in den Mitochondrien der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme.



**Abb. 39: BN-PAGE mit mitochondrialen Proteinextrakten der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante.** Zur Überprüfung der Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe wurden mitochondriale Proteine aus 14 Tage alten Wild- (n = 3),  $\Delta Palap$ - (n = 3),  $\Delta PaClpP$ - (n = 2) und  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Kulturen (n = 3), die zunächst auf M2-Fest- und anschließend in CM-Flüssigmedium bei 27°C und Dauerlicht angezogen wurden, isoliert. Die membrangebundenen Proteine wurden aus je 100  $\mu$ g Proteinextrakt mit Digitonin (3 g/g Protein) solubilisiert und durch BN-PAGE mit einem Gradientengel (3,5 - 13 %) aufgetrennt (A). Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie Blue gefärbt. (B) Die densitometrische Auswertung der BN-PAGE erfolgte mit dem Programm „Quantity One®“ (Bio-Rad). Zur Normierung wurde die Gesamtfärbung der jeweiligen Bahn verwendet. Dabei gibt es keinen Unterschied in den Mengen von Superkomplex  $S_1$  und  $S_2$ , sowie bei dem Dimer von Komplex V ( $V_d$ ) und dessen Monomer zusammen mit dem Dimer von Komplex III ( $V_m/III_2$ ) zwischen Wildstamm (grau),  $\Delta Palap$  (weiß) und  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$  (weiß-gestreift;  $p > 0,05$ ). Allerdings ist die Proteinmenge von Komplex I signifikant reduziert bei  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$  verglichen mit dem Wildstamm ( $p < 0,05$ ). Wegen der geringen Stichprobenzahl wurde  $\Delta PaClpP$  (schwarz) bei der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt.

Bei den  $\Delta Palap$ -Isolaten unterscheiden sich die Mengen der Atmungskettenkomplexe anders als in Abb. 22 nicht von denen der Wildstämme, was die Bedeutung des Anzuchtmediums verdeutlicht. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl der  $\Delta PaClpP$ -Isolate ( $n = 2$ ) wurden diese nicht in die statistische Auswertung einbezogen.

Obwohl durch den Verlust von *Palap* und *PaClpP* teilweise reduzierte Mengen einzelner Atmungskettenkomplexe erkennbar sind, ist verglichen mit dem Wildstamm nur die Menge an Komplex I signifikant vermindert. Da das Anzuchtmedium eine wichtige Rolle zu spielen scheint, sollten die  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme für weitere Analysen ähnlich wie der *Palap*-Deletionsstamm durchgängig auf M2-Festmedium angezogen werden.

### Fazit

Die Deletion von *Palap* und *PaClpP* führt bei *P. anserina* unter Standardbedingungen zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne, was darauf hindeutet, dass *P. anserina* unter optimalen Anzuchtbedingungen weder eine funktionsfähige PaCLPXP-Protease noch die i-AAA Protease PalAP benötigt. Der gleichzeitige Verlust von zwei Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beeinträchtigt den Organismus scheinbar nicht. Bei Hitzestress zeigt sich jedoch, dass die  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme hitzesensitiver sind als der Wildstamm. Vor allem für die i-AAA Protease konnte gezeigt werden, dass diese bei Hitzestress wichtige Funktionen hat, sodass der hitzesensitive Phänotyp der Doppeldeletionsmutante nicht überrascht. Gleichzeitig wird an den beobachteten Phänotypen der  $\Delta Palap/\Delta PaClpP$ -Stämme erkennbar, dass sich die Auswirkungen der Deletionen von *Palap* und *PaClpP* addieren. Dies bedeutet, dass die PaCLPXP-Protease und die i-AAA Protease PalAP an unterschiedlichen Reaktionswegen beteiligt sind.



## 5 Diskussion

Lebende Zellen haben eine Reihe von Schutzmechanismen entwickelt, um bei wechselnden Umweltbedingungen die zelluläre Integrität aufrecht zu erhalten (Tatsuta & Langer 2008). Dazu gehört auch die Erhaltung der mitochondrialen Funktionen, da in den Organellen viele wichtige Stoffwechselforgänge ablaufen. Demnach überrascht es nicht, dass mitochondriale Dysfunktionen eine zentrale Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen sowie beim Altern spielen (Tatsuta & Langer 2008; Baker & Haynes 2011; Fischer et al. 2012). Um die mitochondriale Homöostase aufrecht zu erhalten, verfügen Mitochondrien als semi-autonome Organellen über ein eigenes Proteinqualitätskontrollsystem. Dieses besteht aus Chaperonen und zumeist energieabhängigen Proteasen, die die Funktionalität der für die verschiedenen Stoffwechselforgänge benötigten Proteine in den Organellen wahren. Deren Bedeutung für die Alterung konnte am Beispiel der LON-Protease im Modellorganismus *P. anserina* gezeigt werden. Während die konstitutive Überexpression von *PaLon* die Lebensspanne des Ascomyceten verlängert und zu ‚gesundem Altern‘ führt (Luce & Osiewacz 2009), ist die Deletion des Gens nachteilig für den Organismus, was sich unter anderem in einer verkürzten Lebensspanne zeigt (Adam et al. 2012). Über die Rolle der i-AAA Protease bei der Alterung ist dagegen bisher wenig bekannt. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente und Untersuchungen dienen daher dazu, Einsicht in die biologische Aufgabe der i-AAA Protease bei *P. anserina* speziell bei der Alterung zu erhalten.

### 5.1 Im Genom von *P. anserina* sind Homologe der i-AAA und m-AAA Protease kodiert

Durch *in-silico*-Analysen konnten im Genom von *P. anserina* zwei Gensequenzen identifiziert werden, die für die i-AAA bzw. für die m-AAA Protease kodieren (Osiewacz et al. 2010). Die Aminosäuresequenzen der beiden Proteasen weisen die für AAA-Proteasen typischen, konservierten Domänen auf (Abb. 6). Während PaIAP jedoch nur eine transmembrane Domäne besitzt, weist der N-terminale Bereich von PaMAP zwei hydrophobe Abschnitte auf, wodurch sich die i-AAA und die m-AAA Protease topologisch deutlich voneinander unterscheiden und die beiden Gene eindeutig der jeweiligen Protease zugeordnet werden können. Wie bei *S. cerevisiae* und *N. crassa* scheint die i-AAA Protease PaIAP bei *P. anserina* aus homo-oligomeren PaIAP-Untereinheiten aufgebaut zu sein (Klanner et al. 2001; Arnold & Langer 2002).

Die Einordnung im Stammbaum zeigt deutlich, dass PaIAP innerhalb der Familie der i-AAA Proteasen am nächsten mit den i-AAA Proteasen von *C. globosum* und *N. crassa* verwandt ist und wie erwartet dem Pilzreich zugeordnet werden kann (Abb. 7). Insgesamt verdeutlichen die geringen Abstände im Stammbaum, dass die Aminosäuresequenzen der i-AAA Proteasen der verschiedenen Organismen sehr

konserviert sind. Dies wird durch phylogenetische Analysen bestätigt, die darauf hindeuten, dass das Gen der i-AAA Protease monophyletisch aus einem Vorgänger entstanden und in einer einzelnen Kopie in allen Taxa erhalten geblieben ist (Juhola et al. 2000). Sowohl die humane i-AAA Protease als auch die aus *N. crassa* können den Phänotyp *Yme1*-defizienter Hefezellen teilweise komplementieren, was darauf hindeutet, dass auch die Funktionen der Proteasen zumindest teilweise konserviert sind (Shah et al. 2000; Klanner et al. 2001).

## **5.2 Die Deletion von *Palap* ist unter Standardbedingungen positiv für *P. anserina***

Da die i-AAA Protease Teil des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems ist, wurde erwartet, dass der Verlust negative Auswirkungen für den betroffenen Organismus hat. Daher wurde der *Palap*-Deletionsstamm zunächst phänotypisch unter Standardbedingungen (27°C) charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der Verlust von PalAP weder das Wachstum der Stämme noch deren Myzelmorphologie und -pigmentierung beeinflusst (Abb. 9). Darüber hinaus sind auch die Perithezienbildung und die Keimung der Sporen nicht beeinträchtigt. Demnach hat der Verlust der i-AAA Protease bei *P. anserina* unter Standardbedingungen (optimalen Bedingungen) ähnlich wie bei *N. crassa* und *A. thaliana* keine Auswirkungen auf die untersuchten energieabhängigen Prozesse (Klanner et al. 2001; Gibala et al. 2009). Dies überrascht, da die Deletion der i-AAA Protease sowohl bei *S. cerevisiae* als auch in humanen HEK-Zellen eine Vielzahl an Phänotypen wie z.B. eine veränderte Mitochondrienmorphologie und verminderte Aktivität der Atmungskettenkomplexe auslöst, die auf mitochondriale Dysfunktionen hinweisen (vgl. 1.4.2.1 und 1.4.2.5; Thorsness & Fox 1993; Campbell & Thorsness 1998; Stiburek et al. 2012).

Interessanterweise weichen die Phänotypen auch bei anderen *P. anserina*-Mutanten, bei denen Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle deletiert wurden, unter Standardbedingungen nicht vom Wildstamm ab. So sind nach der Deletion von *PaClpP* keine morphologischen Auffälligkeiten feststellbar, und auch die Deletion von *PaLon* beeinflusst weder das Wachstum noch die Fruchtkörperbildung oder die Sporenkeimung (Fischer 2011; Adam et al. 2012). Beim  $\Delta PaLon$ -Stamm ist lediglich die Dichte der aus den Sporen gebildeten Myzelien geringer als beim Wildstamm.

Um die Bedeutung des Verlusts von PalAP für die Alterung von *P. anserina* zu untersuchen, wurden Lebensspannen-Experimente durchgeführt (Abb. 10). Entgegen der Erwartungen ist die mediane Lebensspanne des *Palap*-Deletionsstamms um über 70 % verlängert, während die maximale Lebensspanne sogar um 135 % verlängert ist verglichen mit der des Wildstamms. Dieser Effekt kann durch die Wiedereinführung des *Palap*-Gens unter der Kontrolle des putativen endogenen Promotors wieder

revertiert werden, was bestätigt, dass der Verlust von PaIAP für die Verlängerung der Lebensspanne verantwortlich ist (Abb. 29). Interessanterweise hat der Verlust von *PaClpP* einen ähnlich überraschenden Einfluss auf die Lebensspanne von *P. anserina*, die in Abwesenheit der CLPP-Protease ebenfalls deutlich verlängert ist (Fischer 2011). Dagegen spiegelt die Modulation von *PaLon* die intuitiv erwartete Bedeutung des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems für die Alterung wider. Während die konstitutive Überexpression der Protease zu einer Verlängerung der gesunden Lebensspanne führt, hat die Deletion des Gens eine deutliche Verkürzung zur Folge (Luce & Osiewacz 2009; Adam et al. 2012). Diese Beobachtungen spiegeln möglicherweise die Bedeutung der Proteasen für die mitochondriale Homöostase unter Standardbedingungen. Während die LON-Protease als potenziell wichtigste Protease auch unter Standardbedingungen benötigt wird, gibt es Hinweise, dass die i-AAA Protease und auch die CLPP-Protease vor allem unter Stressbedingungen benötigt werden (vgl. 1.1 und 5.4; Thorsness & Fox 1993; Haynes et al. 2007; Fischer et al. 2012). Unter optimalen Bedingungen scheinen die i-AAA Protease und die CLPP-Protease die Lebensspanne von *P. anserina* eher zu begrenzen. Dadurch weisen sie die Merkmale antagonistisch pleiotroper Gene auf. Die 1957 von Williams aufgestellte Hypothese der Wirkung antagonistisch pleiotroper Gene geht davon aus, dass die Gegenwart mancher Gene bis zum Ende der reproduktiven Phase vorteilhaft ist, dem Organismus im Alter jedoch eher schadet (Kirkwood & Austad 2000).

In *S. cerevisiae* löst der Verlust von YME1 eine erhöhte Mitophagierate aus (vgl. 1.4.2.1; Campbell & Thorsness 1998; Tolkovsky 2009). Mitophagie stellt eine Form der mitochondrialen Qualitätskontrolle dar, bei der geschädigte mitochondriale Bereiche selektiv abgebaut werden (Tatsuta & Langer 2008). Daraus ergibt sich die Hypothese, dass der *Palap*-Deletionsstamm durch den erhöhten Abbau dieser geschädigten Bereiche mehr funktionsfähige Mitochondrien enthält und die Alterung deshalb verzögert wird. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die *Palap*-Deletionsstämme länger filamentöse Mitochondrien enthalten und auch länger intakte, nicht-reorganisierte mtDNA nachgewiesen werden kann (Abb. 11 und Abb. 12). Darüber hinaus lässt sich keine Veränderung des Verhältnisses von Kern- zu mitochondrial-kodierten Genen feststellen (Abb. 16B). Sowohl die Reorganisation der mtDNA als auch die zunehmende Fragmentierung der Mitochondrien werden bei *P. anserina* häufig während des Alterns beobachtet (Stahl et al. 1978; Cummings et al. 1979; Scheckhuber et al. 2007). Der Verlust der i-AAA Protease führt jedoch zu einer Verzögerung dieser Vorgänge. Auch bei *N. crassa* wird die mitochondriale Morphologie durch den Verlust der i-AAA Protease nicht negativ beeinflusst (Klanner et al. 2001), was die Hypothese der erhöhten Mitophagierate unterstützt.

Insgesamt hat der Verlust von *Palap* anders als erwartet unter Standardanzuchtbedingungen keine nachteiligen Auswirkungen für *P. anserina*. Die i-AAA Protease PaIAP scheint für vitale Funktionen wie

Wachstum und Fertilität nicht benötigt zu werden. Vielmehr scheint ihre Abwesenheit vorteilhaft für den Organismus zu sein, da die Lebensspanne von *P. anserina* dadurch deutlich verlängert wird.

### 5.3 Der *Palap*-Deletionsstamm ist hitzesensitiv

Normalerweise wird *P. anserina* im Labor unter optimalen Wachstumsbedingungen angezogen (Maignac et al. 2004). Natürlicherweise wächst *P. anserina* jedoch auf dem Dung von Herbivoren und ist somit sowohl tageszeitlichen Temperaturschwankungen als auch wechselnden Nährstoffangeboten ausgesetzt (Ebersohn & Eicker 1997). Aufgrund der unerwarteten Beobachtung, dass die Deletion der i-AAA Protease zu einer unbeeinträchtigten Verlängerung der Lebensspanne führt, wurde die Bedeutung von PalAP unter Stressbedingungen analysiert.

Dabei zeigte sich, dass der *Palap*-Deletionsstamm bei Hitzestress (37°C) deutlich stärker beeinträchtigt wird als der Wildstamm. So sind sowohl die Wachstumsrate von juvenilem Myzel, als auch die Menge der von hitzestressstem Myzel gebildeten Perithezien und die Keimungsrate der Sporen bei Hitzestress in Abwesenheit von PalAP deutlich stärker reduziert als beim Wildstamm (Abb. 14). Da sich jedoch die Menge der Fruchtkörper bei längerer Inkubation an das Wildstammniveau angleicht (Daten nicht gezeigt), trägt wahrscheinlich das reduzierte Wachstum zur verzögerten Perithezienbildung bei. Dagegen scheinen Sporen in Abwesenheit der i-AAA Protease teilweise abzusterben, da nicht-gekeimte Sporen des Deletionsstamms auch bei anschließender Inkubation bei 27°C kein Wachstum mehr zeigten (Daten nicht gezeigt). Die Bedeutung der i-AAA Protease bei der Keimung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass bei *A. thaliana* die Samen die höchste Transkriptmenge von *AtFtsH4* enthalten (Gibala et al. 2009). Insgesamt kann der durch den Verlust der i-AAA Protease ausgelöste hitzesensitive Phänotyp auch bei *S. cerevisiae* und *N. crassa* beobachtet werden (Thorsness & Fox 1993; Klanner et al. 2001). Sowohl der Verlust von YME1, als auch der von IAP-1 lösen bei den betroffenen Stämmen bei erhöhten Temperaturen Atmungsdefizienz aus. Während dies bei *S. cerevisiae* durch verminderten Sauerstoffverbrauch bestätigt werden konnte, wurde dieser Aspekt bei *N. crassa* nicht weiter untersucht (Campbell & Thorsness 1998).

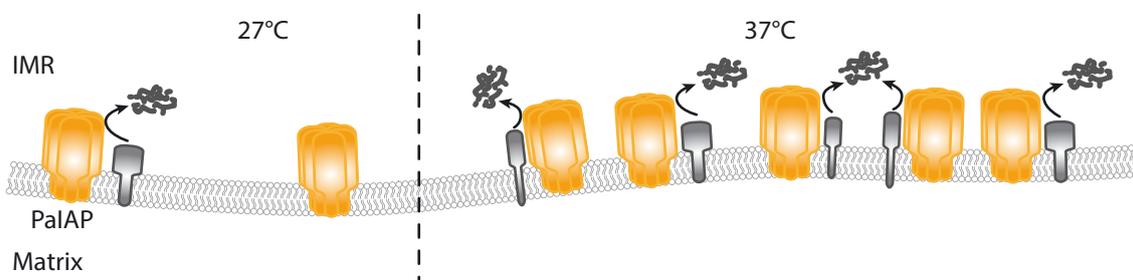
Hitzestress beeinflusst auch die Lebensspanne des Wildtyps von *P. anserina* (Abb. 15). Während die mediane Lebensspanne des Wildstamms bei Hitzestress um das 2,5fache auf ~ 10 Tage verkürzt wird, wird die des *Palap*-Deletionsstamms um das 5,5fache reduziert verglichen mit der Lebensspanne bei 27°C. Dies entspricht einer medianen Lebensspanne von ~ 8 Tagen und verdeutlicht die erhöhte Hitzesensitivität. Die erhöhte Instabilität der mtDNA des *Palap*-Deletionsstamms trägt vermutlich sowohl zum reduzierten Wachstum als auch zur verkürzten Lebensspanne der Mutante bei (Abb. 16A).

Interessanterweise ist Hitzestress die einzige der untersuchten Stressbedingungen, bei der die Deletion von *Palap* messbare Auswirkungen auf *P. anserina* hat. Weder bei Kälte (17°C) noch in Gegenwart von Stressoren unterscheidet sich das Wachstum der Mutante von dem des Wildstamms (Daten nicht gezeigt). Als Stressoren wurden dem Medium oxidativen Stress auslösende Stoffe wie  $H_2O_2$ , Paraquat und Kupfersulfat (Kunstmann & Osiewacz 2008), Ethidiumbromid, welches mitochondrialen Stress auslöst (Haynes et al. 2007), und das Apoptose-auslösende Farnesol zugegeben (Brust et al. 2010).

Diese Beobachtungen der erhöhten Hitzesensitivität des *Palap*-Deletionsstamms weisen auf eine Beteiligung der i-AAA Protease an der Hitzestressantwort von *P. anserina* hin. Dieser Befund unterstreicht die essenzielle Bedeutung der i-AAA Protease für den Organismus. Die i-AAA Protease PalAP ermöglicht es *P. anserina* auch unter wechselnden Temperaturbedingungen in ihrem natürlichen Umfeld zu überleben und die Wahrscheinlichkeit der Reproduktion zu erhöhen. Der Nachteil dabei ist, dass die Lebensspanne des Ascomyceten durch die Protease begrenzt wird, weshalb die Anwesenheit von *Palap* im Genom von *P. anserina* eine Kompromisslösung darzustellen scheint. Möglicherweise wirkt der Verlust von *Palap* bei 27°C hormetisch (vgl. 1.1) und löst leichte mitochondriale Dysfunktionen aus, die zu einer Verbesserung der Stressantwort und dadurch einer Verlängerung der Lebensspanne führen. Wird der Stress jedoch erhöht (z.B. bei Hitzestress), sind die Systeme möglicherweise überlastet, was sich in einer verkürzten Lebensspanne spiegelt.

#### 5.4 PalAP ist an der Hitzestressantwort von *P. anserina* beteiligt

Die beobachteten Phänotypen des *Palap*-Deletionsstamms zeigen deutlich, dass die i-AAA Protease PalAP bei *P. anserina* an der Hitzestressantwort beteiligt ist. Hitzestress löst eine Form der ungefalteten Proteinantwort aus (UPR; vgl. 1.3), da dabei die Menge an un- und fehlgefalteten Proteinen deutlich zunimmt (Wickner et al. 1999). Da die i-AAA Protease sowohl Chaperon- als auch Proteasefunktion besitzt, ist deren Beteiligung an der Hitzestressantwort zur Wiederherstellung der mitochondrialen Homöostase durchaus denkbar, weshalb die Auswirkung von Hitzestress auf die Proteinmenge von PalAP untersucht wurde.



**Abb. 40: Temperaturabhängige Regulation von PalAP bei *P. anserina*.** In Mitochondrien des Wildstamms nimmt die Proteinmenge von PalAP durch Hitzestress (37°C) verglichen mit der Menge unter Standardbedingungen (27°C) deutlich zu. Dies deutet darauf hin, dass PalAP bei *P. anserina* an der Hitzestressantwort beteiligt ist, was sinnvoll erscheint, da die Menge an geschädigten mitochondrialen Proteinen (grau) durch Hitzestress ebenfalls zunimmt. IMR - Intermembranraum.

Die Analysen mitochondrialer Proteine des Wildstamms zeigen, dass die Menge an PalAP nach 24stündigem Hitzestress bei 37°C etwa 6x höher ist als bei Inkubation bei 27°C (Abb. 18 und Abb. 40). Dies führt sicherlich zu einer Steigerung der Aktivität der i-AAA Protease und verdeutlicht die wichtige Rolle, die PalAP normalerweise bei der Hitzeresistenz von *P. anserina* spielt. Im humanen Genom weist die Promotorregion der i-AAA Protease die notwendigen Elemente der durch UPR<sup>mt</sup> aktivierten Gene auf und ist durch mitochondrialen Stress induzierbar (Aldridge et al. 2007; Horibe & Hoogenraad 2007). Diese Befunde unterstützen die Hypothese, dass die i-AAA Protease besonders in Stresssituationen benötigt und in diesen entsprechend hochreguliert wird. Dagegen hatte die Inkubation von *S. cerevisiae* bei 42°C keinen Einfluss auf die Proteinmenge von YME1, wobei die Hefezellen jedoch nur einem milden, 4stündigen Hitzeschock ausgesetzt wurden (Bender et al. 2010).

In *C. elegans* spielt die CLPP-Protease bei mitochondrialem Stress eine bedeutende Rolle, wogegen die Deletion des *Yme1*-Homologs *Ymel-1* keine Auswirkung auf die Signalkette hatte (Haynes et al. 2010). Dabei stammt bei *C. elegans* jedoch anders als z.B. bei *S. cerevisiae* der größte Teil der exportierten Peptide aus der Matrix, wogegen nur ein geringer Teil der Peptide aus der inneren Membran und dem Intermembranraum freigesetzt werden und z.B. von der i-AAA Protease generiert werden (Augustin et al. 2005). Da es jedoch deutliche Unterschiede zwischen den bei Säugern und Nematoden beteiligten Signalwegen gibt (Tatsuta 2009), werden weitere Untersuchungen Aufschluss über die Rolle der i-AAA Protease bei mitochondrialem Stress geben.

In höheren biologischen Systemen wie z.B. beim Menschen wurde bisher noch nicht untersucht, ob die i-AAA Protease eine Rolle bei der Hitzestressantwort spielt. Obwohl der Mensch homöotherm ist, kann die Körpertemperatur in engen Grenzen schwanken. Während die Temperatur der inneren Organe unter normalen Umständen mehr oder weniger konstant gehalten wird, variiert die der menschlichen Haut zwischen 20 - 40°C ohne größeren Schaden zu nehmen (Page & Shear 1988). So kann die Hauttemperatur durch Sonnenstrahlen innerhalb von 15 - 20 min auf 40 - 42°C ansteigen (Chen et al. 2004). Die Kerntemperatur des Körpers kann z.B. durch fiebrige Erkrankungen oder körperliche Aktivität deutlich ansteigen, wobei bei Säugern bereits geringe Temperaturerhöhungen (um 1 - 2°C) leichtes Fieber bzw. Fieber darstellen (Pugh et al. 1967; Park et al. 2005). In menschlichen Zellkulturen reichte bereits milder Hitzestress wie z.B. bei fiebrigen Erkrankungen ( $\geq 38,5^\circ\text{C}$ ) aus, um den Hitzeschockfaktor HSF-1 zu aktivieren (Tulapurkar et al. 2009). Dieser wiederum induziert die Expression von Hitzeschockproteinen wie HSP72, welches durch Hitzestress in den Zellkern und die Nukleoli transloziert wird (Ellis et al. 2000). Darüber hinaus ergab die *in-vivo*-Analyse menschlicher Haut, dass auch die Mengen an HSP27, HSP60, HSP72i (induzierbare Isoform von HSP70) und HSP90 nach einstündigem Hitzestress bei 41°C deutlich ansteigen (Wilson et al. 2000). Da der Promotor des Chaperonins HSP60 dieselben durch mitochondrialen Stress induzierbaren Elemente aufweist wie der der humanen i-AAA Protease (Zhao et al. 2002; Aldridge et al. 2007), wäre es denkbar, dass die i-AAA Protease auch bei homöothermen Organismen ähnlich wie bei *P. anserina* an der Hitzestressantwort beteiligt ist.

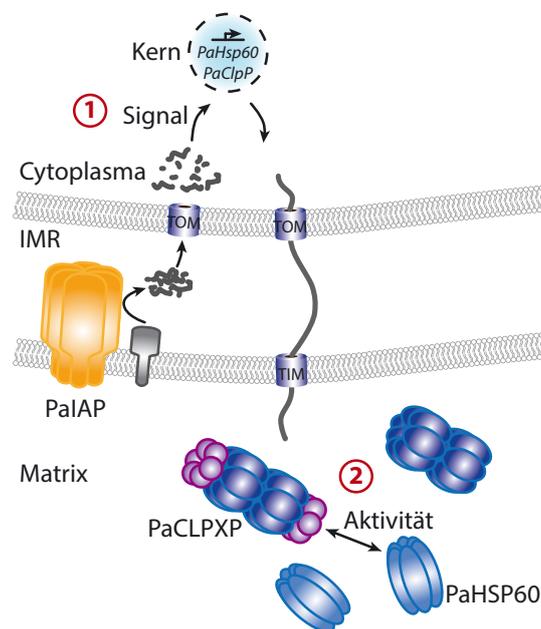
## 5.5 Der Verlust von PalAP beeinflusst andere Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle

Die i-AAA Protease spielt bei *P. anserina* eine wichtige Rolle bei der Hitzestressantwort. Da die effiziente Beseitigung geschädigter Proteine jedoch unerlässlich für die Funktion der Mitochondrien ist, überschneiden sich einige der Aufgaben der an der Proteinqualitätskontrolle beteiligten Proteasen. Dies führt zu der Frage, welche Auswirkung der Verlust von PalAP auf andere Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle hat und wie dies zu der unter Normalbedingungen verlängerten Lebensspanne beiträgt.

Die i-AAA Protease ist hauptsächlich am Abbau membrangebundener Proteine beteiligt, die jedoch bei *S. cerevisiae* teilweise auch von der m-AAA Protease abgebaut werden können (Leonhard et al. 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass die m-AAA Protease PaMAP im *Palap*-Deletionsstamm kompensatorisch hochreguliert wird und die Funktion von PalAP zumindest teilweise übernimmt. Da kein geeigneter Antikörper zum Nachweis von PaMAP zur Verfügung stand, wurde die Transkriptmenge von *PaMap* analysiert (Abb. 17). Bei 27°C wird jedoch kein feststellbarer Unterschied in der *PaMap*-Menge zwischen dem Wild- und *Palap*-Deletionsstamm erkennbar, sodass die Hypothese der kompensatorischen Hochregulation nicht bestätigt werden kann. Bei Hitze nimmt die mRNA-Menge von *PaMap* dagegen im Wildstamm tendenziell zu, was beim *Palap*-Deletionsstamm jedoch nicht der Fall ist. Dieser fehlende Anstieg trägt sicherlich zum hitzesensitiveren Phänotyp des *Palap*-Deletionsstamms bei.

Darüber hinaus beeinflusst der Verlust von PalAP auch Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle in der Matrix (Abb. 19). Sowohl die Proteinmenge der Proteaseuntereinheit PaCLPP als auch die des Chaperonins PaHSP60 sind bereits unter Standardbedingungen tendenziell verringert, während die Mitochondrien des *Palap*-Deletionsstamms nach 24stündigem Hitzestress signifikant weniger PaCLPP und PaHSP60 als die der Wildstämme aufweisen. Interessanterweise weichen die PaLON-Mengen dagegen weder bei 27°C noch nach Hitzestress von denen der Wildstämme ab. Bei Hitzestress werden im Wildstamm sowohl die Proteinmengen von PaLON als auch die von PaHSP60 hochreguliert (Weckmann 2010 bzw. Daten nicht gezeigt), wogegen für PaCLPP bisher keine Beteiligung an der Hitzestressantwort gezeigt werden konnte. Die besonders bei Hitzestress reduzierten PaCLPP- und PaHSP60-Mengen in den Mitochondrien der *Palap*-Deletionsstämme lassen sich möglicherweise durch fehlende Signale aufgrund des Verlusts von PalAP erklären. Die durch die i-AAA Protease und die anderen mitochondrialen Proteasen freigesetzten Peptide dienen vermutlich zur Kommunikation zwischen den Mitochondrien und der zellulären Umgebung, wodurch die mitochondriale Funktion an veränderte Umweltbedingungen angepasst werden kann (Abb. 41; Young et al. 2001; Arnold et al. 2006a). Durch die Deletion von *Palap* fehlen die normalerweise von der i-AAA Protease PalAP freigesetzten Pepti-

de und somit Informationen über den Zustand der Mitochondrien, besonders über mitochondrialen Stress. Unter normalen Bedingungen trägt dies womöglich zur Lebensverlängerung bei, solange die Schädigung ein gewisses Maß nicht überschreitet und durch andere Proteasen und eine erhöhte Mitophagierate kontrolliert werden kann. Da jedoch bei Hitzestress die Menge an PaIAP vermutlich durch die erhöhte Menge an geschädigten Membranproteinen deutlich ansteigt (Abb. 18), steigt vermutlich auch die Menge an freigesetzten Peptiden an. Möglicherweise tragen diese Peptide unter anderem zur Regulation der Expression von *PaHsp60* und/oder *PaClpP* bei, sodass durch das Fehlen dieser Signale im *Palap*-Deletionsstamm deren Hochregulierung vermindert wird. Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die mRNA-Menge von *ClpP* in humanen Zellen durch die Herunterregulierung von *Yme1l* reduziert wird (Stiburek et al. 2012). Darüber hinaus scheinen die Aktivitäten von HSP60, CLPP und LON in humanen Fibroblasten aufeinander abgestimmt zu sein, da die verminderte Aktivität von HSP60 zu einer reduzierten Proteinmenge von CLPP und LON führte (Hansen et al. 2008). Demnach wäre es auch denkbar, dass durch den Verlust von PaIAP die Menge von PaHSP60 oder PaCLPP reduziert wird, was wiederum die Menge des jeweils anderen Proteins beeinflusst. Wie die Deletion von *Palap* dies bewirkt und warum PaLON nicht betroffen ist, werden weitere Experimente zeigen. Die reduzierte PaHSP60-Menge trägt jedoch sicherlich zur verminderten Hitzeresistenz des Deletionsstamms bei.



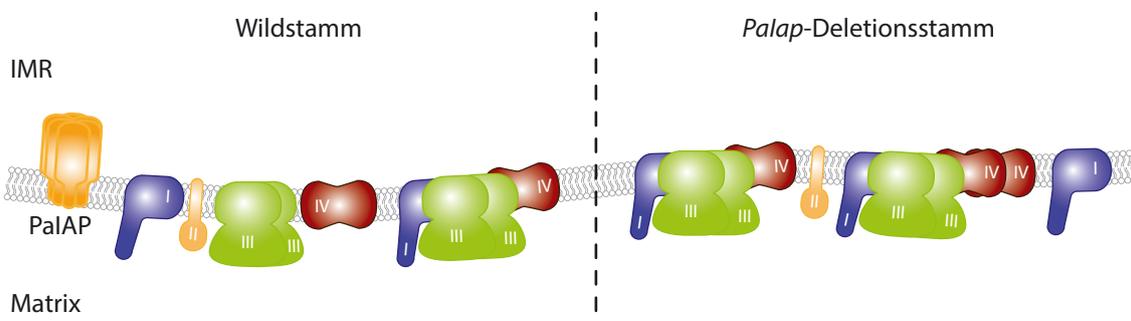
**Abb. 41: Möglicher Einfluss der i-AAA Protease PaIAP auf Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle in der Matrix.** Die durch die proteolytische Aktivität von PaIAP beim Abbau mitochondrialer Proteine (grau) freigesetzten Peptide dienen möglicherweise der Kommunikation zwischen den Mitochondrien und der zellulären Umgebung (1). Dadurch wird potenziell die Expression von *PaHsp60* und/oder *PaClpP* beeinflusst, sodass deren Proteinmengen bei mitochondrialem Stress angepasst werden können. Darüber hinaus werden die Aktivitäten des Chaperonins PaHSP60 und der Protease PaCLPP möglicherweise aufeinander abgestimmt, sodass eine verringerte Menge eines der beiden Proteine die des anderen Proteins beeinflusst (2). IMR - Intermembranraum.

Insgesamt hat die Deletion von *Palap* vor allem bei Hitzestress Einfluss auf andere Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle, wodurch der hitzesensitive Phänotyp noch verstärkt wird. Dabei ist noch unklar woraus die Signale bestehen, die normalerweise zur Hochregulierung der m-AAA Protease PaMAP, der PaCLPP-Protease und des Chaperonins PaHSP60 führen.

### 5.6 Die Deletion von *Palap* führt zur Reorganisation der Atmungskettenkomplexe

Da der Verlust der i-AAA Protease sowohl bei *S. cerevisiae* als auch bei *A. thaliana* Auswirkungen auf die mitochondriale Atmungskette hat, wurde die Zusammensetzung der an der oxidativen Phosphorylierung beteiligten Komplexe (OXPHOS-Komplexe) im *Palap*-Deletionsstamm untersucht.

Dabei wird deutlich, dass sich der Verlust von PalAP auch bei *P. anserina* auf die Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe auswirkt, da sich diese bei 27°C beim *Palap*-Deletionsstamm deutlich vom Wildstamm unterscheidet (Abb. 22). Während die Mengen der Monomere von Komplex I und IV in den *Palap*-Deletionsstämmen deutlich reduziert sind, ist die Menge des Superkomplexes  $S_2$  signifikant erhöht, und auch die Menge des Superkomplexes  $S_1$  ist tendenziell höher als bei den Wildstämmen. Die beiden Superkomplexe sind aus je einem Komplex I-Monomer, einem Komplex III-Dimer und ein bis zwei Komplex IV-Monomeren aufgebaut, sodass die Monomere im *Palap*-Deletionsstamm vermehrt in Superkomplexen organisiert zu sein scheinen (Abb. 42). Die freien Dimere von Komplex III konnten unter den gewählten Elektrophoresebedingungen nicht vom Monomer von Komplex V getrennt werden. Da jedoch sowohl die Bandenintensitäten des Monomers als auch die des Dimers von Komplex V in den Mitochondrien der *Palap*-Deletionsstämmen reduziert sind, wäre es denkbar, dass zwar die Menge des Komplex V-Dimers abnimmt, die des Monomers jedoch zunimmt, während gleichzeitig die Menge des freien Komplex III-Dimers abnimmt. Somit bliebe die Gesamtmenge der OXPHOS-Komplexe in den *Palap*-Deletionsstämmen unverändert, wobei sich das Verhältnis der freien Komplexe zu den stabileren Superkomplexen hin verschieben würde.



**Abb. 42: Reorganisation der Atmungskettenkomplexe im *Palap*-Deletionsstamm bei 27°C.** Im Wildstamm liegen die Atmungskettenkomplexe sowohl als Monomere und Dimere vor, als auch in Superkomplexen. Der Verlust von PalAP führt zur vermehrten Organisation der freien Komplexe in Superkomplexen. IMR – Intermembranraum.

Hitzestress führt in den Mitochondrien der Wildstämme zu einer ähnlichen Verschiebung des Verhältnisses der freien Komplexe hin zur Bildung stabilerer Superkomplexe wie bei den *Palap*-Deletionsstämmen bei 27°C. Während die Monomere der Komplexe I und IV kaum noch detektierbar sind, nimmt die Menge der Superkomplexe  $S_1$  und  $S_2$  in den mitochondrialen Proteinextrakten der Wildstämme deutlich zu. Auch in den *Palap*-Deletionsstämmen sind die Monomere der Komplexe I und IV kaum noch nachweisbar. Während jedoch die Mengen der Superkomplexe beim Wildstamm zunehmen, nehmen diese bei den *Palap*-Deletionsstämmen tendenziell eher ab.

Eine zunehmende Reorganisation der Atmungskettenkomplexe in stabilere Superkomplexe kann auch bei alten Mäusen und eierlegenden Zahnkarpfen (*Nothobranchius furzeri*) beobachtet werden, wogegen die Superkomplexe in jungen Tieren schwer nachweisbar sind (persönliche Kommunikation Dr. I. Wittig, AK Brandt, Molekulare Bioenergetik, Frankfurt). Dies wurde auch in Muskelzellen von Ratten gezeigt, bei denen die Menge an Superkomplexen in alten Tieren ebenfalls höher war als in jungen Tieren (Lombardi et al. 2009). Neben der Stabilisierung der einzelnen Komplexe (Schägger et al. 2004; Stroh et al. 2004), ist die Weitergabe der Elektronen innerhalb der Komplexe („*substrate channelling*“) ein weiterer Vorteil der Superkomplexbildung (Schägger & Pfeiffer 2000). Die Organisation der Atmungskettenkomplexe in Superkomplexe scheint demnach ein Teil der zellulären Stressantwort zu sein. Durch den Verlust von PalAP wird bei *P. anserina* möglicherweise eine milde Stresssituation ausgelöst, die bei 27°C in einem lebensverlängernden hormetischen Effekt resultiert (vgl. 1.1). Da die OXPHOS-Komplexe beim *Palap*-Deletionsstamm jedoch bereits unter Standardbedingungen reorganisiert sind, können die Stämme anders als die Wildstämme in neuen Stresssituationen wie z.B. Hitzestress ihre Stressantwort nicht weiter steigern. Dieser Nachteil trägt sicherlich zur beobachteten Hitzesensitivität der *Palap*-Deletionsstämme bei.

Interessanterweise scheint die Reorganisation der Komplexe beim *Palap*-Deletionsstamm keine Auswirkungen auf die Aktivitäten der Komplexe zu haben. Weder die Aktivität von Komplex I noch die Menge an Komplex IV mit intakten Häm-Gruppen unterscheiden sich unter Standardbedingungen von denen des Wildstamms, und auch der Sauerstoffverbrauch des Myzels ist nicht verändert (Abb. 23, Abb. 24A und Abb. 25). Dies stimmt mit den Untersuchungen zu Wachstum und Fertilität überein, die ebenfalls keine Hinweise auf Probleme bei der Energiebereitstellung durch den Verlust von PalAP liefern (Abb. 9). Somit scheint der Verlust der i-AAA Protease anders als bei *S. cerevisiae* keine negativen Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung zu haben (Nakai et al. 1995). Da sich die Organisation der Atmungskettenkomplexe des *Palap*-Deletionsstamms jedoch von der des Wildstamms unterscheidet, wirft dies die Frage auf, ob diese anders arrangiert werden mussten, um ausreichend Energie bereitstellen zu können.

Hitzestress hat weder beim Wild- noch beim *Palap*-Deletionsstamm einen Einfluss auf die Aktivität von Komplex I (Abb. 23A und B). Während beim Wildstamm auch die Intensität der Färbung der Häme von Komplex IV durch Hitze nicht verändert wird, nimmt die des *Palap*-Deletionsstamms signifikant ab (Abb. 25). Da sich jedoch der Sauerstoffverbrauch bei Hitzestress zwischen Wildstamm und Mutante nicht unterscheidet, sind Auswirkungen auf z.B. das Wachstum des *Palap*-Deletionsstamms eher unwahrscheinlich.

Da die i-AAA Protease bereits mehrfach mit der Kontrolle von am Lipid-Metabolismus der Mitochondrien beteiligten Proteinen in Verbindung gebracht werden konnte (vgl. 1.4.2.1; Nebauer et al. 2007; Potting et al. 2010; Claypool et al. 2011), lässt dies die Hypothese zu, dass der Verlust von PaIAP zu einer Veränderung der Lipid-Protein-Interaktionen führt und so die Reorganisation der Atmungskettenkomplexe in stabilere Superkomplexe ausgelöst wird. Die Aufrechterhaltung einer definierten Lipidzusammensetzung ist von großer Bedeutung für die Funktionalität mitochondrialer Membranen (Potting et al. 2010). So ändert sich z.B. das Verhältnis der Phospholipide zueinander temperaturabhängig und muss entsprechend angepasst werden (Birner et al. 2003). Dabei konnte sowohl für Phosphatidylethanolamin (PE) als auch für Cardiolipin (CL) gezeigt werden, dass diese für die Biogenese der Atmungskettenkomplexe bzw. die Stabilität der Superkomplexe eine wichtige Rolle spielen (Birner et al. 2001; Pfeiffer et al. 2003; Engmann 2009). Durch den Verlust der i-AAA Protease ändert sich möglicherweise die Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membran, wodurch kompensatorische Effekte aktiviert werden, die zur Reorganisation und Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe führen. Darüber hinaus würden vermutlich vor allem bei höheren Temperaturen geschädigte Membranproteine akkumulieren, die ebenfalls zu einer Änderung der Membranfluidität bzw. der Membranintegrität beitragen würden. Wie PaIAP die Reorganisation der Atmungskettenkomplexe auslöst, werden weitere Versuche zeigen.

## 5.7 Auswirkung des Verlusts von PaIAP auf das mitochondriale Proteom

Trotz intensiver Forschung ist die zelluläre Funktion der i-AAA Protease immer noch kaum verstanden (Francis & Thorsness 2011). Um jedoch die Phänotypen des *Palap*-Deletionsstamms erklären zu können, werden Hinweise auf die Substrate von PaIAP und somit auf die Aufgaben der i-AAA Protease benötigt. Dazu wurden einerseits einige aus *S. cerevisiae* bekannte Substrate von YME1 untersucht, sowie vergleichende Analysen des mitochondrialen Proteoms von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durchgeführt.

Aufgrund der konservierten Aminosäuresequenzen der i-AAA Proteasen und der Nähe von PaIAP und YME1 im Stammbaum (Abb. 7) wurde der Effekt des Verlusts von PaIAP auf einige Substrate von YME1 in

*P. anserina* analysiert. Während nicht-assembliertes COX2 in *Yme1*-defizienten Stämmen akkumuliert, ist in mitochondrialen Extrakten der *Palap*-Deletionsstämmen die Proteinmenge von PaCOX2 bereits bei 27°C geringer als in den Mitochondrien der Wildstämmen (Abb. 26). Dieser Effekt wird durch 24stündigen Hitzestress noch verstärkt. Initiale Western Blot-Analysen der Prohibitine PaPHB1 und PaPHB2 zeigen unabhängig von der Temperatur ebenfalls keine Akkumulation der Proteine nach Verlust von PalAP (Anhang Abb. 46). Ähnlich wie bei IAP-1 aus *N. crassa* und YME1 scheinen sich demnach auch die Substratspezifitäten von PalAP und YME1 zu unterscheiden (Klanner et al. 2001; Gräf et al. 2007). Dabei kann die Expression von *lap-1* die Wachstumsphänotypen von *Yme1*-defizienten Hefestämmen teilweise komplementieren. Dies zeigt jedoch, dass es durchaus Funktionen der i-AAA Protease gibt, die zwischen den verschiedenen Organismen konserviert sind, und dass der Abbau von COX2 und den Prohibitinen nur bedingt für die Phänotypen des *Yme1*-defizienten Hefestamms verantwortlich ist.

Um die Auswirkung des Verlusts von PalAP auf das mitochondriale Proteom von *P. anserina* zu untersuchen, wurden vergleichende Proteomanalysen von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durchgeführt (Abb. 20). Dabei wurden 21 differenziell gebildete Proteine identifiziert, von denen die Menge bei 16 Proteinen in den *Palap*-Deletionsstämmen erhöht ist verglichen mit den Wildstämmen (Tabelle 21). Zu den identifizierten Proteinen gehören Untereinheiten der ATP-Synthase, Proteine des Citratzyklus, des Aminosäure- und Fettsäure-Stoffwechsels sowie Chaperone. Interessanterweise konnten Proteine dieser Stoffwechselklassen in einer Proteomanalyse von mitochondrialen Proteinen aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen in den juvenilen Proben in größerer Menge detektiert werden als in seneszenten Kulturen (Kunstmann 2009). Darüber hinaus konnte z.B. in Mäusen sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene gezeigt werden, dass die Menge der ATP-Synthase während des Alterns abnimmt (Manczak et al. 2005; Chakravarti et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass die Mitochondrien der *Palap*-Deletionsstämmen aufgrund der verlängerten Lebensspanne mit 14 Tagen bezogen auf die Gesamtlebensspanne noch deutlich ‚jünger‘ sind als 14 Tage alte Wildstämmen.

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich auch PaPHB1 und PaHSP60. Während die Menge von PaPHB1 bei Wachstum des Myzels auf M2-Festmedium in den Mitochondrien des *Palap*-Deletionsstamms mit der des Wildstamms vergleichbar ist (Abb. 46A), weist der *Palap*-Deletionsstamm nach Inkubation in CM-Flüssigmedium deutlich reduzierte Mengen auf (Tabelle 21). Dabei existieren jedoch möglicherweise modifizierte Formen von PaPHB1, sodass in 2D-Analysen Unterschiede in den verschiedenen Formen auftreten, während die Gesamtmenge von PaPHB1 nicht verändert ist. Darüber hinaus sind die Mengen von PaHSP60 nach Wachstum auf M2-Festmedium beim *Palap*-Deletionsstamm tendenziell nicht signifikant verändert (Abb. 19A), während diese bei Inkubation in CM-Flüssigmedium signifikant erhöht sind verglichen mit dem Wildstamm (Tabelle 21). Dies spiegelt die Bedeutung der

Anzuchtbedingungen des *Palap*-Deletionsstamms wider, die im Laufe der Untersuchungen deutlich wurde. Daraufhin erfolgte die Anzucht der Stämme in dieser Arbeit auf M2-Festmedium, um die Ergebnisse besser auf die Situation in den Hyphen während des Alterns übertragen zu können.

Interessanterweise können die bisher identifizierten Substrate der i-AAA Protease nicht in allen Organismen von dieser abgebaut werden (vgl. 1.4.2 und Tabelle 1). Dabei wird deutlich, dass der Abbau häufig nur unter bestimmten Anzuchtbedingungen und/oder in bestimmten Altersstadien stattfindet. Dies zeigt, dass die Aktivität der i-AAA Protease in manchen Situationen wichtiger ist als in anderen, und dass sich womöglich auch die jeweiligen Substrate abhängig von der Anzuchtbedingung ändern können. Dadurch wäre es möglich, dass sich die Unterschiede in der Substratspezifität der verschiedenen Organismen durch die unterschiedlichen Lebensbedingungen erklären lassen.

### 5.8 Die proteolytische Aktivität von PalAP begrenzt die Lebensspanne von *P. anserina*

Um die Bedeutung der proteolytischen und der Chaperonaktivität der i-AAA Protease PalAP auf die Lebensspanne von *P. anserina* zu untersuchen, wurden zwei proteolytisch inaktive Formen von PalAP durch *in-vitro*-Mutagenese generiert (Abb. 31). Da bei YME1 die Mutation von Glutaminsäure (E) des Metall-bindenden Motivs HExxH zu Glutamin (Q) die Proteasefunktion inaktiviert (Weber et al. 1996; Leonhard et al. 1999), wurde bei PalAP Glutaminsäure an Aminosäureposition 540 durch Glutamin ersetzt (Abb. 30). Dabei wurden zwei proteolytisch inaktive Varianten von PalAP erhalten, PalAP<sup>E540Q</sup> und PalAP<sup>E540QG</sup>, bei der neben dem Austausch von Glutaminsäure zufällig die Aminosäure Glycin (G) in das Metall-bindende Motiv eingefügt wurde. Während der Austausch von E zu Q keine Auswirkungen auf die Struktur der i-AAA Protease haben sollte (Abb. 32), wäre diese durch den Einbau von G potenziell verändert. Da jedoch beide Varianten in mitochondrialen Extrakten des *Palap*-Deletionsstamms detektierbar sind, scheinen sowohl PalAP<sup>E540Q</sup> und PalAP<sup>E540QG</sup> Komplexe bilden zu können.

Die Analyse der Lebensspannen von *Palap\_E540QG*, *Palap\_E540Q1* und *Palap\_E540Q2* zeigt unter Standardbedingungen eine ähnliche Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina* wie die des *Palap*-Deletionsstamms (Abb. 34). Dabei werden wie erwartet weder die Myzelmorphologie noch das Wachstum der Stämme beeinflusst (Anhang Abb. 50B und C). Dies entspricht den Beobachtungen in *S. cerevisiae*, deren Stämme mit proteolytisch inaktiver i-AAA Protease ebenfalls ähnliche Phänotypen wie der *Yme1*-Deletionsstamm aufweisen (Weber et al. 1996). Bei *P. anserina* ist demnach der Verlust der proteolytischen Funktion von PalAP verantwortlich für die Verlängerung der Lebensspanne. Ob dies jedoch durch den fehlenden Abbau eines oder mehrerer Substrate erfolgt, deren Peptide darüber hinaus noch Signalfunktionen besitzen können, oder durch die fehlende Prozessierung von z.B.

regulatorischen Proteinen, und ob dadurch Mitohormesis ausgelöst wird (vgl. 1.1), muss noch weiter untersucht werden.

Darüber hinaus wird der Einfluss der Mutation auf die Lebensspanne von *P. anserina* bei Hitzestress weitere interessante Informationen über die proteolytische und die Chaperonaktivität von PaIAP ergeben. So konnte für die prokaryotische Protease DegP gezeigt werden, dass diese bei niedrigen Temperaturen als Chaperon fehlgefalteter Proteine agiert, während die proteolytische Funktion fast ausschließlich bei hohen Temperaturen nachweisbar ist (Spiess et al. 1999). DegP wechselt somit temperaturabhängig zwischen der Chaperon- und der Proteaseaktivität. Möglicherweise ist dies bei PaIAP umgekehrt der Fall.

Darüber hinaus kann die proteolytisch inaktive Form von PaIAP zur Identifizierung von Substraten verwendet werden. Bei YME1 bleibt die Struktur der i-AAA Protease trotz der Mutation erhalten und reichert Substrate an, die normalerweise nur kurzzeitig mit YME1 interagieren würden (Engmann 2009). So konnte in humanen Zellen gezeigt werden, dass COX2 mit der proteolytisch inaktiven Form von YME1L präzipitiert und somit ein Substrat darstellt, obwohl COX2 bei Herunterregulierung von *Yme1l* nicht akkumuliert (Stiburek et al. 2012). Die Untersuchung der mit der proteolytisch inaktiven Form von PaIAP interagierenden Proteine wird sicherlich zum Verständnis der Phänotypen des *Palap*-Deletionsstamms beitragen.

Insgesamt ist vor allem die Proteaseaktivität der i-AAA Protease für die Begrenzung der Lebensspanne von *P. anserina* verantwortlich. Welche Rolle die Chaperonaktivität bei Hitzestress spielt, werden z.B. Lebensspannenanalysen der Stämme mit proteolytisch inaktiver PaIAP bei 37°C zeigen.

## 5.9 Die Funktionen von PaIAP und PaCLPP unterscheiden sich

Die Beobachtung, dass die Deletion der i-AAA Protease *Palap* und der CLPP-Proteaseuntereinheit *PaClpP* der CLPXP-Protease bei *P. anserina* zu teilweise sehr ähnlichen Phänotypen führt, warf die Frage auf, ob die beiden Proteasen möglicherweise übereinstimmende Funktionen in den Mitochondrien aufweisen. In beiden Fällen führt die Deletion einer Komponente der mitochondrialen Qualitätskontrolle bei 27°C zur Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina*, ohne vitale Funktionen zu beeinflussen (Fischer 2011).

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde durch Kreuzung des *Palap*- mit dem *PaClpP*-Deletionsstamm eine Doppelmutante hergestellt und charakterisiert (Abb. 35). Dabei zeigt sich, dass der Verlust von zwei Komponenten des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems bei 27°C auf M2-Festmedium

kein Problem für *P. anserina* darzustellen scheint, da weder die Myzelmorphologie noch die Wachstumsrate verändert sind (Abb. 38A). Vielmehr wird bei der Analyse der Lebensspanne sichtbar, dass sich die Effekte der Deletion von *Palap* und *PaClpP* addieren. Sowohl die mediane als auch die maximale Lebensspanne des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms sind verglichen mit den Lebensspannen des *Palap*- und des *PaClpP*-Deletionsstamms deutlich verlängert (Abb. 36). Dies zeigt, dass die zellulären Aufgaben von PaIAP und PaCLPP nicht übereinstimmen, sondern beide zur Lebensverlängerung beitragen. So wäre es denkbar gewesen, dass PaIAP z.B. an der Translokation eines Proteins beteiligt ist, während PaCLPP für dessen Abbau verantwortlich ist. Das Verhalten des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei Hitze bestätigt die unterschiedlichen Funktionen der beiden Proteasen. So sind sowohl die mediane Lebensspanne des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms als auch dessen Wachstumsrate deutlich reduziert verglichen mit dem Wildstamm (Abb. 37 und Abb. 38B). Während PaIAP an der Hitzestressantwort von *P. anserina* beteiligt ist, konnte dies für PaCLPP bisher nicht direkt gezeigt werden. Jedoch ist der *PaClpP*-Deletionsstamm tendenziell hitzesensitiver als der Wildstamm (Fischer 2011), sodass der Verlust beider Proteasen größere Auswirkungen auf *P. anserina* hat.

Während der Verlust von *Palap* zu einer deutlichen Veränderung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette von *P. anserina* führt (Abb. 22), konnte in vergleichenden Analysen des mitochondrialen Proteoms von Wild- und  $\Delta PaClpP$ -Stämmen gezeigt werden, dass die Mengen von PaCOX4 und PaCOX6 von Komplex IV durch die Abwesenheit von PaCLPP beeinflusst werden (persönliche Kommunikation K. Luce, AK Osiewacz). Deshalb wurden die Atmungskettenkomplexe des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms analysiert (Abb. 39). Dabei ist jedoch nur die Menge des freien Komplex I-Monomers signifikant reduziert, während sich die Mengen der anderen Komplexe nicht von denen des Wildstamms unterscheiden. Dabei wird jedoch erneut die Bedeutung des Anzuchtmediums deutlich (vgl. 5.7), da sich auch die Komplexmengen der aus CM-Flüssigmedium isolierten Mitochondrien der *Palap*-Deletionsstämme nicht von denen der Wildstämme unterscheiden, wobei bei Anzucht auf M2-Festmedium deutliche Reorganisationen beobachtet werden können (Abb. 22). Demnach sollte auch der *Palap/PaClpP*-Deletionsstamm zur weiteren Charakterisierung auf M2-Festmedium angezogen werden.

Insgesamt ist die gleichzeitige Deletion von *Palap* und *PaClpP* in *P. anserina* möglich und sowohl unter Standard- als auch unter Stressbedingungen lebensfähig. Da sich die Effekte der beiden Einzeldelationen z.B. auf die Lebensspanne addieren, zeigt dies, dass die beiden Proteasen unterschiedliche Aufgaben in den Mitochondrien erfüllen.



(vgl. 5.6), oder (ii) der Verlust von PaIAP führt ähnlich wie bei *S. cerevisiae* zu einer Hochregulation der m-AAA Protease, die in *A. thaliana* an der Assemblierung und Stabilisierung der Atmungskettenkomplexe beteiligt ist (vgl. 1.4.1). Bei *S. cerevisiae* wird durch den Verlust von *Yme1* eine erhöhte Mitophagie ausgelöst (vgl. 1.4.2.1), was, falls dies auch auf den *Palap*-Deletionsstamm zutrifft, in Maßen ebenfalls hormetisch wirken könnte, da die Integrität der Mitochondrien sichergestellt wird (vgl. 5.2). Insgesamt führt dies bei 27°C zu einer Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina* ohne feststellbare Beeinträchtigungen (vgl. 4.1.4). Die verlängerte Lebensspanne beruht dabei auf dem Verlust der proteolytischen Aktivität von PaIAP (vgl. 5.8).

Die möglicherweise wichtigste Aufgabe von PaIAP bei *P. anserina* ist ihre Beteiligung an der Hitzestressantwort (vgl. 5.4). Der Verlust von PaIAP führt demnach vermutlich ähnlich wie beim Verlust von *Yme1* bei *S. cerevisiae* zu (i) vermindertem Abbau geschädigter Membranproteine, (ii) möglicherweise fehlender Chaperonaktivität zur Rückfaltung fehlgefalteter Proteine, und (iii) fehlenden Peptidsignalen zur Anpassung der Aktivität anderer Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle (z.B. PaHSP60 und/oder PaCLPP, m-AAA Protease; vgl. 5.5). Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen, dass die Organisation der freien Atmungskettenkomplexe in Superkomplexe bei Hitze anders als beim Wildstamm kaum weiter gesteigert werden kann, da diese bereits im Normalzustand reorganisiert sind (vgl. 4.1.9 und 5.6). Dies trägt zur erhöhten Hitzesensitivität des *Palap*-Deletionsstamms bei und spiegelt sich in einer reduzierten Lebensspanne und physiologischen Beeinträchtigungen wider (vgl. 4.1.5). Eine funktionsfähige i-AAA Protease ist demnach für *P. anserina* im natürlichen Umfeld unerlässlich.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die i-AAA Protease eine essenzielle Rolle für die mitochondriale Funktion spielt und den Alterungsprozess von *P. anserina* entscheidend beeinflusst. Dies wird vor allem bei Hitzestress deutlich, bei dem der Verlust der Protease gravierende Auswirkungen auf *P. anserina* hat. Darüber hinaus wurden erste Hinweise auf potenzielle Mechanismen identifiziert, wie PaIAP die Alterung beeinflusst.



## 6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Modulation der i-AAA Protease PalAP das Altern von *P. anserina* deutlich beeinflusst. Dabei wurden erste Hinweise auf Mechanismen gefunden, die eine wertvolle Grundlage für weitere Untersuchungen bilden. Dafür bieten sich folgende Analysen an:

1. Da bereits einige Befunde auf einen Zusammenhang zwischen der i-AAA Protease und dem mitochondrialen Lipid-Metabolismus hinweisen, sollte der bislang wenig beachtete Aspekt der Lipidzusammensetzung der mitochondrialen Membran und deren Folgen für die Organisation der Atmungskettenkomplexe des *Palap*-Deletionsstamms untersucht werden.
2. Zur Identifizierung von Substraten von PalAP, die zur Aufklärung des hitzesensitiven Phänotyps des *Palap*-Deletionsstamms beitragen, sollten vergleichende Analysen der mitochondrialen Proteome von hitzestresstem Myzel von Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durchgeführt werden. Die Stämme sollten dabei durchgängig auf M2-Festmedium angezogen werden.
3. Die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der i-AAA Protease und Mitophagie stellt ein weiteres wichtiges Experiment dar. Dabei könnte mit Hilfe der kürzlich entwickelten Stämme zur Analyse von Autophagie in *P. anserina* (Knuppertz 2012) untersucht werden, wie stark Autophagie/Mitophagie am Phänotyp des *Palap*-Deletionsstamms beteiligt ist. Die Mitophagierate könnte nach Kanki et al. (Kanki et al. 2009) durch die Messung der Autophagie-abhängigen Bildung von freiem GFP durch den Abbau eines mitochondrialen GFP-Fusionsproteins ermittelt werden.
4. Da noch völlig unklar ist, ob die Chaperonaktivität oder die proteolytische Funktion der i-AAA Protease für den hitzesensitiven Phänotyp des *Palap*-Deletionsstamms verantwortlich ist, ist die weitere Charakterisierung des Stamms *Palap\_E540Q* (und *Palap\_E540QG*), in dem das Gen einer proteolytisch inaktiven Form der i-AAA Protease exprimiert wird, von zentraler Bedeutung für die weiteren Experimente. Dies wird die Einschätzung der Bedeutung der Chaperonaktivität der i-AAA Protease und somit der Rückfaltung fehlgefalteter Proteine bzw. des proteolytischen Abbaus der geschädigten Proteine für *P. anserina* bei Hitze ermöglichen.
5. Die in den Mitochondrien des Stamms *Palap\_E540Q* enthaltene proteolytisch inaktive Protease PalAP<sup>E540Q</sup> kann darüber hinaus zur Anreicherung und Identifizierung von Substraten verwendet werden. Experimente in *S. cerevisiae* zeigten, dass die entsprechende Mutation bei *Yme1* dazu führt, dass YME1<sup>E541Q</sup> Substrate zwar binden, aber nicht mehr freisetzen kann (Gräf et al. 2007; Engmann 2009). Dazu könnte PalAP<sup>E540Q</sup> direkt aus dem Stamm *Palap\_E540Q* angereichert (Klanner

et al. 2001; Gräf et al. 2007) bzw. durch Einführung eines Hexahistidin-Markers aufgereinigt werden (Engmann 2009). Die Kenntnis der Substrate ermöglicht die Identifizierung von Mechanismen, durch die die i-AAA Protease das Altern reguliert.

## 7 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle der i-AAA Protease in *P. anserina*, besonders während des Alterns des Ascomyceten. Die dazu durchgeführten Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Unter Standardbedingungen ist der *Palap*-Deletionsstamm langlebiger als der Wildstamm, ohne feststellbare physiologische Beeinträchtigungen aufzuweisen. Dass dies auf den Verlust von *Palap* zurückzuführen ist, bestätigen die *Palap*-Revertantenstämme, in denen das Gen wieder eingeführt wurde, wodurch deren Lebensspanne wieder Wildtyp-artig ist. Dies zeigt, dass PaIAP zelluläre Prozesse beeinflusst, die die Lebensspanne kontrollieren.
2. Bei Hitzestress weist der *Palap*-Deletionsstamm dagegen eine höhere Hitzesensitivität auf als der Wildstamm, was sich in einer verkürzten Lebensspanne und der Störung vitaler Funktionen äußert. Dies deutet auf eine mögliche Rolle von PaIAP bei der Hitzestressantwort hin.
3. Im Einklang mit dem hitzesensitiven Phänotyp des *Palap*-Deletionsstamms konnte in mitochondrialen Extrakten des Wildtyps gezeigt werden, dass die Proteinmenge von PaIAP durch Hitzestress signifikant zunimmt. Gleichzeitig weisen mitochondriale Proteinextrakte von *Palap*-Deletionsstämmen nach Hitzestress signifikant geringere Mengen an PaHSP60 und PaCLPP auf, zwei weiteren Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle. Dies unterstreicht die Beteiligung von PaIAP an der Hitzestressantwort von *P. anserina*.
4. Darüber hinaus beeinflusst der Verlust von *Palap* die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette und führt bei 27°C zu einer vermehrten Organisation der Komplexe in stabilere Superkomplexe. Dieser Mechanismus wird beim Wildstamm erst nach Hitzestress beobachtet, wogegen der *Palap*-Deletionsstamm die Superkomplexmenge nicht mehr weiter steigern kann.
5. Die Genexpression von proteolytisch inaktiven Varianten von PaIAP (PaIAP<sup>E540Q</sup> bzw. PaIAP<sup>E540QG</sup>) kann den Phänotyp des *Palap*-Deletionsstamms bei 27°C nicht komplementieren und führt ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensspanne von *P. anserina*. Dies liefert wichtige Informationen über den Mechanismus wie PaIAP die Lebensspanne von *P. anserina* beeinflusst, da dazu die proteolytische Aktivität von PaIAP benötigt wird.
6. Darüber hinaus zeigt die Analyse des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms, dass sich die Mechanismen, wie PaIAP und PaCLPP die Lebensspanne von *P. anserina* beeinflussen, unterscheiden. Die unterschiedlichen zellulären Aufgaben werden auch bei Hitzestress deutlich, wovon der *Palap/PaClpP*-

Deletionsstamm noch stärker betroffen ist als durch die Deletion von *Palap* bzw. *PaClpP*. Dies verdeutlicht, dass sich die Effekte der Deletionen der beiden Gene addieren.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die i-AAA Protease PaIAP auch bei *P. anserina* wichtige zelluläre Funktionen besitzt, die sich auf den Alterungsprozess des Ascomyceten auswirken. Dabei war es möglich verschiedene neue Mechanismen zu identifizieren, wie die i-AAA Protease diese Funktionen ausübt. Dazu gehören z.B. der Einfluss der proteolytischen Aktivität auf die Lebensspanne, die durch die Abwesenheit der i-AAA Protease ausgelöste Reorganisation der Atmungskettenkomplexe in stabile Superkomplexe, und die Induktion der Hitzestressantwort durch PaIAP. Diese Befunde tragen zum besseren Verständnis der zellulären Funktion der i-AAA Protease bei und stellen einen entscheidenden Ausgangspunkt für weiterführende Analysen der bislang wenig verstandenen Aufgaben der Protease dar.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adam C, Picard M, Déquard-Chablat M, Sellem CH, Hermann-Le Denmat S & Contamine V (2012)** Biological roles of the *Podospora anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. *PLoS ONE* **7**, e38138.
- Aldridge JE, Horibe T & Hoogenraad NJ (2007)** Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS ONE* **2**, e874.
- Anand R, Langer T & Baker MJ (2012)** Proteolytic control of mitochondrial function and morphogenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.025.
- Arlt H, Steglich G, Perryman R, Guiard B, Neupert W & Langer T (1998)** The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J.* **17**, 4837–4847.
- Arlt H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W & Langer T (1996)** The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**, 875–885.
- Arnold I & Langer T (2002)** Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 89–96.
- Arnold I, Wagner-Ecker M, Ansorge W & Langer T (2006a)** Evidence for a novel mitochondria-to-nucleus signalling pathway in respiring cells lacking i-AAA protease and the ABC-transporter Mdl1. *Gene* **367**, 74–88.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J & Schwede T (2006b)** The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**, 195–201.
- Augustin S, Nolden M, Müller S, Hardt O, Arnold I & Langer T (2005)** Characterization of peptides released from mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 2691–2699.
- Baker BM & Haynes CM (2011)** Mitochondrial protein quality control during biogenesis and aging. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 254–261.
- Bandy B & Davison AJ (1990)** Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 523–539.
- Belcour L, Begel O, Mosse MO & Jamet-Vierny C (1981)** Mitochondrial DNA amplification in senescent cultures of *Podospora anserina*: Variability between the retained, amplified sequences. *Curr. Genet.* **3**, 13–21.
- Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Moraes CT, Murphy MP, Budinger GR & Chandel NS (2007)** The Qo site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxic signaling via reactive oxygen species production. *J. Cell Biol.* **177**, 1029–1036.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S & Voos W (2010)** The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* **10**, 1426–1443.
- Bieniossek C, Schalch T, Bumann M, Meister M, Meier R & Baumann U (2006)** The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 3066–3071.
- Birner R, Bürgermeister M, Schneiter R & Daum G (2001)** Roles of phosphatidylethanolamine and of its several biosynthetic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 997–1007.
- Birner R, Nebauer R, Schneiter R & Daum G (2003)** Synthetic lethal interaction of the mitochondrial phosphatidylethanolamine biosynthetic machinery with the prohibitin complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 370–383.
- Blum H, Beier H & Gross HJ (1987)** Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93–99.
- Bonn F, Tatsuta T, Petrunger C, Riemer J & Langer T (2011)** Presequence-dependent folding ensures MrpL32 processing by the m-AAA protease in mitochondria. *EMBO J.* **30**, 2545–2556.

- Borghouts C, Werner A, Elthon T & Osiewacz HD (2001)** Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 390–399.
- Bota DA & Davies KJ (2002)** Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat. Cell Biol.* **4**, 674–680.
- Brand MD (2010)** The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**, 466–472.
- Brandt U (2006)** Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 69–92.
- Brust D, Daum B, Breunig C, Hamann A, Kühlbrandt W & Osiewacz HD (2010)** Cyclophilin D links programmed cell death and organismal aging in *Podospora anserina*. *Aging Cell* **9**, 761–775.
- Cagnoli C, Mariotti C, Taroni F, Seri M, Brussino A, Michielotto C, Grisoli M, Di Bella D, Migone N, Gellera C, Di Donato S & Brusco A (2006)** SCA28, a novel form of autosomal dominant cerebellar ataxia on chromosome 18p11.22-q11.2. *Brain* **129**, 235–242.
- Campbell CL, Tanaka N, White KH & Thorsness PE (1994)** Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by *yme1* are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol. Biol. Cell* **5**, 899–905.
- Campbell CL & Thorsness PE (1998)** Escape of mitochondrial DNA to the nucleus in *yme1* yeast is mediated by vacuolar-dependent turnover of abnormal mitochondrial compartments. *J. Cell Sci.* **111**, 2455–2464.
- Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Dürr A, Fontaine B & Ballabio A (1998)** Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* **93**, 973–983.
- Chakravarti B, Seshi B, Ratanaprayul W, Dalal N, Lin L, Raval A & Chakravarti DN (2009)** Proteome profiling of aging in mouse models: differential expression of proteins involved in metabolism, transport, and stress response in kidney. *Proteomics* **9**, 580–597.
- Chen H & Chan DC (2009)** Mitochondrial dynamics - fusion, fission, movement, and mitophagy - in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R169–R176.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnfsky EJ (2003)** Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J. Biol. Chem.* **278**, 36027–36031.
- Chen Z, Seo JY, Kim YK, Lee SR, Kim KH, Cho KH, Eun HC & Chung JH (2004)** Heat modulation of tropoelastin, fibrillin-1, and matrix metalloproteinase-12 in human skin *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 70–78.
- Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L & De Strooper B (2006)** Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163–175.
- Claros MG & Vincens P (2004)** Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786.
- Claypool SM, Whited K, Srijumnong S, Han X & Koehler CM (2011)** Barth syndrome mutations that cause tafazzin complex lability. *J. Cell Biol.* **192**, 447–462.
- Coenen MJ, Smeitink JA, Smeets R, Trijbels FJ & van den Heuvel LP (2005)** Mutation detection in four candidate genes (OXA1L, MRS2L, YME1L and MIPEP) for combined deficiencies in the oxidative phosphorylation system. *J. Inherit. Metab. Dis.* **28**, 1091–1097.
- Coppola M, Pizzigoni A, Banfi S, Bassi MT, Casari G & Incerti B (2000)** Identification and characterization of YME1L1, a novel paraplegin-related gene. *Genomics* **66**, 48–54.
- Cummings DJ, Belcour L & Grandchamp C (1979)** Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* **171**, 239–250.
- David DC, Hauptmann S, Scherping I, Schuessel K, Keil U, Rizzu P, Ravid R, Dröse S, Brandt U, Müller WE, Eckert A & Götz J (2005)** Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **280**, 23802–23814.

- Davidson JF & Schiestl RH (2001)** Mitochondrial respiratory electron carriers are involved in oxidative stress during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8483–8489.
- Di Bella D, Lazzaro F, Brusco A, Plumari M, Battaglia G, Pastore A, Finardi A, Cagnoli C, Tempia F, Frontali M, Veneziano L, Sacco T, Boda E, Brussino A, Bonn F, Castellotti B, Baratta S, Mariotti C, Gellera C, Fracasso V, Magri S, Langer T, Plevani P, Di Donato S, Muzi-Falconi M & Taroni F (2010)** Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nature Genet.* **42**, 313–321.
- Dröse S & Brandt U (2012)** Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv. Exp. Med. Biol.* **748**, 145–169.
- Dunn CD, Lee MS, Spencer FA & Jensen RE (2006)** A genomewide screen for petite-negative yeast strains yields a new subunit of the i-AAA protease complex. *Mol. Biol. Cell* **17**, 213–226.
- Dunn CD, Tamura Y, Sesaki H & Jensen RE (2008)** Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex. *Mol. Biol. Cell* **19**, 5387–5397.
- Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T & Reichert AS (2007)** OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3582–3590.
- Ebersohn C & Eicker A (1997)** Determination of the coprophilous fungal fruit body successional phases and the delimitation of species association classes on dung substrates of African game animals. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 183–190.
- Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI & Langer T (2009)** Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* **187**, 1023–1036.
- Ellis S, Killender M & Anderson RL (2000)** Heat-induced alterations in the localization of HSP72 and HSP73 as measured by indirect immunohistochemistry and immunogold electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **48**, 321–331.
- Engmann T (2009)** Structural, physical and genetic interactions of the i-AAA protease Yme1 in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Da Silva C, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury J-M, Ségurens B, Poulain J, Anthouard V, Grossetete S, Khalili H, Coppin E, Déquard-Chablat M, Picard M, Contamine V, Arnaise S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V, Gautheret D, de Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Danchin EG, Henrissat B, Houry RE, Sainsard-Chanet A, Boivin A, Pinan-Lucarré B, Sellem CH, Debuchy R, Wincker P, Weissenbach J & Silar P (2008)** The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol.* **9**, R77.
- Esser K & Tudzynski P (1980)** Senescence in fungi. in *Senescence in plants* (Thimann KV, ed.). Boca Raton: CRC Press, Vol II, 67–83.
- Esser K, Tursun B, Ingenhoven M, Michaelis G & Pratje E (2002)** A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* **323**, 835–843.
- Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y, Orr WC & Sohal RS (2005)** Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* **390**, 501–511.
- Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Gaeta L, Casari G, Ballabio A & Rugarli EI (2004)** Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J. Clin. Invest.* **113**, 231–242.
- Figge MT, Reichert AS, Meyer-Hermann M & Osiewacz HD (2012)** Deceleration of fusion-fission cycles improves mitochondrial quality control during aging. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002576.
- Fischer F (2011)** Untersuchungen zur Rolle der CLP-Proteasen bei Alterungsprozessen des Ascomyceten *Podospora anserina*. Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Fischer F, Hamann A & Osiewacz HD (2012)** Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem. Sci.* **37**, 284–292.

- Fiumera HL, Dunham MJ, Saracco SA, Butler CA, Kelly JA & Fox TD (2009)** Translocation and assembly of mitochondrially coded *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit Cox2 by Oxa1 and Yme1 in the absence of Cox18. *Genetics* **182**, 519–528.
- Francis BR & Thorsness PE (2011)** Hsp90 and mitochondrial proteases Yme1 and Yta10/12 participate in ATP synthase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion* **11**, 587–600.
- Francis BR, White KH & Thorsness PE (2007)** Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 127–144.
- Fukuda R, Zhang H, Kim JW, Shimoda L, Dang CV & Semenza GL (2007)** HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* **129**, 111–122.
- Galkin A & Brandt U (2005)** Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.* **280**, 30129–30135.
- Gardner PR (1997)** Superoxide-driven aconitase Fe-S center cycling. *Biosci. Rep.* **17**, 33–42.
- Gibala M, Kicia M, Sakamoto W, Gola EM, Kubrakiewicz J, Smakowska E & Janska H (2009)** The lack of mitochondrial AtFtsH4 protease alters Arabidopsis leaf morphology at the late stage of rosette development under short-day photoperiod. *Plant J.* **59**, 685–699.
- Gräf M (2006)** Mechanismen der Substraterkennung der mitochondrialen AAA-Protease Yme1 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation in der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Gräf M, Seewald G & Langer T (2007)** Substrate recognition by AAA+ ATPases: distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 2476–2485.
- Gredilla R, Grief J & Osiewacz HD (2006)** Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp. Gerontol.* **41**, 439–447.
- Grief J (2007)** Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation im Fachbereich Biowissenschaften, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Griparic L, Kanazawa T & van der Bliek AM (2007)** Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* **178**, 757–764.
- Guélin E, Rep M & Grivell LA (1994)** Sequence of the AFG3 gene encoding a new member of the FtsH/Yme1/Tma subfamily of the AAA-protein family. *Yeast* **10**, 1389–1394.
- Guélin E, Rep M & Grivell LA (1996)** Afg3p, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complex III, complex IV and complex V. *FEBS Lett.* **381**, 42–46.
- Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombès A, Belenguer P, Arnoult D & Rojo M (2008)** Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* **100**, 315–325.
- Guillon B, Bulteau AL, Wattenhofer-Donzé M, Schmucker S, Friguet B, Puccio H, Drapier JC & Bouton C (2009)** Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J.* **276**, 1036–1047.
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH & Aebersold R (1999)** Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.* **17**, 994–999.
- Halliwell B (1996)** Cellular stress and protection mechanisms. *Biochem. Soc. Transac.* **24**, 1023–1027.
- Hamann A, Krause K, Werner A & Osiewacz HD (2005)** A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* **48**, 270–275.
- Hansen J, Corydon TJ, Palmfeldt J, Dürr A, Fontaine B, Nielsen MN, Christensen JH, Gregersen N & Bross P (2008)** Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* **153**, 474–482.
- Hanson PI & Whiteheart SW (2005)** AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 519–529.

- Harman D (1956)** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**, 298–300.
- Harman D (1972)** Free radical theory of aging: dietary implications. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 839–843.
- Hayflick L (2007)** Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann. NY Acad. Sci.* **1100**, 1–13.
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y & Ron D (2007)** ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev. Cell* **13**, 467–480.
- Haynes CM, Yang Y, Blais SP, Neubert TA & Ron D (2010)** The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*. *Mol. Cell* **37**, 529–540.
- Holliday R (2006)** Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann. NY Acad. Sci.* **1067**, 1–9.
- Hori A, Yoshida M & Ling F (2011)** Mitochondrial fusion increases the mitochondrial DNA copy number in budding yeast. *Genes Cells* **16**, 527–544.
- Horibe T & Hoogenraad NJ (2007)** The chop gene contains an element for the positive regulation of the mitochondrial unfolded protein response. *PLoS ONE* **2**, e835.
- Juhola MK, Shah ZH, Grivell LA & Jacobs HT (2000)** The mitochondrial inner membrane AAA metalloprotease family in metazoans. *FEBS Lett.* **481**, 91–95.
- Jung C, Higgins CM & Xu Z (2000)** Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **286**, 214–223.
- Kambacheld M, Augustin S, Tatsuta T, Müller S & Langer T (2005)** Role of the novel metallopeptidase Mop112 and saccharolysin for the complete degradation of proteins residing in different subcompartments of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 20132–20139.
- Kanki T, Kang D & Klionsky DJ (2009)** Monitoring mitophagy in yeast: the Om45-GFP processing assay. *Autophagy* **5**, 1186–1189.
- Kerscher SJ, Okun JG & Brandt U (1999)** A single external enzyme confers alternative NADH:ubiquinone oxidoreductase activity in *Yarrowia lipolytica*. *J. Cell Sci.* **112**, 2347–2354.
- Kicia M, Gola EM & Janska H (2010)** Mitochondrial protease AtFtsH4 protects ageing Arabidopsis rosettes against oxidative damage under short-day photoperiod. *Plant Signal. Behav.* **5**, 126–128.
- Kieper N, Holmström KM, Ciceri D, Fiesel FC, Wolburg H, Ziviani E, Whitworth AJ, Martins LM, Kahle PJ & Krüger R (2010)** Modulation of mitochondrial function and morphology by interaction of Omi/HtrA2 with the mitochondrial fusion factor OPA1. *Exp. Cell Res.* **316**, 1213–1224.
- Kirkwood TB (2005)** Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**, 437–447.
- Kirkwood TB & Austad SN (2000)** Why do we age? *Nature* **408**, 233–238.
- Klanner C, Prokisch H & Langer T (2001)** MAP-1 and IAP-1, two novel AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces in mitochondrial inner membrane of *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* **12**, 2858–2869.
- Klenova EM, Nicolas RH, Sally U, Carne AF, Lee RE, Lobanenkov VV & Goodwin GH (1997)** Molecular weight abnormalities of the CTCF transcription factor: CTCF migrates aberrantly in SDS-PAGE and the size of the expressed protein is affected by the UTRs and sequences within the coding region of the CTCF gene. *Nucleic Acids Res.* **25**, 466–473.
- Knuppertz L (2012)** Untersuchungen zur Bedeutung von Autophagie in dem filamentösen Hyphenpilz *Podospira anserina*. Masterarbeit im Fachbereich Biowissenschaften, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Kolodziejczak M, Gibala M, Urantowka A & Janska H (2007)** The significance of Arabidopsis AAA proteases for activity and assembly/stability of mitochondrial OXPHOS complexes. *Physiol. Plant.* **129**, 135–142.
- Kominsky DJ, Brownson MP, Updike DL & Thorsness PE (2002)** Genetic and biochemical basis for viability of yeast lacking mitochondrial genomes. *Genetics* **162**, 1595–1604.

- Koppen M & Langer T (2007)** Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **42**, 221–242.
- Koppen M, Metodiev MD, Casari G, Rugarli E & Langer T (2007)** Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 758–767.
- Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA & Osiewacz HD (2004)** Supramolecular organization of cytochrome *c* oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26453–26461.
- Kremmidiotis G, Gardner AE, Settasatian C, Savoia A, Sutherland GR & Callen DF (2001)** Molecular and functional analyses of the human and mouse genes encoding AFG3L1, a mitochondrial metalloprotease homologous to the human spastic paraplegia protein. *Genomics* **76**, 58–65.
- Kück U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U & Esser K (1985)** The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospira anserina*. *Curr. Genet.* **9**, 373–382.
- Kunstmann B (2009)** Analyse differentiell-gebildeter mitochondrialer Proteine während des Alterns in dem filamentösen Ascomyceten *Podospira anserina* und Charakterisierung der O-Methyltransferase PaMTH1. Dissertation im Fachbereich Biowissenschaften, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Kunstmann B & Osiewacz HD (2008)** Over-expression of an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase leads to an extended lifespan of *Podospira anserina* without impairments in vital functions. *Aging Cell* **7**, 651–662.
- Kushnareva Y, Murphy AN & Andreyev A (2002)** Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome *c* and NAD(P)<sup>+</sup> oxidation-reduction state. *Biochem. J.* **368**, 545–553.
- Kusssmaul L & Hirst J (2006)** The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 7607–7612.
- Lamb DC, Kelly DE, Manning NJ, Kaderbhai MA & Kelly SL (1999)** Biodiversity of the P450 catalytic cycle: yeast cytochrome *b<sub>5</sub>*/NADH cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase complex efficiently drives the entire sterol 14-demethylation (CYP51) reaction. *FEBS Lett.* **462**, 283–288.
- Langer T (2000)** AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 247–251.
- Lapointe J & Hekimi S (2010)** When a theory of aging ages badly. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1–8.
- Larkin M, Blackshields G, Brown N, Chenna R, McGettigan P, McWilliam H, Valentin F, Wallace I, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG (2007)** Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947–2948.
- Lascaris R, Bussemaker HJ, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L & Blom J (2003)** Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* **4**, R3.
- Lecellier G & Silar P (1994)** Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* **25**, 122–123.
- Lee S, Augustin S, Tatsuta T, Gerdes F, Langer T & Tsai FT (2011)** Electron cryomicroscopy structure of a membrane-anchored mitochondrial AAA protease. *J. Biol. Chem.* **286**, 4404–4411.
- Lee YJ & Wickner RB (1992)** AFG1, a new member of the SEC18-NSF, PAS1, CDC48-VCP, TBP family of ATPases. *Yeast* **8**, 787–790.
- Lemaire C, Hamel P, Velours J & Dujardin G (2000)** Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F<sub>o</sub>-ATPase subunit accumulation in an *oxa1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 23471–23475.
- Leonhard K, Guiard B, Pellicchia G, Tzagoloff A, Neupert W & Langer T (2000)** Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria: extraction of substrates from either membrane surface. *Mol. Cell* **5**, 629–638.
- Leonhard K, Herrmann J, Stuart R, Mannhaupt G, Neupert W & Langer T (1996)** AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *EMBO J.* **15**, 4218–4229.

- Leonhard K, Stiegler A, Neupert W & Langer T (1999)** Chaperone-like activity of the AAA domain of the yeast Yme1 AAA protease. *Nature* **398**, 348–351.
- Levchenko I, Luo L & Baker TA (1995)** Disassembly of the Mu transposase tetramer by the ClpX chaperone. *Genes Dev.* **9**, 2399–2408.
- Levine RL (2002)** Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 790–796.
- Lilley BN, Tortorella D & Ploegh HL (2003)** Dislocation of a type I membrane protein requires interactions between membrane-spanning segments within the lipid bilayer. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3690–3698.
- Lombardi A, Silvestri E, Cioffi F, Senese R, Lanni A, Goglia F, de Lange P & Moreno M (2009)** Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach. *J. Proteomics* **72**, 708–721.
- Luce K & Osiewacz HD (2009)** Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat. Cell Biol.* **11**, 852–858.
- Lupas AN & Martin J (2002)** AAA proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**, 746–753.
- Majeran W, Wollman FA & Vallon O (2000)** Evidence for a role of ClpP in the degradation of the chloroplast cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex. *Plant Cell* **12**, 137–150.
- Major T, von Janowsky B, Ruppert T, Mogk A & Voos W (2006)** Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease Pim1. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 762–776.
- Malagnac F, Lalucque H, Lepère G & Silar P (2004)** Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 982–997.
- Maltecca F, Aghaie A, Schroeder DG, Cassina L, Taylor BA, Phillips SJ, Malaguti M, Previtali S, Guénet JL, Quattrini A, Cox GA & Casari G (2008)** The mitochondrial protease AFG3L2 is essential for axonal development. *J. Neurosci.* **28**, 2827–2836.
- Manczak M, Jung Y, Park BS, Partovi D & Reddy PH (2005)** Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome *c* in aging. *J. Neurochem.* **92**, 494–504.
- Martelli A, Wattenhofer-Donzé M, Schmucker S, Bouvet S, Reutenauer L & Puccio H (2007)** Frataxin is essential for extramitochondrial Fe-S cluster proteins in mammalian tissues. *Hum. Mol. Genet.* **16**, 2651–2658.
- Martinelli P & Rugarli EI (2010)** Emerging roles of mitochondrial proteases in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1–10.
- Matsushita K, Ohnishi T & Kaback HR (1987)** NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry* **26**, 7732–7737.
- Medvedev ZA (1990)** An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **65**, 375–398.
- Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun AS, Zastawny TH, Dizdaroglu M, Goodman SI, Huang TT, Mizioro H, Epstein CJ & Wallace DC (1999)** Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 846–851.
- Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT & Winterbourn CC (2011)** Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* **13**, 361–366.
- Nakai T, Yasuhara T, Fujiki Y & Ohashi A (1995)** Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome *c* oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4441–4452.
- Nebauer R, Schuiki I, Kulterer B, Trajanoski Z & Daum G (2007)** The phosphatidylethanolamine level of yeast mitochondria is affected by the mitochondrial components Oxa1p and Yme1p. *FEBS J.* **274**, 6180–6190.

- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL & Koonin EV (1999)** AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27–43.
- Nolden M, Ehses S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI & Langer T (2005)** The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* **123**, 277–289.
- Osiewacz HD (2002)** Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 755–764.
- Osiewacz HD, Brust D, Hamann A, Kunstmann B, Luce K, Müller-Ohldach M, Scheckhuber CQ, Servos J & Strobel I (2010)** Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann. NY Acad. Sci.* **1197**, 54–66.
- Osiewacz HD & Esser K (1984)** The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr. Genet.* **8**, 299–305.
- Page EH & Shear NH (1988)** Temperature-dependent skin disorders. *J. Am. Acad. Dermatol.* **18**, 1003–1019.
- Pajic A, Tauer R, Feldmann H, Neupert W & Langer T (1994)** Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria. *FEBS Lett.* **353**, 201–206.
- Palermo V, Falcone C & Mazzone C (2007)** Apoptosis and aging in mitochondrial morphology mutants of *S. cerevisiae*. *Folia Microbiol.* **52**, 479–483.
- Park H, Han S, Oh S & Kang H (2005)** Cellular responses to mild heat stress. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 10–23.
- Paul MF & Tzagoloff A (1995)** Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit  $F_1$ -ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **373**, 66–70.
- Pearce DA & Sherman F (1995)** Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome c and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J. Biol. Chem.* **270**, 20879–20882.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC & Ferrin TE (2004)** UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.
- Pfaffl MW (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45–e45.
- Pfeiffer K, Gohil V, Stuart RA, Hunte C, Brandt U, Greenberg ML & Schägger H (2003)** Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **278**, 52873–52880.
- Piechota J, Kolodziejczak M, Juszczak I, Sakamoto W & Janska H (2010)** Identification and characterization of high molecular weight complexes formed by matrix AAA proteases and prohibitins in mitochondria of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **285**, 12512–12521.
- Potting C, Wilmes C, Engmann T, Osman C & Langer T (2010)** Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J.* **29**, 2888–2898.
- Puccio H & Køenig M (2002)** Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**, 272–277.
- Pugh L, Corbett J & Johnson R (1967)** Rectal temperatures, weight losses, and sweat rates in marathon running. *J. Appl. Physiol.* **23**, 347–352.
- Pulverer BJ, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E & Woodgett JR (1991)** Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* **353**, 670–674.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH & van den Hondel CA (1987)** Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* **56**, 117–124.
- Rainey RN, Glavin JD, Chen HW, French SW, Teitell MA & Koehler CM (2006)** A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 8488–8497.
- Rais I, Karas M & Schägger H (2004)** Two-dimensional electrophoresis for the isolation of integral membrane proteins and mass spectrometric identification. *Proteomics* **4**, 2567–2571.

- Rattan SI (2001)** Applying hormesis in aging research and therapy. *Hum. Exp. Toxicol.* **20**, 281–285.
- Rawlings ND & Barrett AJ (1993)** Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290**, 205–218.
- Rep M, van Dijk JM, Suda K, Schatz G, Grivell LA & Suzuki CK (1996)** Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon. *Science* **274**, 103–106.
- Rizet G (1953)** Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative interrompue et illimitée de l'ascomycète *Podospora anserina*. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **237**, 838–840.
- Roberts DL, Frerman FE & Kim JJ (1996)** Three-dimensional structure of human electron transfer flavoprotein to 2.1-Å resolution. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14355–14360.
- Rugarli EI & Langer T (2006)** Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia. *Trends Mol. Med.* **12**, 262–269.
- Rugarli EI & Langer T (2012)** Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J.* **31**, 1336–1349.
- Schägger H, de Coo R, Bauer MF, Hofmann S, Godinot C & Brandt U (2004)** Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**, 36349–36353.
- Schägger H & Pfeiffer K (2000)** Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777–1783.
- Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T & Osiewacz HD (2007)** Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* **9**, 99–105.
- Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M & Ristow M (2007)** Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab.* **6**, 280–293.
- Sellem CH, Marsy S, Boivin A, Lemaire C & Sainsard-Chanet A (2007)** A mutation in the gene encoding cytochrome  $c_1$  leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* **44**, 648–658.
- Shah ZH, Hakkaart GA, Arku B, de Jong L, van der Spek H, Grivell LA & Jacobs HT (2000)** The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast *yme1* disruptant. *FEBS Lett.* **478**, 267–270.
- Sled VD & Vinogradov AD (1993)** Kinetics of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase interaction with hexammineruthenium(III). *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 262–268.
- Sohal RS & Sohal BH (1991)** Hydrogen peroxide release by mitochondria increases during aging. *Mech. Ageing Dev.* **57**, 187–202.
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C & Chan DC (2007)** OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* **178**, 749–755.
- Spiess C, Beil A & Ehrmann M (1999)** A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* **97**, 339–347.
- Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kück U & Esser K (1978)** Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* **162**, 341–343.
- Stahl U, Tudzynski P, Kück U & Esser K (1982)** Replication and expression of a bacterial-mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **79**, 3641–3645.
- Stahlberg H, Kutejová E, Suda K, Wolpensinger B, Lustig A, Schatz G, Engel A & Suzuki CK (1999)** Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 6787–6790.
- Steglich G, Neupert W & Langer T (1999)** Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3435–3442.

- Stiburek L, Cesnekova J, Kostkova O, Fornuskova D, Vinsova K, Wenchich L, Houstek J & Zeman J (2012)** YME1L controls the accumulation of respiratory chain subunits and is required for apoptotic resistance, cristae morphogenesis, and cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1010–1023.
- Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B & Schägger H (2004)** Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 5000–5007.
- Suzuki CK, Suda K, Wang N & Schatz G (1994)** Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**, 273–276.
- Tatsuta T (2009)** Protein quality control in mitochondria. *J. Biochem.* **146**, 455–461.
- Tatsuta T, Augustin S, Nolden M, Friedrichs B & Langer T (2007)** m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *EMBO J.* **26**, 325–335.
- Tatsuta T & Langer T (2008)** Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J.* **27**, 306–314.
- Tauer R, Mannhaupt G, Schnall R, Pajic A, Langer T & Feldmann H (1994)** Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function. *FEBS Lett.* **353**, 197–200.
- Thorsness PE & Fox TD (1993)** Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics* **134**, 21–28.
- Thorsness PE, White KH & Fox TD (1993)** Inactivation of *YME1*, a member of the *ftsH-SEC18-PAS1-CDC48* family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5418–5426.
- Tocilescu MA, Fendel U, Zwicker K, Kerscher S & Brandt U (2007)** Exploring the ubiquinone binding cavity of respiratory complex I. *J. Biol. Chem.* **282**, 29514–29520.
- Tolkovsky AM (2009)** Mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 1508–1515.
- Tomoyasu T, Yuki T, Morimura S, Mori H, Yamanaka K, Niki H, Hiraga S & Ogura T (1993)** The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control, and gene expression. *J. Bacteriol.* **175**, 1344–1351.
- Tudzynski P & Esser K (1977)** Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete *Podospira anserina*. *Mol. Gen. Genet.* **153**, 111–113.
- Tulapurkar ME, Asiegbu BE, Singh IS & Hasday JD (2009)** Hyperthermia in the febrile range induces HSP72 expression proportional to exposure temperature but not to HSF-1 DNA-binding activity in human lung epithelial A549 cells. *Cell Stress Chaperones* **14**, 499–508.
- Tzagoloff A, Yue J, Jang J & Paul MF (1994)** A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 26144–26151.
- UniProt Consortium (2012)** Reorganizing the protein space at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* **40**, D71–D75.
- Urantowka A, Knorpp C, Olczak T, Kolodziejczak M & Janska H (2005)** Plant mitochondria contain at least two i-AAA-like complexes. *Plant Mol. Biol.* **59**, 239–252.
- van Dyck L, Neupert W & Langer T (1998)** The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* **12**, 1515–1524.
- van Ham TJ, Thijssen KL, Breitling R, Hofstra RM, Plasterk RH & Nollen EA (2008)** *C. elegans* model identifies genetic modifiers of alpha-synuclein inclusion formation during aging. *PLoS Genet.* **4**, e1000027.
- Vanlerberghe GC & McIntosh L (1997)** Alternative oxidase: from gene to function. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 703–734.
- Wallace DC (1999)** Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482–1488.

- Wang J, Hartling JA & Flanagan JM (1997)** The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* **91**, 447–456.
- Weber ER, Hanekamp T & Thorsness PE (1996)** Biochemical and functional analysis of the YME1 gene product, an ATP and zinc-dependent mitochondrial protease from *S. cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **7**, 307–317.
- Weckmann K (2010)** Molekularbiologische Untersuchungen zur Regulation der LON-Protease von *Podospora anserina*. Diplomarbeit im Fachbereich Biowissenschaften, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Weil A, Luce K, Dröse S, Wittig I, Brandt U & Osiewacz HD (2011)** Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* **10**, 4280–4290.
- Wickner S, Maurizi MR & Gottesman S (1999)** Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**, 1888–1893.
- Wilson N, McArdle A, Guerin D, Tasker H, Wareing P, Foster CS, Jackson MJ & Rhodes LE (2000)** Hyperthermia to normal human skin *in vivo* upregulates heat shock proteins 27, 60, 72i and 90. *J. Cutan. Pathol.* **27**, 176–182.
- Wittig I, Braun HP & Schägger H (2006)** Blue native PAGE. *Nature Protoc.* **1**, 418–428.
- Young L, Leonhard K, Tatsuta T, Trowsdale J & Langer T (2001)** Role of the ABC transporter Mdl1 in peptide export from mitochondria. *Science* **291**, 2135–2138.
- Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT & Hoogenraad NJ (2002)** A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *EMBO J.* **21**, 4411–4419.
- Zinser E, Paltauf F & Daum G (1993)** Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.* **175**, 2853–2858.



## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	DNPH	2,4-Dinitrophenyl-Hydrazin
µl	Mikroliter	dNTPs	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphate
A	Adenin-Nukleotid	DQA	2-n-Decylchinazolin4-yl-amin
AAA	„ATPases associated with various cellular activities“	DTT	Dithiothreitol
ADP	Adenosindiphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AFG3	„ATPase family gene 3“	Em	molarer Extinktionskoeffizient
AFG3L2	„ATPase family gene 3-like 2“	et al.	et alii/et aliae/et alia
AmAc	Ammoniumacetat	FMN	Flavin
amp	Ampicillin	FRTA	freie Radikalthorie des Alterns
APS	Ammoniumpersulfat	FtsH/FtsH	„filamentous temperature sensitive H“
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	g	Gramm
ATP	Adenosinriphosphat	G	Guanin-Nukleotid
BMM	Biomalz-Mais-Medium	GFP	grün fluoreszierendes Protein
BNP	BN-PAGE	h	Stunde
Bp	Basenpaar	HAR	Hexamineruthenium(III)chlorid
BSA	bovines Serumalbumin	HEK	„human embryonic kidney“
bsd	Blasticidin	HeLa	Henrietta Lacks
bzw.	beziehungsweise	HIF-1	„hypoxia-inducible factor 1“
C	Cytosin-Nukleotid	hph	Hygromycin
CCP1	„Cytochrome c peroxidase 1“	Hs	<i>Homo sapiens</i>
cDNA	komplementäre DNA	HSP	hereditäre spastische Paraplegie
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propan-sulfonat	HSP60	Hitzeschockprotein 60
Clp/CLP	„caseinolytic protease“	HtrA2	„high temperature requirement protein A 2“
cm	Zentimeter	<i>lap-1/</i> IAP-1	i-AAA Protease 1
CM	„complete medium“	IEF	isoelektrische Fokussierung
COX	Cytochrom c-Oxidase	IPG	immobilisierte pH-Gradienten
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1.13,7]dekan}-4-yl)phenyl-Phosphat	kBp	Kilo-Basenpaar
d.h.	das heißt	kDa	Kilo-Dalton
DAB	Diaminobenzidin	l	Liter
DBQ	n-Decyl-Benzochinon	LB	„lysogeny broth“-Medium
DIG	Digoxigenin	LBA	„lysogeny broth“-Medium mit Ampicillin
DMF	Dimethylformamid	M	molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	M2	Medium 2
dNADH	deamino-Nikotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form	MALDI-MS	„matrix-assisted laser desorption/ionisation“-Massenspektrometrie
DNP	2,4-Dinitrophenyl-Hydrazon	MEF	„mouse embryonic fibroblast“

mg	Milligramm	SSC	Natriumsalzcitrat
min	Minute	STC	Sorbitol-Tris-Kalziumchlorid
ml	Milliliter	STET	Saccharose-Triton X 100-EDTA-Tris
mM	Millimolar	T	Thymin-Nukleotid
MPM1	„mitochondrial peculiar membrane protein 1“	TAE	Tris-Acetat-EDTA
MRFTA	mitochondriale freie Radikaltheorie des Alterns	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
mRNA	„messenger RNA“	TCEP	Tris(2-Chlorethyl)phosphat
mtDNA	mitochondriale DNA	TEMED	Tetramethylethylendiamin
n	Probenanzahl	TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid	TPS	Transformations-Phosphat-Saccharose-Puffer
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ng	Nanogramm	u.a.	unter anderem
nm	Nanometer	Units	µmol NADH/min
nM	Nanomolar	UpM	Umdrehungen pro Minute
OD	optische Dichte	UPR	„unfolded protein response“
OSD1	„cytochrome oxidase subunit degradation 1“	UPS1	„unprocessed 1“
p	„probability value“; Signifikanzwert	UV	Ultraviolett
Pa	<i>Podospora anserina</i>	V	Volt
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	v/v	„volume per volume“
PARL	„presenilins-associated rhomboid-like protein“	Vol.	Volumen
PBS	„phosphate buffered saline“	w/v	„weight per volume“
PCP1	„proteolytic processing of cytochrome c peroxidase 1“	WT	Wildtyp
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	<i>Yme1/</i>	„yeast mitochondrial DNA escape 1“
PDB	„protein data bank“	YME1	
PEG	Polyethylenglykol	<i>Yme1L/</i>	„Yme1-like 1“
pH	potential hydrogenii	YME1L	
PIM1	„proteolysis in mitochondria 1“	<i>Yta/YTA</i>	„yeast tat-binding analogs“
pIDNA	„plasmid like DNA“	z.B.	zum Beispiel
pmol	Picomol		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RCA1	„respiratory chain assembly 1“		
RNA	Ribonukleinsäure		
ROS	„reactive oxygen species“		
RT	Raumtemperatur		
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR		
s	Sekunde		
SDS	Natriumdodecylsulfat		
SHAM	Salizylhydroxaminsäure		
SOC	„super optimal broth“		
SPG	spastische Paraplegie		

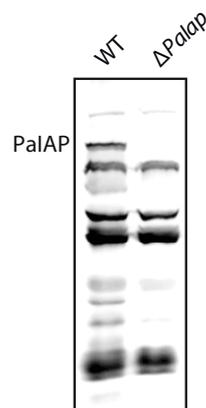
## 9.2 Abbildungen und Tabellen

PaIAP	1	-----MRNAPLAKLALET <span style="background-color: black; color: red;">S</span> QANV <span style="background-color: black; color: red;">S</span> TN <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">V</span> LS <span style="background-color: black; color: red;">T</span> MS <span style="background-color: black; color: red;">P</span> GS <span style="background-color: black; color: red;">I</span>
IAP-1	1	-----MSRQL
YME1	1	-----MN <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">K</span> IL <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">P</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> T <span style="background-color: black; color: red;">T</span> N <span style="background-color: black; color: red;">V</span> L <span style="background-color: black; color: red;">R</span> I <span style="background-color: black; color: red;">A</span> P <span style="background-color: black; color: red;">R</span> L <span style="background-color: black; color: red;">P</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L
YME1L	1	<span style="background-color: black; color: red;">M</span> F <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">T</span> V <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> P <span style="background-color: black; color: red;">V</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> P <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">H</span> L <span style="background-color: black; color: red;">I</span> N <span style="background-color: black; color: red;">A</span> F <span style="background-color: black; color: red;">H</span> T <span style="background-color: black; color: red;">P</span> K <span style="background-color: black; color: red;">N</span> T <span style="background-color: black; color: red;">S</span> V <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">S</span> G <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> <span style="background-color: black; color: red;">M</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">H</span> R <span style="background-color: black; color: red;">D</span> V <span style="background-color: black; color: red;">V</span> P <span style="background-color: black; color: red;">E</span> H <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">P</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">C</span> M <span style="background-color: black; color: red;">F</span> S <span style="background-color: black; color: red;">D</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> T <span style="background-color: black; color: red;">K</span> L <span style="background-color: black; color: red;">N</span> I <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S
MTS		
PaIAP	37	<span style="background-color: black; color: red;">A</span> M <span style="background-color: black; color: red;">A</span> N <span style="background-color: black; color: red;">P</span> L <span style="background-color: black; color: red;">I</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">H</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">M</span> A <span style="background-color: black; color: red;">R</span> R <span style="background-color: black; color: red;">P</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> P <span style="background-color: black; color: red;">G</span> L <span style="background-color: black; color: red;">F</span> F <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">T</span> R <span style="background-color: black; color: red;">E</span> P <span style="background-color: black; color: red;">I</span> R <span style="background-color: black; color: red;">M</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">S</span> V <span style="background-color: black; color: red;">S</span> W <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> D <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">P</span> E <span style="background-color: black; color: red;">R</span> N <span style="background-color: black; color: red;">V</span> O <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">G</span> N <span style="background-color: black; color: red;">S</span> N <span style="background-color: black; color: red;">L</span> V <span style="background-color: black; color: red;">P</span> E
IAP-1	6	<span style="background-color: black; color: red;">A</span> M <span style="background-color: black; color: red;">A</span> N <span style="background-color: black; color: red;">P</span> L <span style="background-color: black; color: red;">F</span> R <span style="background-color: black; color: red;">R</span> S <span style="background-color: black; color: red;">F</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> -- <span style="background-color: black; color: red;">P</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> N <span style="background-color: black; color: red;">T</span> L <span style="background-color: black; color: red;">R</span> S <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">T</span> H <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> E <span style="background-color: black; color: red;">G</span> R <span style="background-color: black; color: red;">I</span> P <span style="background-color: black; color: red;">S</span> F <span style="background-color: black; color: red;">F</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">V</span> H <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">L</span> G <span style="background-color: black; color: red;">F</span> T <span style="background-color: black; color: red;">---</span> <span style="background-color: black; color: red;">L</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">V</span> E <span style="background-color: black; color: red;">S</span> F <span style="background-color: black; color: red;">G</span> N <span style="background-color: black; color: red;">G</span> G <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">-</span> H
YME1	32	<span style="background-color: black; color: red;">L</span> V <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> K <span style="background-color: black; color: red;">W</span> A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> K <span style="background-color: black; color: red;">K</span> F <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> R <span style="background-color: black; color: red;">F</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">K</span> N <span style="background-color: black; color: red;">S</span> G <span style="background-color: black; color: red;">E</span> M <span style="background-color: black; color: red;">P</span> P <span style="background-color: black; color: red;">K</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> D <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">N</span> K <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">I</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> I <span style="background-color: black; color: red;">D</span> N <span style="background-color: black; color: red;">S</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">P</span> P <span style="background-color: black; color: red;">P</span> S <span style="background-color: black; color: red;">N</span> T <span style="background-color: black; color: red;">N</span> D <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">K</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">A</span> N <span style="background-color: black; color: red;">V</span> A <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">H</span>
YME1L	71	I <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> F <span style="background-color: black; color: red;">E</span> G <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> M <span style="background-color: black; color: red;">F</span> M <span style="background-color: black; color: red;">E</span> P <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K <span style="background-color: black; color: red;">R</span> M <span style="background-color: black; color: red;">K</span> K <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">D</span> T <span style="background-color: black; color: red;">I</span> D <span style="background-color: black; color: red;">N</span> W <span style="background-color: black; color: red;">H</span> I <span style="background-color: black; color: red;">R</span> E <span style="background-color: black; color: red;">P</span> F <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">S</span> I <span style="background-color: black; color: red;">P</span> S <span style="background-color: black; color: red;">L</span> N <span style="background-color: black; color: red;">L</span> R <span style="background-color: black; color: red;">D</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> L <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">L</span> K <span style="background-color: black; color: red;">I</span> G <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> I <span style="background-color: black; color: red;">D</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">L</span> V <span style="background-color: black; color: red;">E</span> N <span style="background-color: black; color: red;">L</span> P
PaIAP	107	<span style="background-color: black; color: red;">H</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">R</span> T <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> E <span style="background-color: black; color: red;">N</span> P <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> P <span style="background-color: black; color: red;">T</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">F</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">K</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> P <span style="background-color: black; color: red;">A</span> I <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">E</span> R <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">S</span> G <span style="background-color: black; color: red;">R</span> F <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> E <span style="background-color: black; color: red;">S</span> A <span style="background-color: black; color: red;">T</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">A</span> N <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> A <span style="background-color: black; color: red;">M</span> I <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">T</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G
IAP-1	71	N <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> O <span style="background-color: black; color: red;">F</span> P <span style="background-color: black; color: red;">T</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">A</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> A <span style="background-color: black; color: red;">F</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">K</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> P <span style="background-color: black; color: red;">A</span> I <span style="background-color: black; color: red;">I</span> E <span style="background-color: black; color: red;">R</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> R <span style="background-color: black; color: red;">F</span> A <span style="background-color: black; color: red;">N</span> E <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> O <span style="background-color: black; color: red;">T</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> A <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> P <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> T <span style="background-color: black; color: red;">P</span> A
YME1	102	A <span style="background-color: black; color: red;">M</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> T <span style="background-color: black; color: red;">R</span> E <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> N <span style="background-color: black; color: red;">K</span> D <span style="background-color: black; color: red;">L</span> T <span style="background-color: black; color: red;">S</span> P <span style="background-color: black; color: red;">D</span> A <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> F <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">N</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">P</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> V <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">R</span> E <span style="background-color: black; color: red;">L</span> P <span style="background-color: black; color: red;">G</span> I <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> P <span style="background-color: black; color: red;">E</span> C <span style="background-color: black; color: red;">M</span> E <span style="background-color: black; color: red;">L</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">M</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> R <span style="background-color: black; color: red;">I</span> C <span style="background-color: black; color: red;">R</span> H <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> D
YME1L	141	G <span style="background-color: black; color: red;">F</span> C <span style="background-color: black; color: red;">K</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> N <span style="background-color: black; color: red;">I</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> H <span style="background-color: black; color: red;">W</span> H <span style="background-color: black; color: red;">T</span> S <span style="background-color: black; color: red;">H</span> V <span style="background-color: black; color: red;">S</span> A <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> S <span style="background-color: black; color: red;">F</span> E <span style="background-color: black; color: red;">N</span> K <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> G <span style="background-color: black; color: red;">N</span> L <span style="background-color: black; color: red;">D</span> I <span style="background-color: black; color: red;">F</span> S <span style="background-color: black; color: red;">T</span> R <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">C</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> R <span style="background-color: black; color: red;">H</span> S <span style="background-color: black; color: red;">R</span> A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">S</span> I <span style="background-color: black; color: red;">C</span> S <span style="background-color: black; color: red;">D</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">W</span> P <span style="background-color: black; color: red;">F</span> I <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> I <span style="background-color: black; color: red;">S</span> R <span style="background-color: black; color: red;">G</span> F <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T
PaIAP	177	-----Q <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">I</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">I</span> A <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> N <span style="background-color: black; color: red;">G</span> G <span style="background-color: black; color: red;">N</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> M <span style="background-color: black; color: red;">S</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">--</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> C <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">H</span> V <span style="background-color: black; color: red;">I</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">S</span> F <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">F</span> R <span style="background-color: black; color: red;">-----</span>
IAP-1	141	N <span style="background-color: black; color: red;">N</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> D <span style="background-color: black; color: red;">N</span> N <span style="background-color: black; color: red;">G</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">H</span> P <span style="background-color: black; color: red;">S</span> G <span style="background-color: black; color: red;">F</span> T <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> I <span style="background-color: black; color: red;">H</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> I <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> A <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> H <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">G</span> N <span style="background-color: black; color: red;">M</span> A <span style="background-color: black; color: red;">M</span> V <span style="background-color: black; color: red;">K</span> P <span style="background-color: black; color: red;">I</span> A <span style="background-color: black; color: red;">R</span> G <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">P</span> L <span style="background-color: black; color: red;">H</span> I <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">S</span> F <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">A</span> L <span style="background-color: black; color: red;">R</span> <span style="background-color: black; color: red;">-----</span>
YME1	172	V <span style="background-color: black; color: red;">R</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">N</span> <span style="background-color: black; color: red;">---</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> T <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">V</span> N <span style="background-color: black; color: red;">P</span> S <span style="background-color: black; color: red;">L</span> A <span style="background-color: black; color: red;">S</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> N <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">H</span> G <span style="background-color: black; color: red;">N</span> F <span style="background-color: black; color: red;">P</span> S <span style="background-color: black; color: red;">M</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">S</span> P <span style="background-color: black; color: red;">L</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">R</span> K <span style="background-color: black; color: red;">E</span> P <span style="background-color: black; color: red;">L</span> H <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> <span style="background-color: black; color: red;">S</span> T <span style="background-color: black; color: red;">F</span> T <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">-----</span>
YME1L	211	L <span style="background-color: black; color: red;">K</span> S <span style="background-color: black; color: red;">R</span> T <span style="background-color: black; color: red;">R</span> R <span style="background-color: black; color: red;">L</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">S</span> T <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">R</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> E <span style="background-color: black; color: red;">T</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">N</span> I <span style="background-color: black; color: red;">A</span> P <span style="background-color: black; color: red;">S</span> F <span style="background-color: black; color: red;">V</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">R</span> D <span style="background-color: black; color: red;">R</span> G <span style="background-color: black; color: red;">S</span> D <span style="background-color: black; color: red;">V</span> E <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">D</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> M <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">K</span> N <span style="background-color: black; color: red;">I</span> P <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">H</span> Q <span style="background-color: black; color: red;">D</span> A <span style="background-color: black; color: red;">F</span> K <span style="background-color: black; color: red;">I</span> C <span style="background-color: black; color: red;">G</span> F <span style="background-color: black; color: red;">A</span> E <span style="background-color: black; color: red;">G</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> K <span style="background-color: black; color: red;">A</span> Q
TM		
PaIAP	230	-----W <span style="background-color: black; color: red;">E</span> K <span style="background-color: black; color: red;">F</span> M <span style="background-color: black; color: red;">L</span> W <span style="background-color: black; color: red;">E</span> S <span style="background-color: black; color: red;">L</span> C <span style="background-color: black; color: red;">A</span> F <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">L</span> V <span style="background-color: black; color: red;">V</span> M <span style="background-color: black; color: red;">T</span> M <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">E</span> I <span style="background-color: black; color: red;">V</span> S <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">K</span> R <span style="background-color: black; color: red;">P</span> G <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K <span style="background-color: black; color: red;">V</span> D <span style="background-color: black; color: red;">T</span> M <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span> A <span style="background-color: black; color: red;">E</span> N <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">R</span> F <span style="background-color: black; color: red;">S</span> D <span style="background-color: black; color: red;">V</span> H <span style="background-color: black; color: red;">G</span> C <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K
IAP-1	205	-----W <span style="background-color: black; color: red;">V</span> K <span style="background-color: black; color: red;">F</span> L <span style="background-color: black; color: red;">M</span> W <span style="background-color: black; color: red;">E</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> F <span style="background-color: black; color: red;">T</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">M</span> V <span style="background-color: black; color: red;">V</span> I <span style="background-color: black; color: red;">T</span> M <span style="background-color: black; color: red;">V</span> F <span style="background-color: black; color: red;">E</span> G <span style="background-color: black; color: red;">L</span> S <span style="background-color: black; color: red;">I</span> K <span style="background-color: black; color: red;">R</span> P <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> V <span style="background-color: black; color: red;">K</span> P <span style="background-color: black; color: red;">E</span> N <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> A <span style="background-color: black; color: red;">R</span> F <span style="background-color: black; color: red;">S</span> D <span style="background-color: black; color: red;">V</span> H <span style="background-color: black; color: red;">G</span> C <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K
YME1	233	-----W <span style="background-color: black; color: red;">V</span> K <span style="background-color: black; color: red;">W</span> L <span style="background-color: black; color: red;">V</span> E <span style="background-color: black; color: red;">G</span> I <span style="background-color: black; color: red;">L</span> T <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> S <span style="background-color: black; color: red;">F</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> G <span style="background-color: black; color: red;">F</span> K <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> I <span style="background-color: black; color: red;">T</span> E <span style="background-color: black; color: red;">N</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">K</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> D <span style="background-color: black; color: red;">K</span> S <span style="background-color: black; color: red;">V</span> D <span style="background-color: black; color: red;">V</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">N</span> <span style="background-color: black; color: red;">--</span> V <span style="background-color: black; color: red;">F</span> D <span style="background-color: black; color: red;">V</span> C <span style="background-color: black; color: red;">G</span> C <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R
YME1L	281	A <span style="background-color: black; color: red;">L</span> T <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> T <span style="background-color: black; color: red;">N</span> D <span style="background-color: black; color: red;">S</span> L <span style="background-color: black; color: red;">R</span> R <span style="background-color: black; color: red;">T</span> <span style="background-color: black; color: red;">R</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">V</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">F</span> G <span style="background-color: black; color: red;">I</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">G</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> K <span style="background-color: black; color: red;">N</span> P <span style="background-color: black; color: red;">F</span> L <span style="background-color: black; color: red;">S</span> V <span style="background-color: black; color: red;">R</span> F <span style="background-color: black; color: red;">R</span> T <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">L</span> D <span style="background-color: black; color: red;">S</span> A <span style="background-color: black; color: red;">V</span> D <span style="background-color: black; color: red;">P</span> V <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> M <span style="background-color: black; color: red;">K</span> N <span style="background-color: black; color: red;">--</span> V <span style="background-color: black; color: red;">T</span> F <span style="background-color: black; color: red;">E</span> H <span style="background-color: black; color: red;">V</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span>
WA		
PaIAP	290	E <span style="background-color: black; color: red;">E</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> E <span style="background-color: black; color: red;">L</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> N <span style="background-color: black; color: red;">P</span> D <span style="background-color: black; color: red;">K</span> E <span style="background-color: black; color: red;">N</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> G <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> P <span style="background-color: black; color: red;">K</span> G <span style="background-color: black; color: red;">V</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> <span style="background-color: black; color: red;">G</span> P <span style="background-color: black; color: red;">P</span> G <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R <span style="background-color: black; color: red;">A</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">P</span> F <span style="background-color: black; color: red;">F</span> F <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> F <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">I</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span>
IAP-1	265	E <span style="background-color: black; color: red;">E</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> E <span style="background-color: black; color: red;">L</span> I <span style="background-color: black; color: red;">D</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> N <span style="background-color: black; color: red;">P</span> E <span style="background-color: black; color: red;">K</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">S</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> G <span style="background-color: black; color: red;">G</span> K <span style="background-color: black; color: red;">L</span> P <span style="background-color: black; color: red;">K</span> G <span style="background-color: black; color: red;">V</span> L <span style="background-color: black; color: red;">L</span> <span style="background-color: black; color: red;">G</span> P <span style="background-color: black; color: red;">P</span> G <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R <span style="background-color: black; color: red;">A</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">P</span> F <span style="background-color: black; color: red;">F</span> F <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> F <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">V</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span>
YME1	291	A <span style="background-color: black; color: red;">E</span> L <span style="background-color: black; color: red;">E</span> F <span style="background-color: black; color: red;">I</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> F <span style="background-color: black; color: red;">L</span> K <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">P</span> T <span style="background-color: black; color: red;">K</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">E</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> L <span style="background-color: black; color: red;">P</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> P <span style="background-color: black; color: red;">P</span> G <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R <span style="background-color: black; color: red;">A</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">D</span> F <span style="background-color: black; color: red;">F</span> F <span style="background-color: black; color: red;">M</span> S <span style="background-color: black; color: red;">G</span> S <span style="background-color: black; color: red;">E</span> F <span style="background-color: black; color: red;">D</span> E <span style="background-color: black; color: red;">V</span> Y <span style="background-color: black; color: red;">V</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">K</span>
YME1L	349	Q <span style="background-color: black; color: red;">E</span> L <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> E <span style="background-color: black; color: red;">V</span> E <span style="background-color: black; color: red;">F</span> L <span style="background-color: black; color: red;">N</span> P <span style="background-color: black; color: red;">Q</span> K <span style="background-color: black; color: red;">F</span> T <span style="background-color: black; color: red;">I</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> L <span style="background-color: black; color: red;">P</span> K <span style="background-color: black; color: red;">G</span> I <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">G</span> P <span style="background-color: black; color: red;">P</span> G <span style="background-color: black; color: red;">T</span> G <span style="background-color: black; color: red;">K</span> T <span style="background-color: black; color: red;">L</span> L <span style="background-color: black; color: red;">A</span> R <span style="background-color: black; color: red;">A</span> V <span style="background-color: black; color: red;">A</span> G <span style="background-color: black; color: red;">E</span> A <span style="background-color: black; color: red;">D</span> V <span style="background-color: black; color: red;">P</span> F <span style="background-color: black; color: red;">Y</span> A <span style="background-color: black; color: red;">S</span> G <span style="background-color: black; color: red;">S</span> E <span style="background-color: black; color: red;">F</span> D <span style="background-color: black; color: red;">E</span> M <span style="background-color: black; color: red;">F</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> V <span style="background-color: black; color: red;">G</span> A <span style="background-color: black; color: red;">S</span>
WB		
PaIAP	360	R <span style="background-color: black; color: red;">V</span> R <span style="background-color: black; color: red;">L</span> E <span style="background-color: black; color: red;">N</span> A <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K <span style="background-color: black; color: red;">A</span> K <span style="background-color: black; color: red;">S</span> P <span style="background-color: black; color: red;">S</span> I <span style="background-color: black; color: red;"></span>

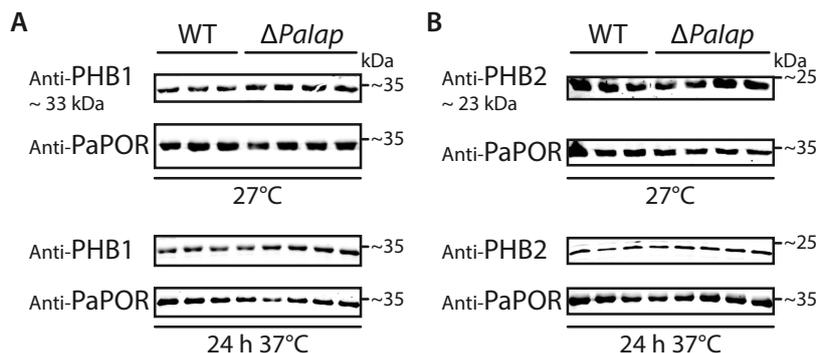
bindende Motiv (MB) mit der Konsensussequenz HExxH (Rawlings & Barrett 1995) ist ebenfalls markiert. Die eingezeichneten Bereiche der transmembranen Domänen (TM) entsprechen den in Hydrophobizitätsprofilen vorhergesagten Regionen (Abb. 6). Die mitochondrialen Signalsequenzen wurden mit dem Programm ‚MitoProtII‘ bestimmt. Bei IAP-1 und YME1 entsprechen die transmembranen Domänen, die konservierten Bereiche der AAA-Domäne und das Metall-bindende Motiv den Angaben von Klanner *et al.* (Klanner *et al.* 2001; modifiziert nach Weil *et al.* 2011).

**Tabelle 22: Identifizierungsnummern der i-AAA Proteasen aus den verschiedenen Organismen aus Abb. 7.** Für die i-AAA Proteasen aus *Apis mellifera* und *Gibberella zeae* sind die MEROPS-Nummern angegeben, für alle anderen die ‚UniProt‘-Nummern.

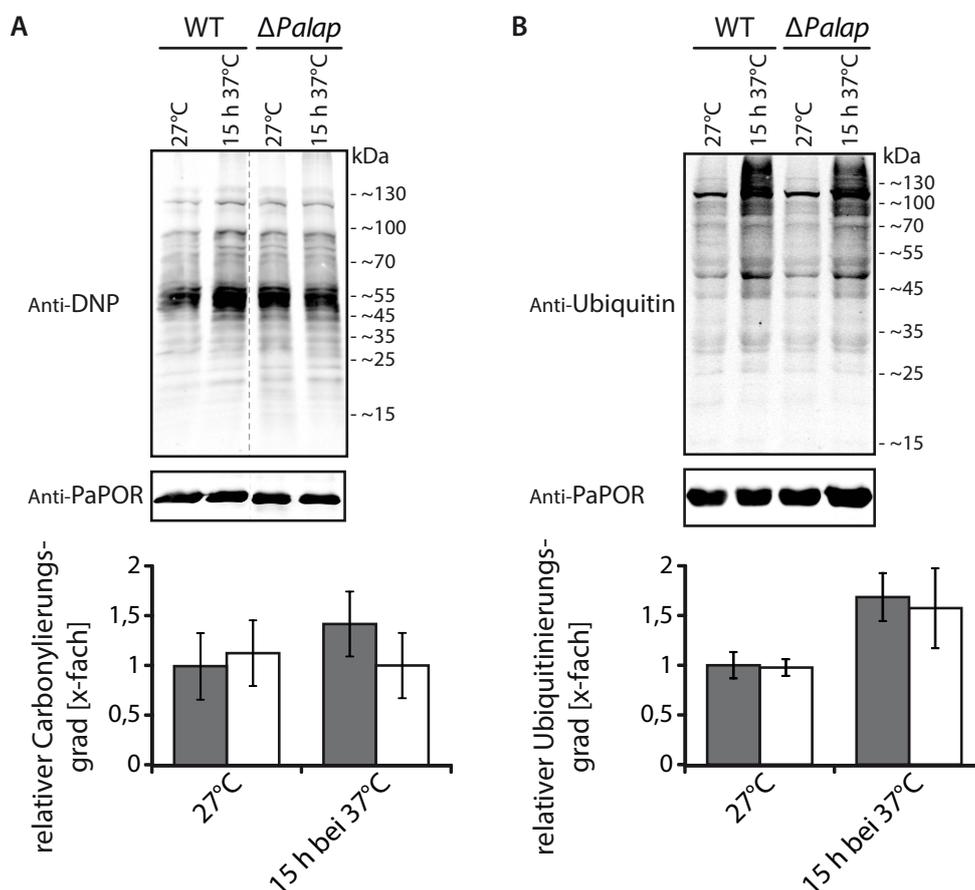
Organismus	Identifizierungsnummer
<i>Apis mellifera</i>	MER071636
<i>Arabidopsis thaliana</i>	O80983
<i>Aspergillus clavatus</i>	A1CI84
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Q4WQ45
<i>Caenorhabditis elegans</i>	P54813
<i>Candida albicans</i>	Q5A458
<i>Candida glabrata</i>	Q6FMU6
<i>Chaetomium globosum</i>	Q2GVG1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	A8HS40
<i>Drosophila melanogaster</i>	Q9W1Y0
<i>Escherichia coli</i>	Q8X9L0
<i>Gibberella zeae</i>	MER176229
<i>Homo sapiens</i>	Q96TA2
<i>Mus musculus</i>	O88967
<i>Neurospora crassa</i>	Q9HDH1
<i>Oryza sativa</i>	Q8LQJ9
<i>Podospora anserina</i>	B2B020
<i>Rattus norvegicus</i>	Q66HP7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P32795
<i>Vitis vinifera</i>	F6H3N2
<i>Xenopus laevis</i>	Q6NUB5



**Abb. 45: Qualität des PalAP-spezifischen Antikörpers.** Dargestellt ist die komplette Ansicht der Western Blot-Analyse aus Abb. 8C. Der Peptid-Antikörper reagiert spezifisch mit PalAP, jedoch werden mehrere Nebenbanden sichtbar.



**Abb. 46: Einfluss des Verlusts von PalAP auf Prohibitin 1 und 2.** Western Blot-Analysen mit je 30 µg mitochondrialen Proteinextrakten von 14 Tage alten Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen. Die Anzucht des Myzels und die Durchführung der Western Blot-Analysen erfolgten wie in Abb. 19 beschrieben. Die Detektion von PaPHB1 (**A**) und PaPHB2 (**B**) erfolgte mit gegen die homologen Hefepoteine generierten Antikörpern. Die Detektion von Porin (PaPOR) dient als Ladekontrolle.



**Abb. 47: Western Blot-Analyse der Proteinmodifikationen bei Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen nach Hitzestress.** Um den Einfluss von Hitzestress auf die Proteinmodifikation bei Wild- und *ΔPalap*-Isolaten zu untersuchen, wurden die 7 Tage alten Stämme aus Abb. 13 verwendet. Diese wurden bei 27°C (27°C) angezogen bzw. 15 Stunden vor der Isolation der mitochondrialen Proteine bei 37°C inkubiert (15 h 37°C). (**A**) ,Oxyblot'-Analyse. Die gelelektrophoretische Auftrennung von je 20 µg mitochondrialen Proteinen erfolgte mit 10 und 16 %iger biphasischer SDS-PAGE. Anschließend wurden die Proteine auf PVDF-Membranen übertragen und die mit DNPH derivatisierten Carbonylgruppen mit einem Anti-DNP-Antikörper nachgewiesen.

SM0671 wurde als Größenstandard aufgetragen. Porin (PaPOR) dient zur Normierung der densitometrischen Auswertung. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte des relativen Carbonylierungsgrads der Wild- (grau; n = 4) und *Palap*-Deletionsstämme (weiß; n = 4)  $\pm$  Standardabweichung, wobei der Mittelwert der Wildstämme bei 27°C auf 1 gesetzt wurde. Der relative Carbonylierungsgrad der Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Stämme unterscheidet sich weder bei 27°C (WT  $1x \pm 0,34$ ;  $\Delta$ *Palap*  $1,13x \pm 0,33$ ;  $p > 0,05$ ) noch nach Hitzestress (WT  $1,43x \pm 0,33$ ;  $\Delta$ *Palap*  $1,01x \pm 0,33$ ;  $p > 0,05$ ). **(B)** Zur Analyse der Ubiquitinierung der mitochondrialen Proteine wurden je 75  $\mu$ g mitochondriale Proteinextrakte durch 12 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf PVDF-Membranen wurden ubiquitinierte Proteine mit einem Ubiquitin-Antikörper nachgewiesen. Als Größenstandard wurde SM0671 aufgetragen. Porin (PaPOR) wurde zur Normierung der densitometrischen Auswertung detektiert. Gezeigt sind die Mittelwerte des relativen Ubiquitinierungsgrads der Proteine bei den Wild- (grau; n = 4) und  $\Delta$ *Palap*-Stämmen (weiß; n = 4)  $\pm$  Standardabweichung. Der Mittelwert der Wildstämme bei 27°C wurde auf 1 gesetzt. Weder bei 27°C (WT  $1x \pm 0,14$ ;  $\Delta$ *Palap*  $0,98x \pm 0,08$ ;  $p > 0,05$ ) noch nach Inkubation bei 37°C (WT  $1,68x \pm 0,25$ ;  $\Delta$ *Palap*  $1,57x \pm 0,4$ ;  $p > 0,05$ ) unterscheidet sich die relative Menge an modifizierten Proteinen zwischen Wild- und *Palap*-Deletionsstamm.

**Tabelle 23: Massenspektrometrische Identifikation der differenziell exprimierten Proteine aus Tabelle 21.** Zur Identifizierung des differenziell exprimierten Proteins (UniProt'-Nr.) eines signifikant veränderten 'Proteinspots' (Proteinmenge  $\Delta$ *Palap*/WT und p-Wert) wurde die Lage des 'Spots' im Gel (Molekulargewicht (MW im Gel) und isoelektrischer Punkt (pI im Gel)) mit den Daten der durch Massenspektrometrie identifizierten Proteinen verglichen. Dazu wurde jeweils die Wahrscheinlichkeit der mitochondrialen Lokalisation des Proteins und daraufhin das theoretische Molekulargewicht (theoretisch (ohne MTS)) und der pI (theoretisch (ohne MTS)) ohne Signalsequenz überprüft. Die Anzahl der Peptide und der 'Mascot Protein Score' spiegeln die Güte der massenspektrometrischen Identifizierung eines Proteins. Die Identifizierung der Peptide erfolgte mit der *Podospira anserina*-UniProt'-Datenbank (11.066 Einträge). Der Grenzwert ('cutoff') wurde auf 14 gesetzt. Ein 'Mascot Protein Score' > 13 bedeutet daher, dass die Wahrscheinlichkeit einer falschpositiven Identifizierung eines Proteins weniger als 5 % beträgt.

UniProt-Nr.	Spot'-Nr.	Proteinmenge	p-Wert	MS		MW (kDa)		pI	
				Anzahl Peptide	'Mascot Protein Score'	MW im Gel	theoretisch (ohne MTS)	pI im Gel	theoretisch (ohne MTS)
B2A8W9	1091	1,22	0,045	9	471	~ 60	56,2	~ 6	5,82
	1359	1,87	0,013	59	3162	~ 57	56,2	~ 5,6	5,82
	1365	1,5	0,029	27	1391	~ 55	56,2	~ 5,4	5,82
B2AB72	2173	1,23	0,028	18	907	~ 37	36,4	~ 5,2	5,65
B2AB90	1549	1,23	0,0012	31	1813	~ 51	48,7	~ 5,2	5,21
B2ADB9	1531	1,31	0,0011	42	2210	~ 50	53,5	~ 7,2	7,86
	1533	1,25	0,00034	41	2020	~ 50	53,5	~ 6,7	7,86
	1534	1,22	0,012	42	2042	~ 50	53,5	~ 7	7,86
B2APT2	1727	1,33	0,0018	36	2257	~ 46	47,6	~ 5,7	5,81
B2AT17	3078	1,88	0,024	10	472	~ 17	16,9	~ 6,3	6
B2ATC1	825	-1,3	0,00018	41	2256	~ 80	73,8	~ 5,4	5,32
B2AU12	3053	1,32	0,0098	7	328	~ 19	22,7	~ 5,4	5,97
B2AXD7	2801	1,28	0,04	11	552	~ 25	28,5	~ 6	6,75
B2AYM6	2260	-1,52	0,012	37	1952	~ 35	35,1	~ 8,2	8,95
B2AZV9	2102	-1,39	0,038	26	1348	~ 35	32,3	~ 7,6	7,82
B2B064	3119	1,92	0,018	3	107	~ 16	24	~ 4,5	4,8
B2B0Y1	1821	1,82	0,02	17	755	~ 43	43,5	~ 4,2	4,92
	1844	1,23	0,048	37	2095	~ 43	43,5	~ 4,4	4,92
	1931	1,25	0,0062	29	1671	~ 42	43,5	~ 4,5	4,92
B2B270	1350	1,22	0,022	40	2336	~ 55	59,1	~ 5,3	5,35
	1355	1,39	0,005	22	115	~ 55	59,1	~ 5,4	5,35
B2B2B8	1642	1,29	0,0068	19	843	~ 46	41	~ 6,3	6,41
B2B318	2400	1,37	0,027	27	1441	~ 34	31,8	~ 4,7	5,15

UniProt-Nr.	,Spot'-Nr.	Proteinmenge	p-Wert	MS		MW (kDa)		pI	
				Anzahl Peptide	,Mascot Protein Score'	MW im Gel	theoretisch (ohne MTS)	pI im Gel	theoretisch (ohne MTS)
B2B4L4	2777	-1,21	0,0033	30	1199	~ 25	24,4	~ 5,2	5,28
	1711	1,23	0,018	5	256	~ 44	40,4	~ 6	6,05
B2B7M8	1762	1,67	0,0056	27	1663	~ 43	40,4	~ 5,9	6,05
	1767	1,48	0,021	44	2223	~ 43	40,4	~ 6	6,05
B2B7Z4	2648	-1,72	0,011	20	851	~ 26	29	~ 8,3	9,07
B2AR54	2096	1,35	0,027	11	643	~ 40	42	~ 5,7	5,74
B2B3P4	1186	1,27	0,035	16	713	~ 60	56,4	~ 5,8	5,71

Tabelle 24: ,UniProt'-Identifizierungsnummern der durch die ICAT-Analyse identifizierten differenziell exprimierten Proteine aus Abb. 21.

Proteinname	UniProt
Carbamoylphosphat-Synthase	B2ALX5
$\alpha$ -UE der Succinyl-CoA-Ligase [GDP-bildend]	B2B5H6
kurzkettige Dehydrogenase	B2AAB2
2-Oxoglutarat-Dehydrogenase E1 Komponente	B2B251
Acetolactat-Synthase (kleine UE)	B2B064
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase B18 UE	B2AC18
Cytochrom c-Oxidase UE 2	P20682
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 51 kDa UE	B2ARC6
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 20,8 kDa UE	B2AS44
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 24 kDa UE	B2B4L4
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 18,4 kDa UE	B2AWC1
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 21,3 kDa UE	B2AL06
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 11,5 kDa UE	B2B6S4
NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase 75 kDa UE	B2AZM0

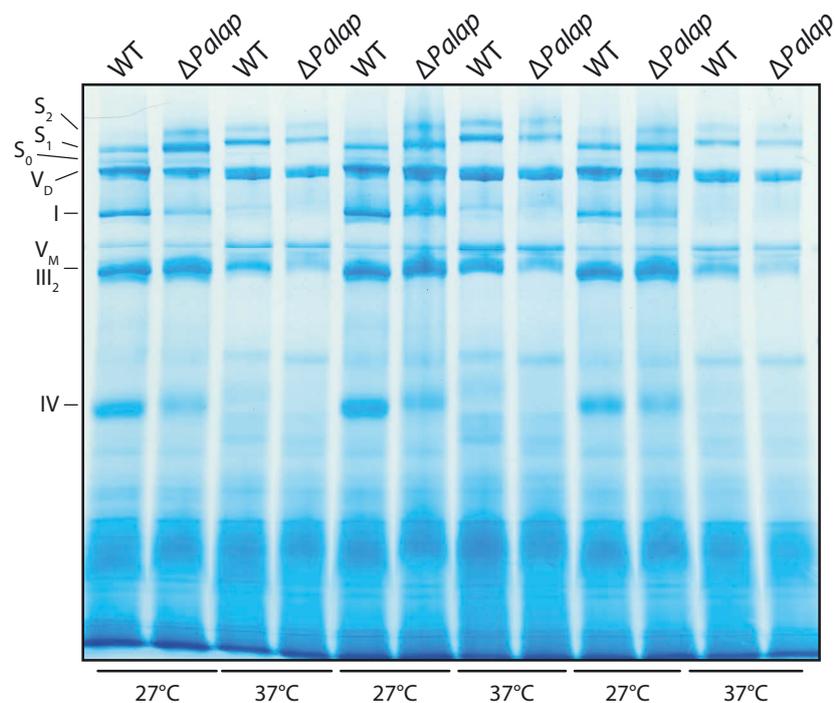
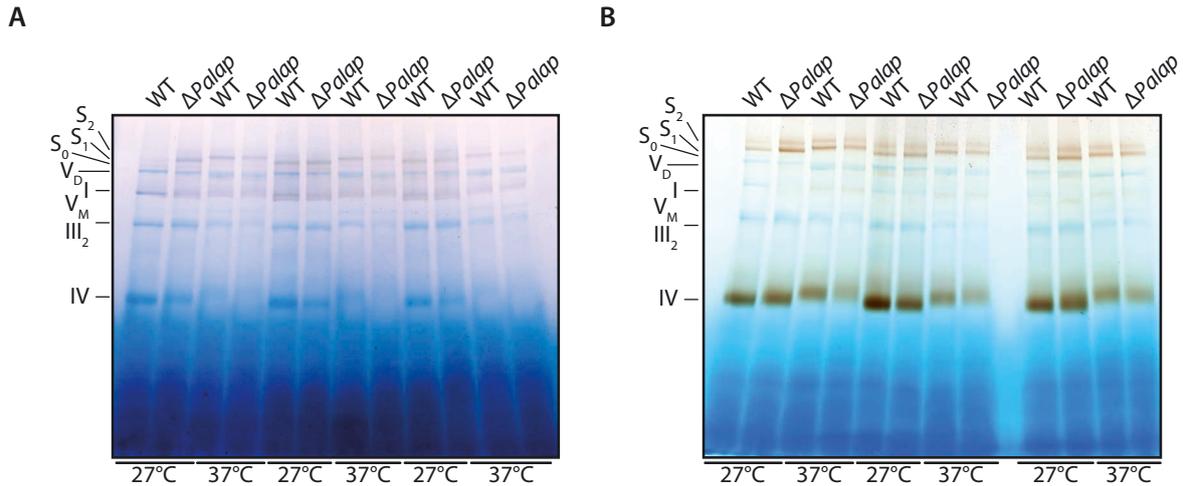
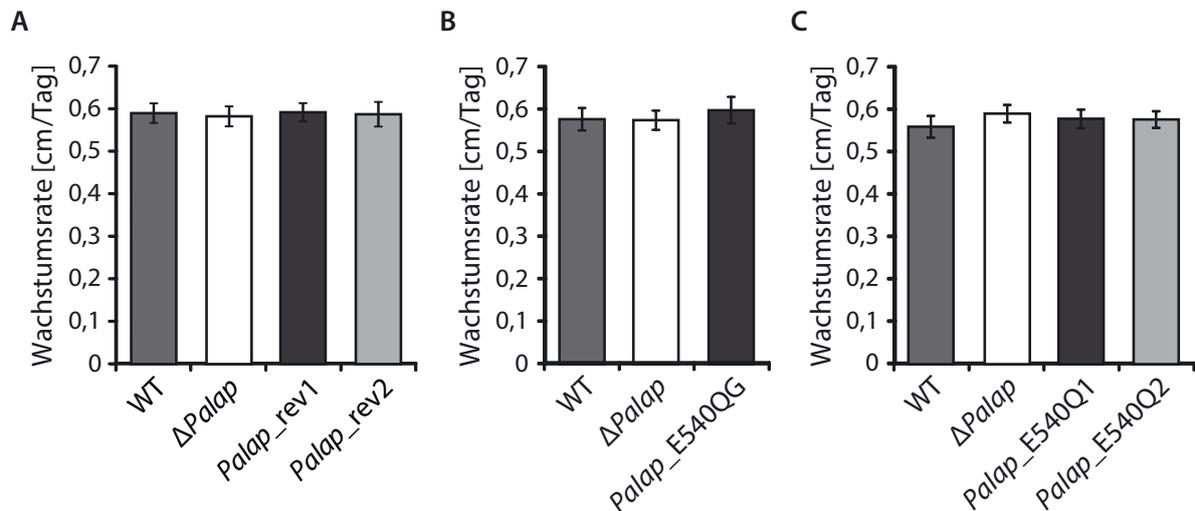


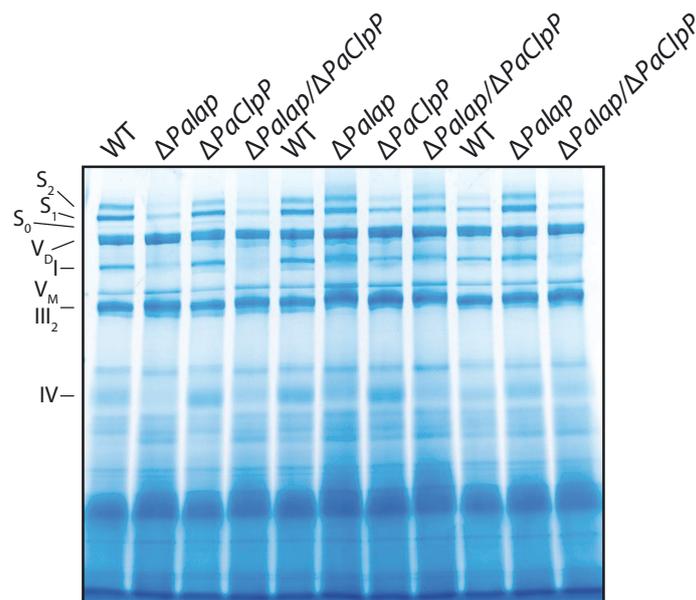
Abb. 48: Untersuchung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durch BN-PAGE. Vollständige BN-PAGE aus Abb. 22.



**Abb. 49:** Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim *Palap*-Deletionsstamm auf die Aktivitäten von Komplex I und IV. Vollständige BN-PAGEs aus Abb. 23 und Abb. 25.



**Abb. 50:** Wachstumsraten der *Palap*-Revertanten und der Stämme mit proteolytisch inaktiver i-AAA Protease. **(A)** Die Anzucht der Stämme erfolgte wie in Abb. 29 beschrieben. Die Wuchsraten der Revertanten *Palap\_rev1* (0,59 cm/Tag ± 0,02; n = 59; p > 0,05) und *Palap\_rev2* (0,59 cm/Tag ± 0,03; n = 39; p > 0,05) unterscheiden sich nicht von der des Wildstamms (0,59 cm/Tag ± 0,02; n = 65) und des *Palap*-Deletionsstamms (0,58 cm/Tag ± 0,02; n = 49; p > 0,05). Die Anzucht der Stämme in **(B)** und **(C)** erfolgte wie in Abb. 34 beschrieben. **(B)** Die Wachstumsrate von *Palap\_E540QG* (0,60 cm/Tag ± 0,03; n = 30; p < 0,05) ist geringfügig erhöht verglichen mit dem Wild- (0,58 cm/Tag ± 0,03; n = 21) und *Palap*-Deletionsstamm (0,58 cm/Tag ± 0,02; n = 34). **(C)** Verglichen mit dem Wildstamm (0,56 cm/Tag ± 0,03; n = 24) sind die Wachstumsraten von *Palap\_E540Q1* (0,58 cm/Tag ± 0,02; n = 35; p < 0,01), *Palap\_E540Q2* (0,58 cm/Tag ± 0,02; n = 28; p < 0,05) und *ΔPalap* (0,59 cm/Tag ± 0,02; n = 25; p < 0,001) geringfügig erhöht (modifiziert nach Weil et al. 2011).



**Abb. 51: BN-PAGE mit mitochondrialen Proteinextrakten der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante.** Vollständige BN-PAGE aus Abb. 39.

### 9.3 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Hierarchie der mitochondrialen Qualitätskontrolle.
- Abb. 2: Schematische Übersicht über die ATP-abhängigen Proteasen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle.
- Abb. 3: Aufgaben der m-AAA Protease YTA10-YTA12.
- Abb. 4: Aufgaben der i-AAA Protease YME1.
- Abb. 5: Weitere Aufgaben der i-AAA Protease YME1.
- Abb. 6: *In-silico*-Charakterisierung der Proteinsequenzen der i-AAA Protease PaIAP und der m-AAA Protease PaMAP.
- Abb. 7: Stammbaum von mitochondrialen i-AAA Proteasen aus verschiedenen Organismen.
- Abb. 8: Verifizierung der verwendeten *ΔPalap*-Isolate.
- Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung des *Palap*-Deletionsstamms bei 27°C.
- Abb. 10: Analyse der Lebensspanne des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms bei 27°C.
- Abb. 11: Die mtDNA des *Palap*-Deletionsstamms bleibt länger intakt.
- Abb. 12: Mitochondrienmorphologie in Hyphen des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms.
- Abb. 13: Altersabhängige Carbonylierung im mitochondrialen Proteom des Wild- und des *Palap*-Deletionsstamms.
- Abb. 14: Hitzestress beeinträchtigt lebenswichtige Funktionen beim *Palap*-Deletionsstamm.
- Abb. 15: Analyse der Lebensspanne des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms bei 37°C.
- Abb. 16: Einfluss von Hitzestress auf die mtDNA von Wild- und *ΔPalap*-Isolaten.

- Abb. 17: Analyse der Transkriptmenge von *PaMap* in Wild- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten.
- Abb. 18: Analyse der Regulation von PaIAP bei Hitzestress im Wildstamm.
- Abb. 19: Einfluss der Deletion von *Palap* auf andere Komponenten des mitochondrialen Proteinqualitätskontrollsystems.
- Abb. 20: Vergleichende Analyse des mitochondrialen Proteoms von Wildstamm- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten durch 2D-DIGE.
- Abb. 21: Vergleichende Analyse des mitochondrialen Proteoms von Wildstamm- und  $\Delta$ *Palap*-Isolaten durch ICAT.
- Abb. 22: Untersuchung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen.
- Abb. 23: Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim *Palap*-Deletionsstamm auf die Aktivität von Komplex I.
- Abb. 24: Sauerstoffverbrauch des Wild- und *Palap*-Deletionsstamms mit steigender Rotenonzugabe.
- Abb. 25: Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim *Palap*-Deletionsstamm auf die Aktivität von Komplex IV.
- Abb. 26: Auswirkung der Deletion von *Palap* auf die Proteinmenge von COX2.
- Abb. 27: Herstellung des Vektors p*Palap*-rev zur Reversion der Deletion von *Palap*.
- Abb. 28: Überprüfung der Reversion der Deletion von *Palap*.
- Abb. 29: Analyse der Lebensspanne der *Palap*-Revertantenstämme.
- Abb. 30: Schematische Darstellung der Strategie zur Inaktivierung der proteolytischen Aktivität von PaIAP.
- Abb. 31: Herstellung der Vektoren p*Palap*-E540Q und p*Palap*-E540QG zur Einführung einer proteolytisch inaktiven Form von PaIAP in den *Palap*-Deletionsstamm.
- Abb. 32: Modell der Proteinstrukturen von PaIAP und YME1 verglichen mit deren Homolog FtsH aus *Thermotoga maritima*.
- Abb. 33: Überprüfung der Integration und Expression der proteolytisch inaktiven i-AAA Protease PaIAP.
- Abb. 34: Analyse der Abhängigkeit der Lebensspanne von der proteolytischen Aktivität von PaIAP.
- Abb. 35: Verifizierung der Deletion von *Palap* und *PaClpP* bei *P. anserina*.
- Abb. 36: Lebensspannenanalyse des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 27°C.
- Abb. 37: Lebensspannenanalyse des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 37°C.
- Abb. 38: Wachstumsrate des *Palap/PaClpP*-Deletionsstamms bei 27°C und bei 37°C.
- Abb. 39: BN-PAGE mit mitochondrialen Proteinextrakten der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante.
- Abb. 40: Temperaturabhängige Regulation von PaIAP bei *P. anserina*.
- Abb. 41: Möglicher Einfluss der i-AAA Protease PaIAP auf Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle in der Matrix.
- Abb. 42: Reorganisation der Atmungskettenkomplexe im *Palap*-Deletionsstamm bei 27°C.
- Abb. 43: Schematische Übersicht über die Funktionen der i-AAA Protease PaIAP in *P. anserina*.
- Abb. 44: Aminosäuresequenzvergleich von PaIAP, IAP-1, YME1 und YME1L.
- Abb. 45: Qualität des PaIAP-spezifischen Antikörpers.

Abb. 46: Einfluss des Verlusts von PalAP auf Prohibitin 1 und 2.

Abb. 47: Western Blot-Analyse der Proteinmodifikationen bei Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen nach Hitze-stress.

Abb. 48: Untersuchung der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe bei Wild- und *Palap*-Deletionsstämmen durch BN-PAGE.

Abb. 49: Einfluss der veränderten Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe beim *Palap*-Deletionsstamm auf die Aktivitäten von Komplex I und IV.

Abb. 50: Wachstumsraten der *Palap*-Revertanten und der Stämme mit proteolytisch inaktiver i-AAA Protease.

Abb. 51: BN-PAGE mit mitochondrialen Proteinextrakten der *Palap/PaClpP*-Deletionsmutante.

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswirkungen des Verlusts der i-AAA Protease.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Tabelle 3: Liste der sonstigen Materialien.

Tabelle 4: Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe.

Tabelle 5: Zusammensetzung von 10, 12 und 16 %igen Glycin-SDS-Polyacrylamidgelen (zwei Gele).

Tabelle 6: Zusammensetzung des 12,5 %igen Trenngels für 2D-DIGE (12 Gele).

Tabelle 7: Zusammensetzung eines 3,5 - 13 %igen blau-nativen Polyacrylamid-Gradientengels.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Kits.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Stämme.

Tabelle 10: Liste der verwendeten Größenstandards.

Tabelle 11: Liste der zur Herstellung von Vektoren verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 12: Liste der für „*real-time RT-PCR*“ verwendeten Oligonukleotide.

Tabelle 13: Liste der verwendeten Plasmide.

Tabelle 14: Liste der verwendeten DIG-markierten Sonden.

Tabelle 15: Liste der verwendeten Enzyme.

Tabelle 16: Liste der verwendeten Antikörper.

Tabelle 17: Liste der verwendeten Computerprogramme.

Tabelle 18: Parameter der Oligonukleotidpaare für eine „*real-time RT-PCR*“.

Tabelle 19: Protokoll der isoelektrischen Fokussierung.

Tabelle 20: Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorophore.

Tabelle 21: Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse der durch 2D-DIGE ausgewählten ‚Proteinspots‘.

Tabelle 22: Identifizierungsnummern der i-AAA Proteasen aus den verschiedenen Organismen aus Abb. 7.

Tabelle 23: Massenspektrometrische Identifikation der differenziell exprimierten Proteine aus Tabelle 21.

Tabelle 24: ‚UniProt‘-Identifizierungsnummern der durch die ICAT-Analyse identifizierten differenziell exprimierten Proteine aus Abb. 21.



## 10 Danksagung

Ich danke...

...Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz für die Bereitstellung dieses hochinteressanten und spannenden Themas und für die unermüdliche Unterstützung und das große Interesse an meiner Arbeit.

...Prof. Dr. Ulrich Brandt für die Erstellung des Zweitgutachtens. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, Experimente in Kooperation mit Mitgliedern Ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, sowie für Ihr stetes Interesse an meiner Arbeit.

...Dr. Ilka Wittig, Dr. Stefan Dröse und Dr. Heinrich Heide aus der Arbeitsgruppe von Prof. Brandt für die Anleitung bei der Durchführung einiger Experimente und für viele hilfreiche Anmerkungen und Diskussionen.

...Dr. Andrea Hamann für ihre unendliche Hilfsbereitschaft und die vielen tollen Tipps und Ideen!!!

...allen anderen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern des AK Osiewacz für viele lustige Momente und die ständige Bereitschaft über Probleme zu diskutieren und mir bei deren Lösung zu helfen!

...allen meinen Freunden, für mein Leben außerhalb des Labors.

...meinen Eltern und Christoph, die mich immer unterstützt haben!

DANKE!



## 11 Publikationsliste

Luce K, Weil AC & Osiewacz HD (2010) Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. in *Protein metabolism and homeostasis in aging* (Tavernarakis N, ed). New York: Springer US, 108–125.

Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil A, Werner A, De Vreese A, Vanfleteren JR & Osiewacz HD (2011) Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the ageing model *Podospora anserina*. *PLoS ONE* **6**, E16620.

Weil A, Luce K, Dröse S, Wittig I, Brandt U & Osiewacz HD (2011) Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* **10**, 4280–4290.

Fischer F, Weil A, Hamann A & Osiewacz HD (in Revision) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal *ClpP* deletion strain. *Nat. Commun.*

