

**Molekulare Grundlagen des Kupfermetabolismus bei dem  
Ascomyceten *Podospira anserina*: Die Bedeutung von  
Kupfer für die mitochondriale Funktion**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biologie und Informatik  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Stefan Wilhelm Stumpferl**  
aus München

Frankfurt am Main 2005

(D F 1)

vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe – Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. D. Osiewacz

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

2. Gutachter: Prof. Dr. G. Sandmann

Datum der Disputation: .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Kupfer	1
1.1.1 Die Bedeutung von Kupfer für biologische Systeme	1
1.1.1.1 Kupfer als essenzieller Kofaktor	2
1.1.1.2 Kupfer-induzierte Zellschäden	3
1.1.1.3 Kupfer als Katalysator freier Radikale	4
1.1.2 Regulation der zellulären Kupferhomöostase	6
1.1.2.1 Import von Kupfer	6
1.1.2.2 Kupfer-Metabolismus	13
1.1.2.3 Transport von Kupfer zu den Mitochondrien	20
1.1.2.4 Ausscheidung von Kupfer	24
1.1.3 Die Bedeutung von Kupfer für entwicklungsbiologische Prozesse	24
1.1.3.1 Kupfer in der Embryonalentwicklung	25
1.1.3.2 Störungen der Kupferhomöostase	27
1.2 Biologische Alterung	31
1.2.1 Mitochondrien und Alterungsprozesse	31
1.2.2 Die Bedeutung freier Radikale für Alterungsprozesse	36
1.3 Modellsysteme der Alterungsforschung	38
1.3.1 Charakteristika geeigneter Spezies	38
1.3.2 Der Ascomycet <i>P. anserina</i>	40
1.3.2.1 Die Kupfermangel-Mutante <i>grisea</i>	41
1.3.2.2 Weitere langlebige <i>P. anserina</i> -Mutanten	43
1.3.2.3 Die Umstrukturierung des Chondrioms während der Seneszenz	44
1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit	48
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>50</b>
2.1 Material und Bezugsquellen	50
2.1.1 Bezugsquellen	50
2.1.2 Geräte	50
2.1.3 Oligonukleotide	51

2.1.4	Vektoren	52
2.1.5	Radiochemikalien	54
2.1.6	Medien	55
2.1.6.1	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i>	55
2.1.6.2	Medien zur Kultivierung von <i>P. anserina</i>	55
2.1.6.3	Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	55
2.1.7	Puffer und Lösungen	56
2.2	Stämme	58
2.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	58
2.2.2	<i>P. anserina</i> Stämme	58
2.2.3	<i>S. cerevisiae</i> Stämme	58
2.3	Mikrobiologische und genetische Methoden	59
2.3.1	Bestimmung der Zelldichte	59
2.3.2	Kultivierung	59
2.3.2.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	59
2.3.2.2	Kultivierung von <i>P. anserina</i>	59
2.3.2.3	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	59
2.3.3	Transformation	60
2.3.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	60
2.3.3.2	Transformation von <i>P. anserina</i>	61
2.3.3.3	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	63
2.3.4	Kreuzung und Tetradenanalyse	64
2.3.5	Bestimmung der Lebensspanne	65
2.4	Molekularbiologische Methoden	65
2.4.1	Isolation von Nukleinsäuren	66
2.4.2	Handhabung von Nukleinsäuren	68
2.4.3	<i>In vitro</i> -Modifikation von DNA	68
2.4.4	Markierung von DNA	70
2.4.5	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	71
2.4.6	Nukleinsäurehybridisierung	72
2.4.7	Sequenzierung von DNA	74
2.4.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	75

2.5	Proteinbiochemische Methoden	75
2.5.1	Isolation nativer Proteine aus <i>P. anserina</i>	75
2.5.2	Isolation intakter Mitochondrien aus <i>P. anserina</i>	76
2.5.3	Immundetektion von Proteinen	77
2.5.4	SOD-Aktivitätstest nativer Proteine	79
2.6	Physiologische Methoden	81
2.6.1	Messung des Sauerstoff-Verbrauchs	81
2.7	Zellbiologische Methoden	83
2.7.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen der Morphologie von <i>P. anserina</i>	83
2.8	<i>In silico</i> -Analysen	83
2.8.1	Quantifizierung von DNA	83
2.8.2	Datenbanksuche	83
2.8.3	Homologievergleiche	84
2.8.4	Virtuelle Klonierung	84
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>85</b>
3.1	Der <i>PaCox17</i> -Locus von <i>P. anserina</i>	85
3.1.1	Isolation der flankierenden Bereiche von <i>PaCox17</i>	85
3.1.2	Analyse des genomischen Locus und der cDNA von <i>PaCox17</i>	94
3.2	Konstruktion des <i>PaCox17</i> -Gentauschplasmids	99
3.2.1	Prinzipielle Strategie	99
3.2.2	Deletion des <i>PaCox17</i> -Leserahmens	100
3.2.3	Integration der Bleocin-Resistenzkassette	104
3.2.4	Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette	106
3.2.5	Austausch der <i>PaCox17</i> 5'-Flanke	108
3.3	Isolation der <i>P. anserina</i> <i>PaCox17::ble</i> -Mutante	114
3.3.1	Transformation von <i>P. anserina</i> mit Plasmid pBHP-9	114
3.3.2	Selektion möglicher <i>PaCox17::ble</i> -Mutanten	114
3.4	Charakterisierung der <i>PaCox17::ble</i> -Mutante	122
3.4.1	Der Phänotyp der <i>PaCox17::ble</i> -Mutante ist gegenüber dem Wild-Stamm verändert	124
3.4.2	Die Deletion von <i>PaCox17</i> induziert die alternative Oxidase	132

3.4.3	PaCox17::ble-Stämme zeigen SHAM-sensitive, KCN-resistente Atmung _____	134
3.4.4	Das Aktivitätsschema der SOD ist bei PaCox17::ble-Stämmen verändert _____	135
3.4.5	Das mitochondriale Genom der Mutante PaCox17::ble ist stabilisiert _____	140
3.4.6	Die Lebensspanne von PaCox17::ble-Mutanten ist signifikant verlängert _____	145
3.5	Das <i>P. anserina</i> -Gen <i>PaScol</i> _____	154
3.5.1	Identifizierung und Isolation von <i>PaScol</i> _____	155
3.5.2	Initiale Charakterisierung von <i>PaScol</i> _____	161
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> _____	<b>165</b>
4.1	Charakteristika von <i>PaCox17</i> _____	165
4.2	Charakterisierung der Mutante PaCox17::ble _____	168
4.2.1	Die Deletion von <i>PaCox17</i> erhöht den cytoplasmatischen Kupfer-Spiegel _____	168
4.2.2	Mutante PaCox17::ble zeigt alternative Respiration _____	172
4.2.3	Die Disruption des PaCOX17-Weges stabilisiert das mitochondriale Genom _____	174
4.2.4	Die Modulation der mitochondrialen Kupferversorgung führt zur Verlängerung der Lebensspanne _____	176
4.3	Charakterisierung von <i>PaScol</i> _____	183
4.4	Ausblick _____	185
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> _____	<b>187</b>
<b>6</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> _____	<b>189</b>
<b>7</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b> _____	<b>190</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> _____	<b>191</b>
<b>9</b>	<b>Publikationsliste</b> _____	<b>208</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungen und Fachbegriffe</b> _____	<b>209</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> _____	<b>210</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b> _____	<b>211</b>
<b>13</b>	<b>Anhang</b> _____	<b>212</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Kupfer

Kupfer war schon den ältesten Kulturvölkern bekannt, sein Name leitet sich vom lateinischen *aes cyprium* (Erz aus Cypern) ab. Im Periodensystem der Elemente besitzt Kupfer das Symbol Cu (aus dem lateinischen: *cuprum*).

Kupfer hat die Ordnungszahl 29, es kommt in zwei natürlichen Isotopen mit den Atommassen 63 bzw. 65 vor, ihr Massen-Anteil liegt bei 69,17% bzw. 30,83%. Das radioaktive Kupferisotop  $^{64}\text{Cu}$  wird künstlich hergestellt, es wird beispielsweise für molekularbiologische Methoden benötigt.

Das Kupfer-Isotop  $^{64}\text{Cu}$  wird durch Kernfusion (Kernkraftwerk) synthetisiert. Dieses künstliche Radionuklid kommt in der Erdkruste nicht vor, da  $^{64}\text{Cu}$  nicht innerhalb einer natürlichen Zerfallsreihe enthalten ist oder durch andere Prozesse neu gebildet wird.

Kupfer ist zu  $1 \times 10^{-2}$  Gewichts-% im Erdmantel enthalten. In Nordamerika, Chile und Australien kommt Kupfer elementar vor. Gebundenes Kupfer findet sich in Form von Oxiden, Sulfiden, Arseniden, Chloriden und Carbonaten. In Deutschland wird Kupfer in kleinen Mengen als „Mansfelder Kupferschiefer“ südöstlich vom Harz abgebaut.

In chemischen Verbindungen sind einwertige und zweiwertige Kupferionen bekannt. In wässrigen Lösungen ist die zweiwertige Form die stabilste, da die Hydratations-Enthalpie eines zweiwertigen  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions größer ist als die des einwertigen  $\text{Cu}^{+}$ -Ions. In biologischen Systemen ist Kupfer ein Kofaktor zahlreicher Proteine.

### 1.1.1 Die Bedeutung von Kupfer für biologische Systeme

Kupfer ist für alle bekannten Spezies ein essenzielles Spurenelement (Hart, 1928; Hostetler *et al.*, 2003).

Spurenelemente sind Elemente die für die Mehrheit der bekannten Spezies essenziell sind, sie werden nur in sehr geringen Mengen, in „Spuren“ benötigt. Spurenelemente sind definitionsgemäß mit weniger als 50 mg / kg Körpergewicht in den Körpern von Vielzellern enthalten (Mertz, 1981).

Seine Fähigkeit Elektronen leicht aufzunehmen bzw. abzugeben macht es zu einem idealen Elektronen-Überträger. Damit ist Kupfer einerseits als Kofaktor zellulärer Reaktionen, die Biomoleküle reduzieren bzw. oxidieren [z. B. Cytochrom-*c*-Oxidase, Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD), Tyrosinase, Laccase etc.] prädestiniert. Andererseits kann ein zu hoher intrazellulärer Kupfer-Spiegel zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen bzw. zu einer direkten Schädigung zellulärer Proteine führen. Veränderungen des intrazellulären Kupferspiegels haben profunde Auswirkungen auf Metabolismus, Wachstum und Entwicklung der meisten Spezies. Der intrazelluläre Kupfer-Spiegel wird deshalb innerhalb enger Grenzen reguliert.

Die präzise Kontrolle der zellulären Kupferhomöostase spielt auch in der Individual-Entwicklung biologischer Systeme eine wichtige Rolle, ihre Regulation erfolgt durch Netzwerke komplexer Mechanismen.

### 1.1.1.1 Kupfer als essenzieller Kofaktor

Durchschnittlich enthält eine einzelne Zelle der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* etwa  $4 \cdot 10^5$  Kupfer-Ionen (Rae *et al.*, 1999). Kupfer kommt in zahlreichen metallo-organischen Verbindungen vor, es ist Kofaktor von mehr als 20 Enzymen bzw. Enzymkomplexen (siehe Tab. 1; Linder und Hazegh-Azam, 1996).

**Tabelle 1: Kupfer-bindende Proteinfaktoren eukaryontischer Zellen.** Die angegebenen Referenzen beziehen sich auf *S. cerevisiae*, *Podospora anserina* und *Arabidopsis thaliana*. Einige Homologe anderer Spezies werden anschließend diskutiert.

Zelluläre Funktion	Proteinfaktor	Referenz	
Regulation Kupferhomöostase	ACE1	Thiele, 1988	
	MAC1	Jungmann <i>et al.</i> , 1993	
	GRISEA	Osiewacz und Nuber, 1996	
Metallothioneine	CUP1	Fogel und Welch, 1982	
	CRS5	Culotta <i>et al.</i> , 1994	
Kofaktoren Eisen-Transport	ATX1	Lin und Culotta, 1995	
	CCC2	Fu <i>et al.</i> , 1995	
	FET3	Askwith <i>et al.</i> , 1994	
	FET5	Spizzo <i>et al.</i> , 1997	
Transport von Kupfer:			
	- in das Zytoplasma	CTR1	Dancis <i>et al.</i> , 1994A und 1994B
		CTR2 (COPT1)	Kampfenkel <i>et al.</i> , 1995
		CTR3	Knight <i>et al.</i> , 1996
		SMF1-3	Cohen <i>et al.</i> , 2000
		FET4	Hassett <i>et al.</i> , 2000
	- zu COX Untereinheit I	COX17	Glerum <i>et al.</i> , 1996a
		COX11	Tzagoloff <i>et al.</i> , 1990
		COX1	Hensgens <i>et al.</i> , 1983
	- zu COX Untereinheit II	COX17	Glerum <i>et al.</i> , 1996a
		SCO1	Schulze und Rödel, 1988
		SCO2	Glerum <i>et al.</i> , 1996b
		COX2	Kloeckener-Gruissem <i>et al.</i> , 1987
- zur Cu/Zn-SOD	CCS (LYS7)	Horecka <i>et al.</i> , 1995	
	SOD1	Chang <i>et al.</i> , 1991	

Beispiele hierfür sind: die Cytochrom-*c*-Oxidase (COX; terminale Oxidase der Atmungskette), die Kupfer-abhängige Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD; am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt) und die Tyrosinase (Pigmentierung).



Die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette) katalysiert den Transfer von Reduktionsäquivalenten (Elektronen) von Cytochrom *c* auf molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>). Die durch diesen Prozess freigesetzte Energie pumpt Protonen (H<sup>+</sup>) aus der mitochondrialen Matrix durch die innere mitochondriale Membran in den Intermembranraum (siehe 1.2.1). Der COX Komplex enthält drei mitochondrial-kodierte katalytische Untereinheiten und 10 nukleär-kodierte, kleinere regulatorische bzw. strukturelle Untereinheiten. Die drei Kern-Untereinheiten COXI, COXII und COXIII enthalten zwei Häm-Gruppen (a und a<sub>3</sub>), drei Kupfer-Ionen, ein Zink-Ion und ein Magnesium-Ion (Michel *et al.*, 1998).

Weiterhin dient Kupfer dem Sauerstoff-Transport im Blut von Krebsen und einigen Schneckenarten. Dabei ersetzt Kupfer das zentrale Eisen-Ion im Blutfarbstoff Hämoglobin.

### 1.1.1.2 Kupfer-induzierte Zellschäden

Das für biologische Systeme schädliche Potenzial des Elements Kupfer leitet sich bereits aus seiner Verwendung als Fungizid, Insektizid bzw. Algizid ab. Die Toxizität von Kupfer ist mit der anderer Schwermetalle (z.B. Blei, Cadmium oder Quecksilber) vergleichbar. Seine toxischen Eigenschaften erstrecken sich über alle Organismen-Reiche. Bei den Pflanzen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Selenastrum capricornutum* liegt die ED50 nach 96-stündiger Inkubation mit Kupfer bei 34 µg/L (0,54 µM) bzw. 50 µg/L (0,79 µM) (Juneau *et al.*, 2002).

ED50 steht für 50%-ige Erfolgs-Dosis. Die ED50 ist exakt die Dosis eines applizierten Stoffes, bei der 50% der untersuchten „Individuen“ (z.B. Pflanze, Tier, Zelle) eine bestimmte Reaktion zeigen (z.B. Einstellung der Wachstums, Bewegungslosigkeit, Ausbildung von Nekrosen etc.).

Im Tierreich treten größere Unterschiede zu Tage: Bei den Nematoden *Caenorhabditis elegans* und *Pristionchus pacificus* liegt die ED50 (Bewegungslosigkeit) bei 2 mg/L (30 µM) bzw. 8 mg/L (125 µM; Boyd und Williams, 2003), wohingegen das aquatische Insekt *Aedes aegypti* eine LD50 (24 Stunden Inkubation) von 33 ppm Cu aufweist (Rayms-Keller *et al.*, 1998).

Die LD50 ist die Dosis eines applizierten Stoffes, bei der innerhalb eines Experiments durchschnittlich 50% der untersuchten Individuen (einzelne Tiere, Zellen etc.) sterben. In den beschriebenen Beispielen kann die ED50 der LD50 gleichgesetzt werden. Beispielsweise entspricht die ED50 (Bewegungslosigkeit) der LD50, wobei sich die LD50 nur mit erhöhtem praktischen Aufwand belegen läßt. „Bewegungslosigkeit“ läßt sich in der Praxis leichter diagnostizieren als der Exitus an sich. Aus diesem Grund wird oft die ED50 anstelle der LD50 angegeben.

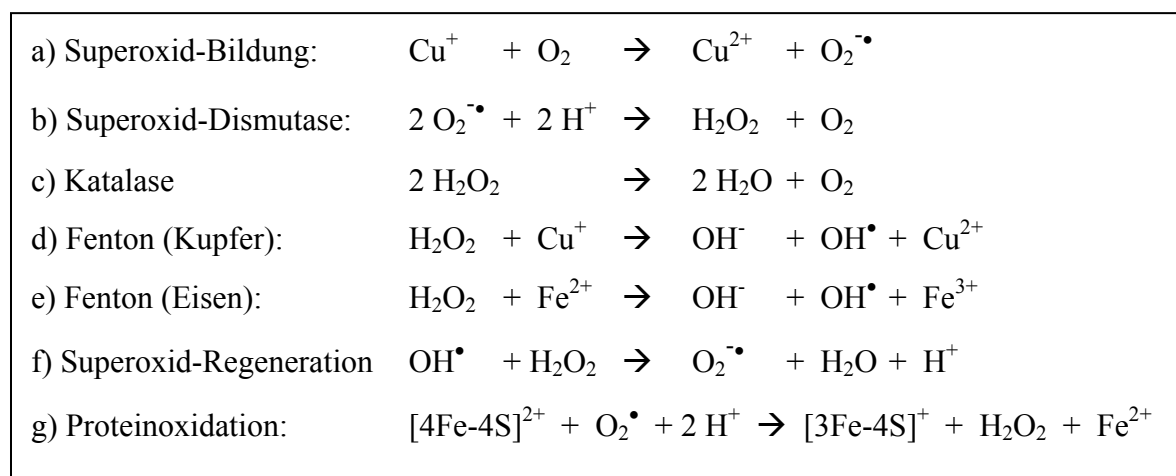
Die LD50 der Hefe *S. cerevisiae* wird bei einer Konzentration von 200 µM Cu<sup>2+</sup> in Flüssigmedium (5-minütige Inkubation) erreicht (Soares *et al.*, 2003). Der filamentöse Pilz *Neurospora crassa* stellt bei einer Konzentration von 630 µM Cu<sup>2+</sup> im Medium sein Wachstum ein (Suresh und Subramanyam, 1996). Filamentöse Pilze scheinen in Vergleich zu Hefe-artig wachsenden Pilzen Kupfer-toleranter zu sein. Den Grund dafür könnten dickwandigere Myzelien, höhere Toleranz gegenüber Kupfer und/oder eine präzisere Regulation der Kupfer-Homöostase darstellen.

### 1.1.1.3 Kupfer als Katalysator freier Radikale

Zellen enthalten unterschiedliche Proteine, die Kupfer mit hoher Affinität komplexieren. Durch die Bindung des Kupfers an Proteine wird seine Reaktivität eingeschränkt. Bei extremem Kupferüberschuss sind freie zytoplasmatische Kupfer(I)-Ionen denkbar. Deren Fähigkeit Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen, macht Kupfer potenziell toxisch, da reduzierter Sauerstoff in weiteren Reaktionen zu diversen reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS, engl. „reactive oxygen species“) reagieren kann (Valentine *et al.*, 1998; Fridovich, 1999). Dabei katalysiert Kupfer die Umsetzung von Sauerstoff (O<sub>2</sub>) zum Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), das auch als Superoxid-Radikal bezeichnet wird (Abb. 1a).

Der Begriff ROS beinhaltet Moleküle und freie Radikale (chemische Spezies mit einem ungepaarten Elektron), die von Sauerstoff abstammen. Molekularer Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ist ein Bi-Radikal mit zwei ungepaarten Elektronen in der äußeren Elektronen-Schale. In diesem Grundzustand (als Triplett-Sauerstoff bezeichnet) haben die beiden ungepaarten Elektronen den selben „Spin“. Zeigen zwei Elektronen den selben Spin, kann nur eines von ihnen zu einem Zeitpunkt eine Bindung mit einem ungepaarten Elektron eines anderen Moleküls eingehen. Triplett-Sauerstoff kann nur mit einem Elektron zu einem Zeitpunkt reagieren. Die Reaktivität gegenüber Doppel-Bindungen ist demnach nicht sehr hoch, da für die Reaktion mit einer Doppel-Bindung zwei reaktive Elektronen benötigt würden. Wird jedoch eines der beiden ungepaarten Elektronen des Triplett-Sauerstoffs angeregt, ändert es seinen „Spin“. Der resultierende Singulett-Sauerstoff hat zwei ungepaarte Elektronen mit unterschiedlichem „Spin“. Er ist ein sehr starkes Oxidationsmittel, da die beiden ungepaarten Elektronen zugleich reagieren können und somit hervorragend geeignet sind Doppel-Bindungen anzugreifen.

Superoxid-Radikale schädigen Biomoleküle, indem sie Elektronen auf diese übertragen und damit ungewollte Folgereaktionen induzieren. Alternativ kann Superoxid durch Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoff-Peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) umgesetzt werden (Abb. 1b), das entweder durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff gespalten wird (Abb. 1c) oder entsprechend der Fenton-Reaktion zum Hydroxyl-Radikal (OH<sup>•</sup>) reagiert (Abb. 1d). Hydroxyl-Radikale können mit Wasserstoff-Peroxid wiederum Superoxid-Radikale regenerieren (Abb. 1f).



**Abbildung 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).** Kupfer(I)-Ionen reagieren mit Sauerstoff zu Kupfer(II)-Ionen und Superoxid-Anionen (a). Superoxid reagiert mit Protonen zu Wasserstoff-Peroxid (b), das mit Kupfer (d) bzw. Eisen (e), entsprechend der Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen beiträgt. Hydroxyl-Radikale und Wasserstoff-Peroxid sind in der Lage Superoxid-Radikale zu regenerieren (f). Alternativ kann Wasserstoff-Peroxid durch die Katalase zu Wasser und Sauerstoff gespalten werden (c). ROS können in Proteinen Eisen-Schwefel-Cluster angreifen (g), dies führt zur Freisetzung von Eisen(II)-Ionen, welche wiederum in die Fenton-Reaktion (e) eingespeist werden können.

Superoxid-Radikale oxidieren [4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Cluster diverser Proteine (Abb. 1g) wodurch zweiwertiges Eisen freigesetzt wird. Eisen propagiert die Fenton-Reaktion zusätzlich, was erneut zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führt (siehe Abb. 1e; Liochev und Fridovich, 1999).

Die durch Eisen katalysierte Bildung von Hydroxyl-Radikalen wurde erstmals 1894 von Fenton beschrieben und nach ihrem Erfinder als „Fenton-Reaktion“ benannt (Halliwell und Gutteridge, 1989).

[4Fe-4S]-Eisen-Schwefel-Cluster sind Zentren innerhalb eines Polypeptides, in dem sich vier negativ geladene Cystein-Reste (Seitenkette S<sup>-</sup>) und anorganische Sulfid-Ionen (S<sup>2-</sup>) so anordnen, daß sie in der Lage sind, vier Eisen-Ionen in einer kubischen Struktur zu binden. Dabei schirmen die negativen Ladungen der Aminosäuren die positiven Ladungen der Eisen-Ionen ab, was zur Stabilisierung derartiger Zentren führt. Bei der Bezeichnung [4Fe-4S] werden nur die anorganischen Schwefel-Atome gezählt, die Zahl beteiligter Cystein-Reste kann differieren.

Hydroxyl-Radikale sind extrem reaktiv, sie oxidieren essenzielle Bestandteile der Zelle wie DNA, Proteine, Polysaccharide und Lipide. Derartige Schäden begünstigen Mutationen des Erbguts und können Apoptose induzieren (Gosslau und Rensing, 2002).

Sicherlich induzieren ROS eine Reihe zellschädigender Wirkungen, sie werden allerdings auch für diverse Reaktionen benötigt: Beispielsweise existieren in eukaryontischen Zellen Systeme, die Superoxid und in Folge dessen ROS produzieren. In Leukozyten katalysiert die NADPH-Oxidase die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxid, welches zur Pathogen-Abwehr dient (Park und Babior, 1997). In diversen Signal-Kaskaden fungieren ROS als Botenstoffe (Irani *et al.*, 1997). Auch in den Signal-Kaskaden der Apoptose scheinen ROS eine wichtige Rolle zu spielen (Polyak *et al.*, 1997).

Für die Kupfer-induzierte Bildung von ROS sind vor allem freie Ionen relevant, da diese nah an Biomoleküle herankommen und Elektronen übertragen. Es konnte gezeigt werden, daß pro Hefezelle von den vorhandenen  $4 \cdot 10^5$  Kupfer-Ionen weniger als ein Kupfer-Ion frei vorliegt (Rae *et al.*, 1999). Weiterhin belegen neuere Untersuchungen einen relativ großen Kupfer-„Pool“ in der mitochondrialen Matrix. Dieses Kupfer scheint nicht mit Proteinen assoziiert zu sein, da die Absenz bekannter mitochondrialer Kupfer-bindender Proteine (COX2, COX17, COX19, SCO1 bzw. CCS) dieses Kupfer-Reservoir nicht beeinflusst (Cobine *et al.*, 2004).

Die Kupfer-Ionen des mitochondrialen Kupfer-Reservoirs liegen in anionischer Form vor. Die Masse dieses Kupfer-Komplexes wurde durch Säulen-Chromatographie auf etwa 10 kDa berechnet. Ein mit Kupfer assoziiertes Protein konnte dabei weder photometrisch noch massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Möglicherweise ist das Kupfer des mitochondrialen „Pools“ mit einer organischen Säure (Citrat, Oxalacetat etc.) komplexiert. Nur etwa 10% des mitochondrialen Kupfers sind mit der COX assoziiert, 90% sind Teil des Kupfer-„Pools“, andere mitochondriale Kupfer-bindende Proteine sind vernachlässigbar (Cobine *et al.*, 2004).

Welcher Natur das mitochondriale Kupfer-Reservoir ist, und welchen Anteil dessen Kupfer(I)-Ionen an der ROS-Produktion haben, bleibt noch zu bestimmen.

Neben zellulären Metall-Ionen existiert eine weitere endogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies: Die Atmungskette. Dabei werden vor allem die Komplexe I und III für die Bildung von ROS verantwortlich gemacht (siehe 1.2.1).

## 1.1.2 Regulation der zellulären Kupferhomöostase

Die präzise Kontrolle der Kupferhomöostase gewährleistet einerseits die ausreichende Versorgung der Zelle mit Kupfer. Andererseits wird die intrazelluläre Kupferkonzentration niedrig gehalten, um Reaktionen, deren Produkte Biomoleküle schädigen, zu minimieren. An erster Stelle der Regulation der Kupferhomöostase steht dabei die Aufnahme von Kupfer aus dem extrazellulären Milieu.

### 1.1.2.1 Import von Kupfer

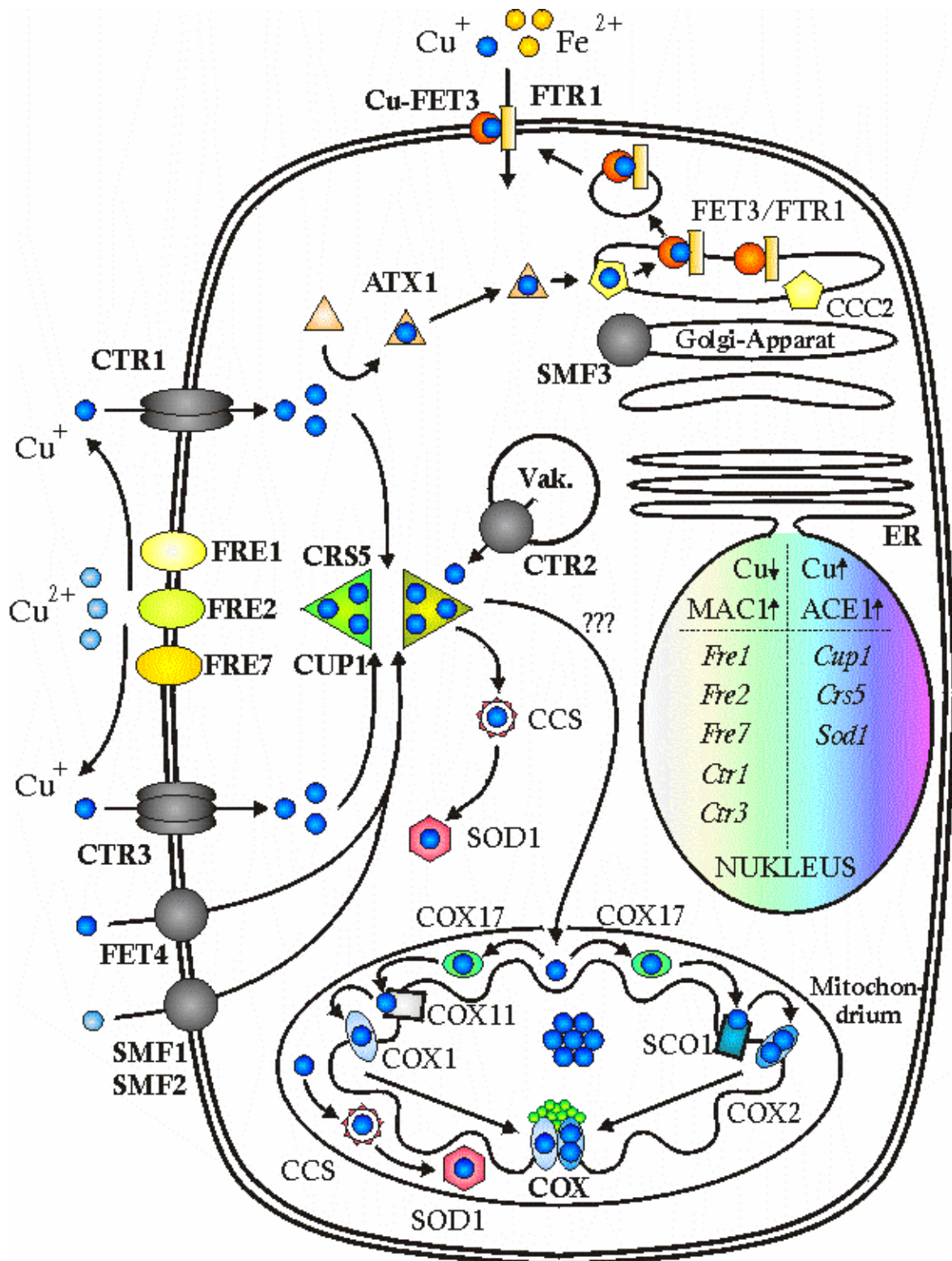
Da Kupfer im wässrigen Milieu in der Regel zweiwertig vorliegt (siehe 1.1), muss es für hochaffine Transporter (die den Großteil des Kupfers importieren) zunächst reduziert werden.

Kupfer-Transporter, die Kupfer vom extrazellulären Milieu in das Zytoplasma importieren, lassen sich entsprechend ihrer Transporteigenschaften in zwei Gruppen einteilen. Kupfer-Transporter mit hoher Affinität transportieren Kupfer aktiv, unter Verbrauch von Desoxy-Adenosin-Triphosphat (ATP), in die Zelle. Dieser Transport erfolgt gegen den Konzentrations-Gradienten. Hochaffine Kupfer-Transporter befördern lediglich Kupfer(I)-Ionen, da diese aufgrund ihrer geringeren Ladung leichter durch die Zytoplasma-Membran transportiert werden können. Niedrigaffine Kupfer-Permeasen importieren Kupfer viel langsamer als hochaffine Transporter. Dabei wird Kupfer entweder entlang des Konzentrations-Gradienten in die Zelle transportiert (erleichterte Diffusion) oder es wird der Konzentrations-Unterschied anderer Ionen (z. B. Kalium(I)-Ionen, Protonen) als treibende Kraft des Kupfer-Imports genutzt. Niedrigaffine Kupfer-Permeasen transportieren einwertiges und zweiwertiges Kupfer.

In *S. cerevisiae* sind die Zytoplasmamembran-Reduktasen FRE1 (aus dem englischen „ferric reductase“) und FRE2 – sowie die Reduktase FRE7, deren zelluläre Lokalisation fraglich ist – für die Reduktion von Kupfer zuständig (Dancis *et al.*, 1992; Georgatsou *et al.*, 1997; Hassett und Kosman, 1995; Martins *et al.*, 1998; siehe Abb. 2).

### Hochaffine Kupfer(I)-Permeasen

Reduziertes, einwertiges Kupfer kann von verschiedenen Systemen in die Zelle aufgenommen werden (siehe Tab. 2). In *S. cerevisiae* ist CTR1 in der Zytoplasma-Membran lokalisiert, enthält drei Transmembran-Domänen, einen hydrophilen Methionin-reichen Amino-Terminus und ein konserviertes MXXXM Motiv in der zweiten Domäne (Puig und Thiele, 2002). CTR1 bildet Homodimere, durch deren inneren Kanal Kupfer in das Zytoplasma transportiert wird. Die benötigte Energie liefert die Hydrolyse von Desoxy-Adenosin-Triphosphat (ATP) (Dancis *et al.*, 1994A; Dancis *et al.*, 1994B; siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Schema der intrazellulären Kupferhomöostase in *S. cerevisiae*.** Eine Reihe von Protein-Faktoren sind an der präzisen Regulation der zellulären Kupfer-Homöostase beteiligt. Bei niedriger intrazellulärer Kupfer-Konzentration wird der Transkriptionsfaktor MAC1 aktiv und stimuliert die Transkription der Gene der Kupfer-Reduktion (*Fre1*, *Fre2*, *Fre7*) und der hochaffinen Kupfer-Aufnahme (*Ctr1*, *Ctr3*). Zugleich ist der Transkriptionsfaktor ACE1 inaktiv. Im Falle hoher intrazellulärer Kupfer-Konzentration wird MAC1 reprimiert und ACE1 aktiv. ACE1 exprimiert die Gene der Kupfer-Speicher-Proteine (*Cup1*, *Crs5*) und der Cu/Zn-SOD (*Sod1*).

Neben den hochaffinen Kupfer(I)-Permeasen (CTR1, CTR3) wird Kupfer auch über niedrigaffine Transporter in das Zytoplasma transportiert (Cu<sup>+</sup>: FET3/FTR1, SMF1, SMF2, SMF3; Cu<sup>2+</sup>: CTR2, FET4). Das zytoplasmatische Kupfer-Reservoir ist mit CUP1 und CRS5 assoziiert. CCS versorgt die Cu/Zn-SOD, ATX1 und CCC2 die Eisen-Reduktase FET3, COX17 und COX11 die COX Untereinheit I und COX17 und SCO1 die COX Untereinheit II mit Kupfer-Ionen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Neben *S. cerevisiae* wurde CTR1 in diversen Pilzen wie *C. albicans* (Marvin *et al.*, 2003) und in Säugern wie Maus und Mensch (Lee *et al.*, 2000; Zhou und Gitschier, 1997) beschrieben (Übersicht in Sharp, 2003). Das humane hCTR1 ist wie sein Hefe-Ortholog CTR1 als Homo-Oligomer in der Zytoplasma-Membran lokalisiert (Lee *et al.*, 2002a). Es transportiert Kupfer ohne ATP-Verbrauch. Die benötigte Energie wird durch den Einstrom von Kalium und Protonen-Ausstrom geliefert, auf diese Weise stimulieren ein niedriger extrazellulärer pH-Wert und eine hohe extrazelluläre  $K^+$ -Konzentration den Kupfer-Transport (Lee *et al.*, 2002a). In *Drosophila melanogaster* wurden drei Gene für CTR1-Homologe gefunden: *Ctr1a*, *Ctr1b* und *Ctr1c* unterscheiden sich in ihrem Expressions-Muster und ihren Expressions-Spannen während der Ontogenese (Zhou *et al.*, 2003; siehe 1.2.3.1).

*Ctr1a* wird in *D. melanogaster* während der gesamten Lebensspanne konstitutiv exprimiert. *Ctr1b* wird nur während der späten embryonalen und den larvalen Phasen der Entwicklung exprimiert, seine Expressionsrate hängt vom Kupfer-Gehalt der Nahrung ab. Die Expression von *Ctr1c* konnte lediglich in späten larvalen Entwicklungs-Phasen und in erwachsenen männlichen Fliegen nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2003).

Der zweite bekannte hochaffine Kupfer(I)-Importer der Hefe ist CTR3. Seine Expression supprimiert eine CTR1 Nullmutante im Hefesystem. Wie CTR1 ist auch CTR3 integraler Bestandteil der Zytoplasma-Membran (siehe Abb. 2). Ein CTR3-Trimer bildet einen zentralen  $Cu^+$ -Kanal und fungiert dadurch als ATP-abhängige Kupfer(I)-Permease (Knight *et al.*, 1996; Pena *et al.*, 2000).

*Ctr3* ist in den meisten *S. cerevisiae*-Laborstämmen durch ein Ty2-Transposon inaktiviert. Dabei trennt das 6 kbp lange Ty2-Element den Promotor vom Leserahmen. In Hefe-Stämmen mit funktionellem *Ctr3* wiesen fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen CTR3 in der Zytoplasma-Membran und in Vesikeln zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat nach (Knight *et al.*, 1996).

In *P. anserina* wurde ein Ortholog zu *Ctr3* beschrieben. Die heterologe Expression von *PaCtr3* revertiert eine Hefe Doppel-Nullmutante mit disruptierten *Ctr1*- und *Ctr3*- Genen. Die hochaffine *P. anserina* Kupfer(I)-Permease PaCTR3 hat eine Masse von 21,1 kDa, enthält vermutlich zwei transmembrane  $\alpha$ -Helices und zeigt auf Aminosäure-Ebene 34% bzw. 33% Identität zu CTR3 aus *S. cerevisiae* bzw. CTR4 aus *S. pombe* (Borghouts *et al.*, 2002A; Borghouts *et al.*, 2002b).

### **Niedrigaffine Kupfer-Permeasen**

Neben hochaffinen Kupfer(I)-Permeasen wurde eine Reihe niedrigaffiner Kupfer-Transporter charakterisiert. Der niedrigaffine Kupfer(I)-Transporter COPT1 wurde zuerst in *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Die Expression der *Copt1*-cDNA supprimiert die *Ctr1-3* Null-Mutation der Hefe. *Copt1* erwies sich als ein Ortholog des Hefe-Gens *Ctr2* (Kampfenkel *et al.*, 1995). CTR1, CTR2 und COPT1 enthalten alle drei Transmembran-Domänen und eine Reihe konservierter Aminosäuren (Kampfenkel *et al.*, 1995; Rees *et al.*, 2004). CTR2 ist im

Gegensatz zu CTR1 nicht an der Oberfläche der Zelle, sondern in der Membran der Vakuole lokalisiert. Es mobilisiert Kupfer wahrscheinlich aus dem Inneren der Vakuole und transportiert es in Richtung Zytoplasma (Portnoy *et al.*, 2001; Rees *et al.*, 2004).

Der Nachweis, das CTR2 in der Membran der Vakuole lokalisiert ist, wurde fluoreszenzmikroskopisch und durch fraktionierende Zentrifugation erbracht (Rees *et al.*, 2004). Die Deletion von *Ctr2* führt in Hefe zu erhöhter Akkumulation von Kupfer in der Vakuole und zu gesteigerter Kupfertoleranz, wohingegen die Überexpression von *Ctr2* erhöhte Resistenz gegen Kupfermangel verleiht (Kampfenkel *et al.*, 1995; Rees *et al.*, 2004). Diese Befunde untermauern die Annahme, daß CTR2 Kupfer aus der Vakuole mobilisiert.

In *P. anserina* kodiert *PaCtr2* vermutlich ebenfalls eine niedrigaffine Kupfer-Permease: PaCTR2 hat eine Masse von 18 kDa und vermutlich zwei transmembrane  $\alpha$ -Helices. Auf Aminosäure-Ebene zeigt PaCTR2 zu COPT1 (*A. thaliana*), CTR2 (*S. cerevisiae*) bzw. hCTR2 (Mensch) 28%, 18% bzw. 17% Identität (Borghouts *et al.*, 2002a).

Neben CTR2 wurde in Hefe auch der niedrigaffine Kupfer(I)-Transporter FET4 (englisch: „Fe transport“) beschrieben. FET4 besteht aus sechs Transmembran-Domänen und ist in der Plasma-Membran lokalisiert, neben Eisen(II)-Ionen importiert er auch Kupfer(I)-Ionen in das Cytoplasma (Dix *et al.*, 1994; Hassett *et al.*, 2000).

**Tabelle 2: Kupfer-Transporter eukaryontischer Zellen.**

Bezeichnung	Homologe	Spezies	Cu <sup>+</sup> /Cu <sup>2+</sup>	Referenz
<b><u>Hochaffine Kupfer-Transporter</u></b>				
CTR1	CTR1	<i>S. cerevisiae</i>	Cu <sup>+</sup>	Dancis <i>et al.</i> , 1994B
CTR3	CTR3 PaCTR3	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. anserina</i>	Cu <sup>+</sup> Cu <sup>+</sup>	Kinght <i>et al.</i> , 1996 Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
<b><u>Niedrigaffine Kupfer-Transporter</u></b>				
CTR2	CTR2 PaCTR2 COPT1	<i>S. cerevisiae</i> <i>P. anserina</i> <i>A. thaliana</i>	Cu <sup>+</sup> Cu <sup>+</sup> Cu <sup>+</sup>	Rees <i>et al.</i> , 2004 Borghouts <i>et al.</i> , 2002A Kampfenkel <i>et al.</i> , 1995
FET4	FET4	<i>S. cerevisiae</i>	Cu <sup>+</sup>	Hassett <i>et al.</i> , 2000
SMF1	SMF1 DCT1	<i>S. cerevisiae</i> <i>Rattus norvegicus</i>	Cu <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup>	Cohen <i>et al.</i> , 2000 Gunshin <i>et al.</i> , 1997
SMF2	SMF2	<i>S. cerevisiae</i>	Cu <sup>2+</sup>	Cohen <i>et al.</i> , 2000
SMF3	SMF3	<i>S. cerevisiae</i>	Cu <sup>2+</sup>	Cohen <i>et al.</i> , 2000

In Hefe wurden Kupfer(II)-Permeasen der SMF-Familie (englisch: "suppressor of *mif1*") charakterisiert (West *et al.*, 1992).

*Smf1* wurde ursprünglich als "high copy number" Suppressor einer *mif1-1*-Mutante kloniert. In *mif1*-Stämmen (*mif*, aus dem englischen: "mitochondrial import function") wird eine Temperatur-sensitive Form des PEP (aus dem englischen: "processing enhancing protein of mitochondria") gebildet. In Wild-Stämmen dient PEP der proteolytischen Abspaltung N-terminaler Signal-Peptide von Vorläufer-Proteinen, die in die mitochondriale Matrix importiert werden sollen (West *et al.*, 1992).

*Smf1*, *Smf2* und *Smf3* kodieren für hydrophobe Proteine mit den Molekülmassen 63,3 kDa, 59,8 kDa und 51,8 kDa. SMF1, SMF2 und SMF3 weisen auf Proteinebene über 50% Identität zueinander auf, sie enthalten etwa dieselbe Anzahl (8-10) putativer Transmembrandomänen (Cohen *et al.*, 2000). Im Säuger-Homolog von SMF1 - DCT1 - werden 12 Transmembrandomänen vermutet. Auch in ihrer Funktion ähneln sich die Mitglieder der SMF-Familie. SMF1 ist ein unspezifischer Transporter zweiwertiger Metall-Ionen. Neben  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen importiert SMF1 auch  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Pb}^{2+}$  in das Zytoplasma (Chen *et al.*, 1999; Cohen *et al.*, 2000; Gunshin *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Supek *et al.*, 1996; Supek *et al.*, 1997).

Wie SMF1 transportieren auch SMF2 und SMF3 zweiwertige Metall-Ionen. Ihre Spezifität unterscheidet sich jedoch teilweise von SMF1.

In Hefe sind einzelne Null-Mutationen der Gene *Smf1*, *Smf2* oder *Smf3* nicht letal. Bei Zugabe von 3 mM EGTA stellen die Mutanten das Wachstum ein. Die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  supprimiert die Wirkung von EGTA, alle drei *Smf*-Mutanten zeigen Wachstum. Auch eine Dreifach-Mutante, deren Gene *Smf1*, *Smf2* und *Smf3* deletiert wurden, nimmt nach Kupfer(II)-Zugabe erneut das Wachstum auf (Cohen *et al.*, 2000). EGTA ist ein Chelator zweiwertiger Metall-Ionen und wird dazu benutzt, sämtliche zweiwertigen Ionen des extrazellulären Milieus zu komplexieren, so daß den entsprechenden Metall-Transportern kein Substrat mehr zur Verfügung steht. EGTA erzeugt eine künstliche Verknappung zweiwertiger Metall-Ionen im Medium.

Die Mitglieder der SMF-Familie unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung. SMF1 und SMF2 sind in der Zytoplasma-Membran der Zelle lokalisiert, SMF3 wurde dagegen in den Membranen des Golgi-Apparates und in post-Golgi-Vesikeln gefunden. Für SMF3 wird eine Funktion in der Kupfer-Homöostase des Golgi-Apparates postuliert. Vermutlich transportiert SMF3 Kupfer durch die Membran des Golgi-Apparates bzw. der Vakuole in das Zytoplasma (Cohen *et al.*, 2000; Portnoy *et al.*, 2000).

### **Regulation des Kupfer-Imports**

In Hefe sind ACE1 (siehe 1.1.2.2) und MAC1 die zentralen Regulatoren der Kupfer-Homöostase. Der Transkriptionsfaktor MAC1 wird selbst durch Kupfer moduliert. Ein MAC1-Monomer benötigt mindestens ein Kupfer(I)-Ion, um an DNA binden zu können (Heredia *et al.*, 2001). Die Bindung weiterer Kupfer-Ionen reduziert die DNA-Bindefähigkeit von MAC1 und führt damit zu geringerer Transkription der MAC1-Zielgene. MAC1 unterscheidet physiologische und toxische Kupferspiegel (Heredia *et al.*, 2001; Jungmann *et al.*, 1993; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997).

Zielgene von MAC1 kodieren die Kupfer-Reduktasen FRE1, FRE2 und FRE7 (Georgatsou *et al.*, 1997). Ohne diese Reduktasen stände den Kupfer(I)-Permeasen kaum einwertiges Kupfer zur Verfügung (siehe 1.1). MAC1 kontrolliert damit bereits den ersten Schritt des Kupfer-Imports. Die Kupfer-Importer CTR1 und CTR3 sind ebenfalls Zielgene von MAC1, dessen



Dimere an die Kupfer-Sensor-Elemente (CuRE, engl. „copper response elements“) der Promotoren binden. Zwei solcher synergistisch wirkender CuREs (5'- TTTGCTCA -3') sind ausreichend um *Ctr1* zu exprimieren (Jensen *et al.*, 1998; Labbe *et al.*, 1997).

Neben seiner Funktion als Kupfer-sensitiver Transkriptionsfaktor ist MAC1 auch ein Modulator der Protein-Degradation. In Hefe reguliert MAC1 einerseits die Expression von *Ctr1*, andererseits induziert MAC1 die Degradation von CTR1 bei intrazellulärem Kupfer-Überschuss (Yonkovich *et al.*, 2002).

Im Hefe-Stamm ZY60 sind die endogenen Kopien von *Mac1*, *Ctr1* und *Ctr3*-disruptiert. *Ctr1* wird unter Kontrolle des *Gall*-Promotors konstitutiv exprimiert. Dieser Stamm wurde zuerst unter Kupfer-Mangel angezogen, anschließend wurde die Kupfer-Konzentration des Mediums auf 100 µM erhöht. Western-Analysen zeigten, daß die Menge an zellulärem CTR1 zwei Stunden nach Kupfer-Zugabe nicht abnahmen. Wird in Stamm ZY60 zusätzlich *Mac1* konstitutiv exprimiert, zeigt sich nach Kupfer-Zugabe rasche Degradation des CTR1-Proteins. Dieser Befund belegt, daß MAC1 bei hohen intrazellulären Kupfer-Spiegeln die Degradation von CTR1 induziert (Yonkovich *et al.*, 2002).

Während CTR3 relativ grob reguliert wird (Transkriptionsebene), kann durch die Modulation der Degradation von CTR1 eine Feinabstimmung des zellulären Kupferspiegels vorgenommen werden. Der humane Kupfertransporter hCTR1 unterliegt einer weiteren Ebene der Regulation. Seine Aktivität wird durch seine Lokalisation kontrolliert. Dabei ist der Ortswechsel des hCTR1 zwischen Zytoplasma-Membran (Kupfer-Mangel: hCTR1 wirkt als Kupfer-Importer) und intrazellulären Vesikeln (Kupfer-Überschuß: Zwischenlagerung des hCTR1) beschrieben worden (Klomp *et al.*, 2002).

Bezogen auf die Menge des in die Zelle aufgenommenen Kupfers scheinen CTR2, SMF1, SMF2, SMF3 und FET4 eine untergeordnete Rolle zu spielen. Dies gilt auch für den Kupfer-Transporter PaCTR2 aus *P. anserina* (Borghouts *et al.*, 2002a).

In *P. anserina* kontrolliert vor allem der Transkriptionsfaktor GRISEA die Kupfer-Homöostase. GRISEA zeigt Homologie zu MAC1 (Jungmann *et al.*, 1993) und zu ACE1 (Thiele, 1988). Innerhalb eines etwa 40 Aminosäuren langen, N-terminalen, Cystein-reichen, essenziellen Bereichs zeigt das 597 AS lange GRISEA-Protein 54% Identität zu MAC1 und 46% Identität zu ACE1 (Osiewacz und Nuber, 1996). In einer *Mac1*-Nullmutante der Hefe ist GRISEA in der Lage *Ctr1*, ein Zielgen von MAC1, zu regulieren. GRISEA ist ein Ortholog von MAC1 (Borghouts und Osiewacz, 1998). Die Analyse der Expressionsmuster zweier Zielgene von GRISEA – *PaCtr3* und *PaSod2* – zeigt bei niedrigem intrazellulären Kupfer-Spiegel eine Stimulation der Expression. Bei hoher Kupfer-Konzentration ist GRISEA inaktiv (Borghouts *et al.*, 2002A; Borghouts *et al.*, 2002B; Borghouts *et al.*, 2001).

Der Promotor des *P. anserina* Gens *PaCtr3* enthält CuREs, die entsprechenden Elementen in den Hefe-Genen *Ctr1* und *Ctr3* ähneln (siehe Tab. 3). *PaCtr3* wird vermutlich durch GRISEA

Homo-Dimere reguliert. Die Interaktion von GRISEA-Monomeren wurde durch Zwei-Hybrid-Analysen belegt (Borghouts *et al.*, 2002a). Interessanterweise ist GRISEA auch der alleinige Transkriptionsfaktor der mitochondrialen Mn-SOD. Damit vernetzt GRISEA die Kupfer-Homöostase mit der Kontrolle zellulärer Schutzsysteme (Borghouts *et al.*, 2002B; Borghouts *et al.*, 2001).

**Tabelle 3: Putative CuRE-Elemente in den Promotoren der Zielgene von MAC1 und GRISEA (Borghouts *et al.*, 2002a).** In *S. cerevisiae* bzw. *P. anserina* beinhalten einige Kupfer-regulierte Gene in ihren Promotoren sogenannte CuRE-Elemente. Diese kurzen Sequenzen werden von den Transkriptions-Faktoren MAC1 bzw. GRISEA gebunden. Neben dem Namen des Zielgens und dem (putativen) Binde-Protein sind die Positionen der CuRE-Elemente im Promotor und ihre Sequenzen angegeben. Unterhalb ist die vermutliche Konsensus-Sequenz (IUPAC-Kode) angegeben.

Spezies	Zielgen	Regulator	Position	Sequenz (5' → 3')
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ctr1</i>	MAC1	- 334	TTTGGCTCA
			- 302	TTTGGCTCA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Ctr3</i>	MAC1	- 232	TTTGGCTCG
			- 177	ATTGGCTCG
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Fre1</i>	MAC1	- 297	TTTGGCTCA
			- 269	TTTGGCTCA
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Fre7</i>	MAC1	- 342	ATTGGCGCT
			- 177	ATTGGCGCA
			- 166	ATTGGCGCT
			- 117	CTTGGCTCA
<i>P. anserina</i>	<i>PaCtr3</i>	GRISEA	- 859	TGTTGCTCA
			- 838	AGTTGCTCT
<i>P. anserina</i>	<i>PaSod2</i>	GRISEA	- 1050	GTTTGCTCA
			- 681	GTTTGCTCA
Konsensus-Sequenz, <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. anserina</i> :				<b><u>DKTTGCKCD</u></b>

*PaCtr2* wird in *P. anserina* von GRISEA unabhängig exprimiert, die Transkription erfolgt generell nur auf sehr geringem Niveau, es kodiert vermutlich eine niedrigaffine Kupfer-Permease (Borghouts *et al.*, 2002a). Ohne Expression von *PaCtr3* kann PaCTR2 die Zelle nicht mit einer dem Wild-Stamm entsprechenden Kupfer-Menge versorgen (Borghouts *et al.*, 2002a). Eine entsprechend Situation herrscht in Mutante *grisea* (siehe 1.3.2). Es kann allerdings keineswegs ausgeschlossen werden, daß in *P. anserina* neben PaCTR2 weitere niedrigaffine Systeme zur Kupfer-Aufnahme existieren.

### 1.1.2.2 Kupfer-Metabolismus

#### Speicherung von Kupfer

Kupfer kann von Speicher-Proteinen komplexiert und/oder von Metallo-Chaperonen zu Kupfer-abhängigen Proteinen transportiert werden.

Chaperone sind Proteine, die entweder für die Faltung von Proteinen sorgen, oder für den Transport von Metallionen zu bestimmten Kompartimenten der Zelle benötigt werden. Metallo-Chaperone binden Kationen (z.B.  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Mn}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  etc.), schirmen sie ab und übergeben sie an andere Biomoleküle.

Die sogenannten Metallothioneine sind kleine Cystein-reiche Proteine, deren Funktion unter anderem in der Speicherung von Zink, Kupfer bzw. Schwermetall-Ionen liegt.

Durch die Komplexierung einer Reihe von Schwermetall-Ionen (Kupfer, Cadmium, Quecksilber) tragen Metallothioneine zur Protektion gegen deren toxische Wirkungen bei (Kagi und Vallee, 1960). Metallothioneine zeigen zudem antioxidative Aktivität: Die 20 Thiol-Gruppen innerhalb eines Metallothioneins sind unter physiologischen Bedingungen mit Metall-Ionen koordiniert, und können deshalb an keinen weiteren Reaktionen teilnehmen. Trotzdem detoxifizieren Metallothioneine Hydroxyl-Radikale etwa 300 mal effektiver als Glutathion (Sato, 1992). In Mäusen, deren *Sod1*-Gen deletiert ist, kommt es zu verstärkter Expression der Metallothionein-Gene *Mt-I* und *Mt-II*. Beide Befunde untermauern die Bedeutung der Metallothioneine im Abbau von ROS (Ghoshal *et al.*, 1999). Für das MT-III der Säuger wird eine Rolle als unspezifischer Suppressor der Zell-Proliferation diskutiert (Quaife *et al.*, 1998). Weiterhin wurde postuliert, daß Metallothioneine aufgrund ihres reduzierenden Potenzials mit mehreren Schutzsystemen der Zellen (Kagi, 1993) und dem Immun-System in Zusammenhang stehen (Bui *et al.*, 1994; Cui *et al.*, 1998).

Die Cystein-Reste (Anordnung CC, CXC bzw. CXXC) der Metallothioneine sind in der Lage, Kupfer effizient zu komplexieren. CUP1 ist ein kleines (53 AS), Cystein-reiches Metallothionein der Hefe, dessen Transkription durch hohe intrazelluläre Kupfer-Spiegel induziert wird. Es enthält 12 Cystein-Reste (10 davon essenziell) und bindet pro Polypeptid acht  $\text{Cu}^+$ - bzw. acht  $\text{Ag}^+$ -Ionen. Alternativ kann CUP1 vier  $\text{Cd}^{2+}$ - bzw. vier  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen binden (George *et al.*, 1988; Hamer *et al.*, 1985; Winge *et al.*, 1985). Die Amplifikation des *Cup1*-Locus erhöht die Toleranz gegenüber steigenden extrazellulären Kupferspiegeln (Fogel und Welch, 1982).

Ein weiteres Metallothionein der Hefe ist CRS5. Dieses CUP1-Homolog zeigt hohe Übereinstimmung zu den Metallothioneinen der Säuger bzw. Invertebraten. *Crs5* wird durch Kupfer und oxidativen Stress reguliert. *Cup1* und *Crs5* sind Zielgene von ACE1, der die Transkription seiner Zielgene bei hohem intrazellulären Kupfer-Spiegel durch Bildung eines polynukleären Kupfer(I)-Cysteinyl-Thiolat-„Clusters“ initiiert (Culotta *et al.*, 1994; Dameron *et al.*, 1991).

Ein solcher polynukleärer Kupfer(I)-Cysteinyl-Thiolat-„Cluster“ enthält sechs bis sieben Kupfer(I)-Ionen, die in trigonaler Geometrie mit den SH-Gruppen der Cystein-Reste koordiniert sind. Dieses Kupfer-Zentrum organisiert und stabilisiert die Konformation der N-terminalen Domäne von ACE1, um DNA spezifisch binden zu können. Damit gleicht dieses Kupfer-Bindezentrum dem der Metallothioneine (Dameron *et al.*, 1991).

Während MAC1 durch Kupfermangel aktiviert wird und den Kupfer-Import reguliert (MAC1 → *Ptr1*, *Ptr3*, *Fre1*, *Fre2*, *Yfr055w*; sowie *Fre7* und *Yjl217w* ohne bekannte Funktion), wird ACE1 bei Kupferüberschuss (ACE1 → *Cup1*, *Crs5* und *Sod1*) aktiv (Georgatsou *et al.*, 1997; Gross *et al.*, 2000; Pena *et al.*, 1998; siehe Abb. 2).

Bei der Cu/Zn-SOD handelt es sich sicherlich nicht um ein klassisches Kupfer-Speicher-Protein, wie dies bei CUP1 und CRS5 der Fall ist. *Cup1*, *Crs5* und *Sod1* sind trotz dieses Unterschiedes alle Zielgene von ACE1 (Pena *et al.*, 1998). Der Transkriptionsfaktor ACE1 wird auch als CUP2 bezeichnet. ACE1/CUP2 wurde ursprünglich als Cu<sup>+</sup>- bzw. Ag<sup>+</sup>-abhängiges DNA-Bindeprotein und als Regulator von CUP1 beschrieben (Buchman *et al.*, 1989; Welch *et al.*, 1989).

Die Metallothioneine filamentöser Pilze zeigen zu den Metallothioneinen CUP1 bzw. CRS5 nur geringe Homologie. In *P. anserina* wurde PaMT1 als Metallothionein identifiziert. Mit einer Länge von 26 Aminosäuren zeigt es zu den Metallothioneinen von *N. crassa* (62%) bzw. *Agaricus bisporus* (55%) relativ hohe Identität (Averbeck *et al.*, 2001; Münger *et al.*, 1985; Münger und Lerch, 1985). Die Identität zum N-Terminus der längeren Metallothioneine des Menschen (MT-II) und der Maus (MT-I) ist mit 41% bzw. 34% weniger ausgeprägt, doch höher als zu CUP1 bzw. CRS5 der Hefe (Durnam *et al.*, 1980; Karin und Richards, 1982). In den Metallothioneinen der Säuger (MT-I, MT-II) und der genannten Pilze sind sieben Cystein-Reste konserviert. Diese Cystein-Reste befinden sich in PaMT1 an identischer Stelle und dienen vermutlich der Bindung von Kupfer. PaMT1 enthält, wie die Mehrzahl der Metallothioneine, keine aromatischen Aminosäuren bzw. Histidin-Reste (Hamer, 1986). In *P. anserina* wird *PaMt1* Kupfer-abhängig exprimiert, bereits die Gabe von 1 µM CuSO<sub>4</sub> in das Medium führt zu einer merklichen Steigerung der Transkriptionsrate von *PaMt1*. Die Gabe von 250 µM MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, bzw. CdCl<sub>2</sub> zeigt keinen Einfluss. PaMT1 ist vermutlich ein für Kupfer spezifisches Metallothionein (Averbeck *et al.*, 2001). Da PaMT1 mit steigendem Alter in höherem Maße exprimiert wird, könnte seine Funktion auch mit Alterungsprozessen in Zusammenhang stehen (siehe 1.3.2).

### **Transport von Kupfer zur Cu/Zn-SOD**

Superoxid-Dismutasen (SODs) sind Enzyme, die Superoxid-Radikale abbauen, sie gehören zu den Schutzsystemen der Zelle gegen ROS. Die Cu/Zn-SOD (SOD1) wirkt Kupfer-Stress auf zwei Arten entgegen: Einerseits reduziert der Einbau des Kofaktors Kupfer die Menge freier Kupfer-Ionen (Schmidt *et al.*, 2000). Andererseits katalysiert die Cu/Zn-SOD den Abbau von Superoxid-Radikalen (siehe 1.1.1.3; Culotta *et al.*, 1995; Fridovich, 1995).

Die Cu/Zn-SOD der Hefe wird spezifisch durch das Kupfer-Chaperon CCS (engl.: „copper chaperone for SOD“) mit Kupfer(I)-Ionen beladen. Eine CCS Nullmutante ist unfähig Kupfer in Apo-Cu/Zn-SOD zu integrieren (Culotta *et al.*, 1997). Die menschliche Cu/Zn-SOD wird ebenfalls durch CCS mit Kupfer beladen, zusätzlich existiert ein CCS-unabhängiger Weg. Bei Deletion des CCS versorgt dieser Cu-GSH-abhängige Weg 25%-50% der Apo-Cu/Zn-SOD mit Kupfer (Carroll *et al.*, 2004).

Hefestämme, deren *Sod1* bzw. *Sod1* und *Lys7* (kodiert CCS) deletiert sind, zeigen signifikante Aktivität der heterolog exprimierten humanen Cu/Zn-SOD. In einer *Lys7*-Nullmutante der Hefe wurde die humane Cu/Zn-SOD heterolog exprimiert, die zusätzliche Deletion von *Gsh1* führte zum Ausfall der Bildung von Glutathion. Ohne Glutathion wurde keinerlei Aktivität der humanen Cu/Zn-SOD gemessen. Um zu belegen, daß die reduzierte Form von Glutathion (GSH) für die CCS-unabhängige Kupfer-Versorgung der humanen Cu/Zn-SOD notwendig ist, wurde in einer *Lys7*-Nullmutanten der Hefe das Gen *Glr1* deletiert. Die Deletion von *Glr1* verschiebt das Gleichgewicht zwischen GSSG und GSH auf die Seite von GSSG. Der entsprechende Stamm enthält lediglich geringe Mengen von GSH, die Aktivität der humanen Cu/Zn-SOD ist stark herabgesetzt (Carroll *et al.*, 2004). Bei Ausfall der CCS wird Kupfer vermutlich direkt von GSH an die Cu/Zn-SOD übergeben, *in vitro* konnte die direkte Kupferübergabe belegt werden (Ciriolo *et al.*, 2001).

In Hefe wurde gezeigt, daß ein Mol CCS bis zu 3.5 Mol Kupfer(I)-Ionen bindet, die Interaktion zwischen CCS und der Cu/Zn-SOD konnte belegt werden. Zur Übergabe des Kupfers bilden CCS und Apo-Cu/Zn-SOD Hetero-Dimere. Dabei steht CCS ein Reservoir aus Kupfer-freiem Apo-Cu/Zn-SOD zur Verfügung (Eisses *et al.*, 2000; Lamb *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; siehe Abb. 2).

Das CCS der Hefe entspricht LYS7, das in der Lysin-Biosynthese die Dehydratation von Homo-Zitrat zu cis-Homo-Aconitat katalysiert. LYS7-Nullmutanten weisen eine Lysin- und Methionin-Auxotrophie auf (Horecka *et al.*, 1995). CCS/LYS7 hat in Hefe zwei Funktionen: Es ist für die Beladung der Cu/Zn-SOD mit Kupfer notwendig und es katalysiert einen Schritt des Lysin-Synthese-Weges.

Auf Aminosäureebene sind CCS und Cu/Zn-SOD im Zentralbereich zu etwa 50% identisch. Obwohl CCS keinerlei Dismutase-Aktivität aufweist, scheinen die Cu/Zn-SOD und ihr Kupfer-Chaperon CCS Homologe zu sein. Wird in CCS die Mutation D200H eingeführt, weist das mutierte CCS deutliche Dismutase-Aktivität auf, ohne seine Funktion als Kupfer(I)-Chaperon zu verlieren (Schmidt *et al.*, 1999).

Durch den Tausch des Aspartats an Position 200 zu Histidin entsteht ein Kupfer-bindendes Zentrum, bestehend aus vier Histidin-Resten, das die Bindung eines Kupfer(I)-Ions ermöglicht. Das nicht-mutierte CCS ist lediglich im Besitz einer Zink-Bindestelle, die derjenigen der Cu/Zn-SOD entspricht. Die Einführung der Kupfer-Bindestelle beeinträchtigt weder die Funktion als Kupfer-Chaperon noch die Dehydrogenase-Funktion bei der Lysin Biosynthese (Schmidt *et al.*, 1999).

Cu/Zn-SOD und CCS sind sowohl im Zytoplasma als auch im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Bis zu etwa 5% der zellulären Cu/Zn-SODs befinden sich im mitochondrialen Intermembranraum, der weniger als 1% des Zellvolumens ausmacht (Stevens, 1981; Sturtz *et al.*, 2001). Auch der Einbau des Kupfers in Apo-Cu/Zn-SOD kann im Zytoplasma bzw. im Intermembranraum erfolgen (siehe Abb. 2). Die aktive Cu/Zn-SOD verbleibt in dem Kompartiment, in dem sie sich gefaltet und ihre Kofaktoren (Kupfer und Zink) aufgenommen hat. Sie wird vermutlich mittels CCS im Intermembranraum zurückgehalten. Dabei hängt der Anteil der mitochondrial lokalisierten Cu/Zn-SOD direkt von der Menge des mitochondrial lokalisierten CCS ab (Field *et al.*, 2003; Sturtz *et al.*, 2001).

Der mitochondriale Intermembranraum ist der aquatische Bereich zwischen innerer und äußerer mitochondrialer Membran. Er ist von Stellen unterbrochen, an denen innere und äußere Membranen in Kontakt treten (Reichert und Neupert, 2002).

Proteine, die in den Intermembranraum gelangen sollen, müssen die äußere mitochondriale Membran passieren. Dies ist jedoch meist nur als ungefaltetes Polypeptid möglich, Proteine müssen wahrscheinlich vor ihrer endgültigen Faltung in den Intermembranraum befördert werden. Proteine des Intermembranraums, die Metall-Ionen als Kofaktoren benötigen, müssen diese Ionen im Inneren des Intermembranraumes inserieren, da sie sich nach Insertion des Metall-Ions um dieses Ion falten, und dadurch eine Tertiärstruktur annehmen, die für den Transport durch die mitochondrialen Membranen zu sperrig ist. Eine Ausnahme bilden sehr kurze Peptide.

## Kupfer-, Eisen-Homöostase und Golgi-Apparat

Der Eisen-Import ist eine weitere zelluläre Funktion, die Kupfer als Kofaktor benötigt. Ebenso wie Kupfer-Ionen zeigen u. a. auch freie Eisen-Ionen hohe Reaktivität, beide sind an der Bildung von ROS beteiligt (siehe 1.1.1.3). Zumindest in Hefe sind Kupfer- und Eisen-Homöostase eng miteinander verbunden.

In Hefe bilden FTR1 und FET3 ein Eisen-Import-System, welches Eisen(II)-Ionen ins Zytoplasma befördert (siehe Abb. 2), FET3 benötigt Kupfer als Kofaktor (Askwith *et al.*, 1994). Dieses Kupfer wird von CTR1 ins Zytoplasma importiert und kann direkt an das Kupfer-Chaperon ATX1 (engl. „antioxidant 1“) weitergegeben werden (Lin und Culotta, 1995; Xiao und Wedd, 2002). Homologe zu ATX1 wurden auch in Tieren und Pflanzen charakterisiert. In *A. thaliana* wird das funktionelle Homolog des Hefe ATX1 als CCH (engl. „Copper Chaperone“) bezeichnet, die Sequenzen beider Proteine stimmen zu 36% überein (Himmelblau *et al.*, 1998). Das ATX1 Homolog der Ratte zeigt mit 35% einen ähnlichen Grad an Identität (Hiromura und Sakurai, 1999). Wohingegen das humane ATX1-Homolog HAH1 (engl. „human ATX homologue 1“) mit 47% die größte Identität zur Hefe zeigt (Klomp *et al.*, 1997). ATX1 gibt Kupfer spezifisch an die Kupfer-transportierende ATPase CCC2 (engl.: „cross-complement  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive phenotype) weiter (Arnesano *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 1995; Xiao und Wedd, 2002).

Sowohl die Interaktion von CTR1 mit ATX1 als auch von ATX1 mit CCC2 wurden belegt (Arnesano *et al.*, 2001; Xiao und Wedd, 2002). *Ccc2* wurde ursprünglich als ein Gen charakterisiert, daß die *Csg1*-Mutation der Hefe komplementiert. Die *Csg1*-Nullmutante wurde durch hohe Sensitivität gegenüber Calcium charakterisiert (Fu *et al.*, 1995). *Atx1* wurde bei der Suche nach Genen identifiziert, deren Produkte antioxidierende Wirkung zeigen. Dabei wurde eine genomische Bank in einer Hefe *Sod1*-Nullmutante überexprimiert, die unter Sauerstoffstress stand. *Atx1* wurde als Repressor der *Sod1*-Mutante charakterisiert, der Resistenz gegenüber Superoxid-Anionen und Wasserstoff-Peroxid verleiht (Lin und Culotta, 1995).

Das CCC2 der Hefe (Homologe in Säugern: ATP7A und ATP7B; siehe 1.1.3.2) befördert Kupfer unter ATP-Verbrauch in das Lumen des Golgi-Apparates (trans-Golgi). In post-Golgi Vesikeln wird Kupfer dann in Apo-FET3 inseriert. Dabei benötigt die Multi-Kupfer-Oxidase FET3 vier Kupfer-Ionen pro Monomer. Die aktive Eisen(II)-Oxidase FET3 bildet mit dem Eisentransporter FTR1 einen Komplex. Der assemblierte Komplex wird vom Golgi-Apparat zur Zytoplasma-Membran transportiert (siehe Abb. 2). Dort dient er dem hochaffinen Eisen(II)-Import (Lin *et al.*, 1997; O'Halloran und Culotta, 2000; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1995). Neben Eisen(II)-Ionen eignen sich auch Kupfer(I)-Ionen als Substrat für die Oxidase FET3 (Shi *et al.*, 2003). FET3 ist dementsprechend ein Kupfer-abhängiges Enzym, das – neben seiner Hauptfunktion, dem Eisen-Import – auch die Aufnahme Kupfer moduliert. Die Regulation der Kupfer- und der Eisen-Homöostase sind u.a. mittels FET3

vernetzt. Die FET3-Homologe der Säuger Ceruloplasmin (siehe 1.1.3.2) und Hephaestin sind ebenfalls Teil der Eisen- und Kupfer-Homöostase.

Das zu FET3 homologe Protein „Hephaestin“ der Säuger ist wie Ceruloplasmin und FET3 eine kupferhaltige Ferroxidase und katalysiert die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$  durch Sauerstoff (Vulpe *et al.* 1999). Ein Mechanismus ähnlich der Eisen-Assimilation in Hefe ist daher in Säugern wahrscheinlich (Nelson, 1999).

FET5 ist eine zu FET3 homologe Multi-Kupfer-Oxidase. Das 622 AS lange FET5 ist zu FET3 auf Aminosäure-Ebene zu 47% identisch. Die Überexpression von *Fet5* supprimiert in Hefe Nullmutanten von *Fet3*, *Fet4* und die *Fet3/Fet4*-Doppel-Nullmutante. FET5 und FET3 sind beide integrale Membranproteine, die Kupfer-abhängige Oxidase-Aktivität aufweisen (Spizzo *et al.*, 1997). Während FET3 Bestandteil der Zytoplasma-Membran ist, ist FET5 vermutlich in der Membran der Vakuole lokalisiert. FET5 bildet dort mit FTH1 (ein FTR1-Homolog) einen Komplex, der der Eisen-Freisetzung aus der Vakuole dient (Urbanowski und Piper, 1999).

### **Kupfer und die Bildung von Pigmenten**

Pigmente sind Moleküle, die Licht absorbieren. Dieses Licht wird entweder absorbiert, um dessen Energie für zelluläre Reaktionen zu nutzen (Photosynthese, Vitamin D-Synthese etc.) oder um Zellbestandteile vor energiereicher Strahlung zu schützen. Prominente Vertreter biologischer Pigmente sind die Melanine.

Die Melanine sind eine Gruppe unterschiedlicher Substanzen, die sich durch ähnliche Eigenschaften auszeichnen (Übersicht in Bell und Wheeler, 1986; Butler *et al.*, 2001). Die Gruppe der Melanine definierte sich ursprünglich durch ihre Resistenz gegenüber: dem Abbau durch heiße, konzentrierte Säuren bzw. Basen; und der Ausbleichung durch stark oxidierende Agenzien (Casadevall *et al.*, 2000). In jüngerer Zeit werden Melanine u. a. durch Elektronen-Spin-Resonanz-Techniken identifiziert. Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts, der Unlöslichkeit in Wasser bzw. organischen Lösungsmitteln und ihrer Heterogenität, war es bisher nicht möglich die Molekular-Struktur eines natürlich vorkommenden Melanins vollkommen aufzuklären (Casadevall *et al.*, 2000). Melanine sind Makromoleküle, die durch oxidative Polymerisierung phenolischer oder indolischer Komponenten gebildet werden. Entsprechende Pigmente sind zumeist braun oder schwarz, sie sind hydrophob und negativ geladen (Übersicht in Langfelder *et al.*, 2003).

Die ersten beiden Schritte der Melanin-Synthese katalysiert in Eukaryonten eine Kupfer-abhängige Tyrosinase. Die Familie der Tyrosinasen wurden in Pilzen, Tieren und Pflanzen beschrieben (Brewer, 1987; Garcia-Borron und Solano, 2002; Seo *et al.*, 2003). Mutationen der menschlichen Tyrosinase führen zu: okulokutanem Albinismus, einer Erbkrankheit, die durch reduzierte oder fehlende Pigmentierung der Haut charakterisiert ist; zu mangelnder Sehkraft aufgrund des Fehlens von optischen Pigmenten in der Netzhaut; zu Fehlern im Wachstum optischer Nervenfasern und zu erhöhter Hautkrebsgefahr (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995).

Während tierische Melanine dem Schutz gegen Licht-induzierte Mutationen dienen, steht Melanin in Pilzen auch mit der Differenzierung reproduktiver Organe und der Sporenbildung in Zusammenhang. Melanin spielt außerdem eine Rolle bei der Virulenz pathogener Pilze und

dem Schutz von verletztem somatischen Gewebe (Bell und Wheeler, 1986; Gadd, 1980; Zimmerman *et al.*, 1995; Übersicht in: Langfelder *et al.*, 2003; Nosanchuk und Casadevall, 2003). In *P. anserina* wurde eine Vielzahl von Pigment-Bildungs-Mutanten charakterisiert. Zwei unterschiedliche Phenoloxidasen, die Tyrosinase und die Laccase wurden bereits vor Dekaden beschrieben (Esser, 1956; Esser 1963a; Esser 1966).

Phenoloxidasen gehören kommen in allen bekannten Organismen vor und sind in vielfältige Aufgaben eingebunden. Sie sind Bestandteil der Immunabwehr bei Wirbellosen sowie essenziell für den Aufbau von Melanin und damit für die Braunfärbung von Haut und Haaren und für den Aufbau des Exoskeletts bei Arthropoden.

Beide sind in *P. anserina* u. a. für die Melanin-Synthese essenziell, unterscheiden sich aber in ihrer Substrat-Spezifität (Esser 1966). Die endogenen Tyrosinasen sind größtenteils inaktiv, können jedoch *in vitro* durch einen Hitzeschock (10 Min. 60°C) aktiviert werden. *P. anserina* besitzt mindestens sieben strukturell unterschiedliche Tyrosinasen bzw. zwei unterschiedliche Laccasen (Esser, 1963b). Die *P. anserina* Mutante *zonata* erzeugt im Vergleich zum Wildstamm große Mengen Tyrosinase. Aus dieser Mutante wurde eine der sieben Tyrosinasen isoliert und charakterisiert. Das Monomer ist etwa 45 kDa schwer, bindet ein Kupfer-Ion (Kupfergehalt etwa 0,2%) und dimerisiert bei höherer Konzentration zu einem Homodimer. Im Rohextrakt liegt die Tyrosinase zu maximal 20% in der aktiven Form vor. Die latente Form der Tyrosinase wird durch eine Konformationsänderung aktiviert (Herzfeld und Esser, 1969).

Die latente und die aktive Form der Tyrosinase zeigen identisches Sedimentationsverhalten. Dementsprechend wird die Aktivierung nicht durch Addition oder Abspaltung von Molekülgruppen bewerkstelligt. Vermutlich führt eine Änderung der Konformation zur Aktivierung der Tyrosinase (Herzfeld und Esser, 1969).

In Pflanzen spielt die Tyrosinase eine Rolle bei der Seneszenz, beispielsweise bei der Braunfärbung von Früchten nach der Ernte (Martinez und Whitaker, 1995).

Auf molekularer Ebene wurde die Tyrosinase über Jahrzehnte eingehend studiert. Beispielsweise ist die Tyrosinase von *Agaricus bisporus* ein etwa 120 kDa schweres Heterotetramer, welches aus zwei schweren und zwei leichten Ketten besteht. Schwere Ketten kommen dabei in den Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  vor.  $H^\alpha$  und  $H^\beta$  bilden demnach zwei Isoformen der Tyrosinase:  $H_2^\alpha L_2$  bzw.  $H_2^\beta L_2$  (Robb und Gutteridge, 1981; Strothkamp *et al.*, 1976). Die humane Tyrosinase läßt sich in drei Domänen unterteilen, eine davon ist die Transmembran-Domäne. Die zentrale Domäne besitzt ein zweikerniges Kupfer-Zentrum, das zur luminalen Seite des Trans-Golgi-Netzwerks hin orientiert ist (Sanchez-Ferrer *et al.*, 1995). Die zwei für die Funktion essenziellen Kupfer-Bindestellen  $Cu_A$  und  $Cu_B$  sind sterisch direkt benachbart. Wird die Sequenz unterschiedlicher Tyrosinasen auf Aminosäure-Ebene verglichen, ist lediglich die zentrale Kupfer-bindende Domäne konserviert. Im aktiven Zentrum der Tyrosinase binden sechs konservierte Histidin-Reste zwei Kupfer-Ionen, die wiederum mit



molekularem Sauerstoff und dem phenolischen Substrat interagieren (Jackman *et al.*, 1991). Die Kristall-Struktur der - der Tyrosinase nah verwandten - Catechol-Oxidase wurde durch Röntgen-Struktur-Analyse aufgeklärt (Gerdemann *et al.*, 2002). Da beide Enzyme fast identische Kupferzentren besitzen, geben die Strukturdaten der Catechol-Oxidase auch Aufschluß über die Organisation der Tyrosinase.

Die Versorgung der Tyrosinase mit Kupfer ist noch nicht in allen Schritten aufgeklärt. Um Kupfer für die Tyrosinase verfügbar zu machen, muss es zuerst aus dem Zytoplasma in die sekretorischen Stoffwechsel-Wege eingeschleust werden. Mit Hilfe menschlicher Zell-Linien konnte gezeigt werden, daß ATP7A für die Aktivität der Tyrosinase essenziell ist. Dabei wirkt ATP7A vermutlich als Kupfer-transportierende ATPase, die Kupfer in das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Dort wird Kupfer vermutlich in die Apo-Tyrosinase inseriert (Petris *et al.*, 2000). ATP7A ist ein Homolog der *S. cerevisiae* ATPase CCC2, deren Rolle im Kupfer-Transport gut charakterisiert ist (siehe oben). ATP7A wird auch als MNK (von „Menkes-Syndrom“ abgeleitet) bezeichnet (siehe 1.1.3.2).

In immortalisierten Menkes-Syndrom Fibroblasten-Zell-Linien Me32 und Me52 wird die cDNA der menschlichen Tyrosinase exprimiert. Verglichen mit normalen Fibroblasten ist ihre Aktivität in den beiden Menkes-Zell-Linien sehr gering. Die Koexpression der cDNA des MNK-Proteins führt zu einem starken Anstieg der Aktivität der Tyrosinase. Dieser Anstieg der Tyrosinase-Aktivität kann allerdings wieder aufgehoben werden: Einerseits durch Zugabe von Kupfer-Chelatoren zum Zell-Medium. Und andererseits durch die Einführung einer Punktmutation in die Phosphorylierungs-Stelle der MNK. Diese Punktmutation verhindert bekanntermaßen den Kupfer-Transport von MNK (Petris *et al.*, 2000).

Die Tyrosinase katalysiert zwei (aufeinanderfolgende) Oxidationsschritte. Im ersten Schritt werden Monophenole durch Sauerstoff zu *o*-Diphenolen hydroxyliert (Monophenolase- bzw. Cresolase-Aktivität, EC 1.14.18.1). Im zweiten Schritt werden *o*-Diphenole zu *o*-Chinonen oxidiert (Diphenolase- bzw. Catecholoxidase-Aktivität, EC 1.10.3.1).

Die Abkürzung EC (engl. „enzyme commission“) wird der Klassifikationszahl von Enzymen vorangestellt. Bei der großen Anzahl bekannter Enzyme ist eine unzweifelhafte Enzym-Nomenklatur erforderlich. Eine solche Nomenklatur wurde von der Internationalen Enzym-Kommission eingeführt. Jedem bekannten Enzym wurde ein "Gebrauchsname" zugeordnet, dazu ein systematischer Name, der sich nach der katalysierten Reaktion richtet, und eine Klassifikationszahl, die eine eindeutige Bestimmung eines Enzyms erlaubt. Die empfohlenen Klassifikationen der Enzyme werden in den Ausgaben von "Enzyme Nomenclature" regelmäßig publiziert.

Ein Beispiel ist die Synthese des DOPA-Melanins: Die Tyrosinase oxidiert L-Tyrosin zu L-Dopamin (L-3,4-Dihydroxy-Phenylalanin), welches zu Dopachinon oxidiert wird. Das resultierende Dopachinon wird anschließend in mehreren Schritten zu DOPA-Melanin umgewandelt (Kobayashi *et al.*, 1995; Raper, 1928; Übersicht in: Langfelder *et al.*, 2003).

## **Kupfer als Kofaktor weiterer Funktionen**

Auch für die im folgenden angesprochenen Stoffwechselwege bzw. Funktionen ist Kupfer ein essenzieller Kofaktor. Die Relevanz dieser Biofunktionen für diese Arbeit besteht vor allem in der Tatsache, daß sie Kupfer als Kofaktor benötigen. Dementsprechend soll an dieser Stelle ein kurzer Überblick über bisher nicht beschriebenen Funktionen gegeben werden.

Kupfer dient der Peptidyl-, der Glycyl- und der  $\alpha$ -aminierenden Monooxidase als Kofaktor. Diese Monooxidasen weisen Ähnlichkeiten zur Tyrosinase auf, sie produzieren neuroaktive bzw. bioaktive Peptide. Dabei aktiviert die Peptidyl-Glycin-Monoxygenase Neuropeptide, während die Dopamin- $\beta$ -Monoxygenase an der Catecholaminen-Biosynthese beteiligt ist.

Als Kofaktor der Lysyl-Oxidase hat Kupfer eine obligate Funktion in der Bildung von Bindegewebe (inklusive Knorpel und Knochen), welches in Tieren Form und Funktion aller Organe erhält. Die Lysyl-Oxidase dient der Quervernetzung von Kollagen.

Kollagen hat bei Säugern den höchsten Anteil aller Proteine. Es ist vor allem in Knorpeln, Knochen, Sehnen sowie Haut enthalten und unentbehrlich für ein stabiles Binde- und Stützgewebe. Wird Kollagen nicht quervernetzt, verliert es seine stabilisierende Funktion im Bindegewebe.

Kupfer ist auch an der Myelinisierung von Nervenfasern und an der Bildung von neutrophilen Granulozyten beteiligt, es ist essenziell für die Bildung von Cholesterin, Lipoproteinen und Enkephalinen.

Die Myelinisierung von Nervenfasern ist für deren Funktion unerlässlich, physikalisch handelt es sich dabei um eine Art von elektrochemischer Isolation der Axone der Nervenzellen, die den Ladungstransport und damit die neurale Signalübermittlung ermöglichen.

Neutrophile Granulozyten sind mit 50 bis 80 Prozent die zahlenmäßig stärkste Art der Leukozyten. Sie sind die wichtigsten Funktionsträger im unspezifischen Abwehrsystem des Blutes. Am Beginn einer Infektion nimmt die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Blut besonders rasch zu ("neutrophile Kampfphase"). Sie phagozytieren Krankheits-Erreger und Gewebetrümmer.

Enkephaline sind kleine Neuropeptide oder Peptidhormone (5 Aminosäurereste lang) mit Morphin-ähnlicher Wirkung auf das Zentralnervensystem. Verschiedene Enkephalin-Spezies entstehen durch Spaltung eines größeren Prä-Pro-Enkephalins durch eine Endopeptidase. Die wichtigsten Vertreter sind Methionin-Enkephalin (Met-Enkephalin; Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) und Leucin-Enkephalin (Leu-Enkephalin; Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu). Enkephaline scheinen im Zentralnervensystem die Weiterleitung von Schmerzimpulsen zu hemmen. Eine Vielzahl anderer physiologischer Funktionen wird vermutet, u.a. Effekte auf Langzeitpotenzierung und Gedächtnisprozesse.

### **1.1.2.3 Transport von Kupfer zu den Mitochondrien**

In den Mitochondrien dient Kupfer der Cytochrom-*c*-Oxidase (COX) als Kofaktor. Das  $Cu_B$ -Zentrum der COX1-Untereinheit enthält ein Kupfer-Ion und die COX2-Untereinheit beinhaltet in ihrem binukleären  $Cu_A$ -Zentrum zwei Kupfer-Ionen (Hensgens *et al.*, 1983; Tsukihara *et al.*, 1995).

Der COX-Komplex besitzt drei mitochondrial-kodierte Untereinheiten und 9-10 Kern-kodierte Untereinheiten. Die großen mitochondrial kodierten Kern-Untereinheiten des COX-Komplexes benötigen mehrere Kofaktoren, unter anderem Kupfer-Ionen. Die Stellen, in denen in funktionellen COX-Komplexen Kupfer-Ionen positioniert sind, werden als  $Cu_A$ - und  $Cu_B$ -Kupfer-Zentren bezeichnet.

## **COX17 dirigiert Kupfer mittels SCO1 und COX11 zur COX2 und COX1**

Kupfer wird mittels eines unbekanntes Kupfer-Chaperons zu den Mitochondrien transportiert und vermutlich dort an COX17 übergeben, um mittels SCO1 in die COX-Untereinheit II (COX2) bzw. COX11 in die Untereinheit I (COX1) inseriert zu werden (siehe Abb. 2).

COX17 ist ein für den Zusammenbau der COX essenzielles Protein. In Hefe ist eine *Cox17*-Nullmutante Respirations-defizient, die Zugabe von hohen extrazellulären Kupfer-Mengen supprimiert allerdings die Mutation. COX17 ist 69 AS lang und 8 kDa schwer (Heaton *et al.*, 2001). Es enthält sieben (10%) Cystein-Reste, von denen sechs zwischen Tieren, Pflanzen und Pilzen konserviert sind, und ein für die Bindung von Kupfer essenzielles CCXC Kupfer-Bindemotiv. In einem gerichteten Mutagenese-Experiment wurden 70% der Aminosäuren mutiert, lediglich sechs Aminosäuren konnten als essenziell identifiziert werden. Zwei dieser sechs Aminosäuren sind Cysteine des genannten CCXC Kupfer-Bindemotives (Glerum *et al.*, 1996a; Heaton *et al.*, 2000; Punter und Glerum, 2003). Die Funktionalität von COX17 ist dementsprechend weniger in seiner AS-Sequenz als in seiner Sekundärstruktur begründet.

Obwohl COX17 keine bekannte mitochondriale Zielsequenz beinhaltet, sind nur etwa 40% der zellulären COX17-Proteine im Zytoplasma lokalisiert, 60% befinden sich im mitochondrialen Intermembranraum (Beers *et al.*, 1997). Da in Hefe der Inhalt der Mitochondrien nur 3% des Zellvolumens ausfüllt (Stevens, 1981), könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß COX17 seine Funktion in Cytoplasma und im Intermembranraum ausübt. Deshalb wurde ursprünglich angenommen, daß COX17 als Chaperon fungiert, welches Kupfer im Zytoplasma rekrutiert und in den mitochondrialen Intermembranraum befördert (Glerum *et al.*, 1996a). Doch belegen neuere Befunde, daß COX17 seine eigentliche Funktion auch dann behält, wenn es artifiziell in der inneren mitochondrialen Membran verankert wird (Maxfield *et al.*, 2003).

Um COX17 in der inneren mitochondrialen Membran zu verankern, wurde ein Proteinfusionskonstrukt erstellt. Dessen N-terminales Ende besteht aus der mitochondrialen Importsequenz und der Transmembrandomäne von SCO2. Daran wurde COX17 in voller Länge fusioniert. Dieses Fusionsprotein wurde in eine *Cox17*-Nullmutante transformiert. Entsprechende Transformanten entsprachen phänotypisch dem Wildstamm (W303) und wiesen etwa 80% der COX-Aktivität des Wildstammes auf. Die Lokalisation dieses Fusionsproteins wurde durch Western-Analysen entsprechender zytoplasmatischer bzw. mitochondrialer Fraktionen belegt (Maxfield *et al.*, 2003).

COX17 fungiert danach nicht als Kupfer-Chaperon, welches Kupfer zu den Mitochondrien dirigiert, vielmehr besteht seine Funktion in der Übergabe von Kupfer an die mitochondrialen Proteine SCO1 und COX11 (siehe folgender Abschnitt).

COX17 enthält keine Transmembran-Domäne, es weist allerdings eine Dimerisierungs-Domäne auf. Während COX17 in Zytoplasma vor allem als Dimer vorliegt, ist es im Intermembranraum der Mitochondrien zum größten Teil tetramerisiert, dies erleichtert

vermutlich die Koordination von Kupfer-Ionen. COX17 und Kupfer sind im Cu<sub>4</sub>S<sub>6</sub> Poly-Kupfer-Cluster organisiert (Heaton *et al.*, 2001; Palumaa *et al.*, 2004).

Ein derartiger Poly-Kupfer-Cluster besteht aus einem COX17-Tetramer, welches insgesamt 12 Kupfer(I)-Ionen beinhaltet. Kupfer wird dabei durch die SH-Seitenketten der Cystein-Reste koordiniert. Die Kupfer-Cluster von COX17 ähneln den Poly-Kupfer-Clustern von ACE1 und CUP1 (Heaton *et al.*, 2001).

In COX17-Oligomeren von Hefe, Maus und Mensch sind zumindest drei Kupfer(I)-Ionen pro COX17-Monomer gebunden (Heaton *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002b). Das COX17 des Schweins bindet im Cu<sub>4</sub>S<sub>6</sub>-Cluster kooperativ vier Kupfer-Ionen pro Monomer (Palumaa *et al.*, 2004). COX17 wurde neben Hefe in Tieren (Ratte, Maus, Mensch, Schwein etc.), Pflanzen (*A. thaliana*, etc.) und Pilzen (*P. anserina*, *Schizosaccharomyces pombe* etc.) beschrieben, seine Bedeutung konnte dabei bestätigt werden (Balandin und Castresana, 2002; Kako *et al.*, 2000; Punter *et al.*, 2000; Stumpferl *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2001; Wintz und Vulpe, 2002). Das *P. anserina* Ortholog PaCOX17 hat eine Länge von 80 AS, sechs der sieben Cystein-Reste der Hefe sind zwischen COX17 und PaCOX17 konserviert. Teil dieser Arbeit war es, *PaCox17* und sein Produkt PaCOX17 zu charakterisieren.

### **COX17 übergibt Kupfer mittels SCO1 und eventuell SCO2 an COX2**

Vermutlich überträgt COX17 Kupfer im mitochondrialen Intermembranraum auf SCO1 und eventuell SCO2. In Hefe wurde SCO1 als Assemblierungs-Faktor der COX beschrieben, ohne den die Untereinheit II der COX nicht akkumuliert (Schulze und Rödel, 1988).

*Sco1* ist für den Zusammenbau der COX essenziell, in Hefe kann *Sco2* dagegen ohne phänotypischen Effekt deletiert werden (Glerum *et al.*, 1996b). Die Funktion von SCO2 könnte der von SCO1 ähnlich sein (Kupferinsertion in COX2), spielt aber eine untergeordnete Rolle, da SCO2 eine *Sco1*-Nullmutante nicht supprimieren kann. Diese Vermutung wurde durch Experimente untermauert, in denen Teile der AS-Sequenz von SCO1 durch die homologen Sequenzen von SCO2 ersetzt wurden. Abgesehen von einem 13 AS langen, der Transmembran-Domäne benachbarten Bereich, kann die Sequenz von SCO1 durch die von SCO2 ersetzt werden ohne die Funktion von SCO1 zu beeinträchtigen. SCO2 ist – wie auch SCO1 – in der Lage, mit dem C-Terminus von COX2 zu interagieren. Dabei ist die Bindung von SCO2 nicht von der Anwesenheit von SCO1 oder von Kupfer abhängig. Weiterhin ist SCO2 in der Lage, Homo-Dimere bzw. Hetero-Dimere mit SCO1 zu bilden (Lode *et al.*, 2002).

In anderen Spezies wie beispielsweise Säugern scheint *Sco2* durchaus nicht funktionslos zu sein. Die Mutation des humanen *Sco2* führt z.B. zur fatalen infantilen Kardioenzephalomyopathie (Papadopoulou *et al.*, 1999).

COX2 wird durch die Insertion des Kofaktors Kupfer stabilisiert, ohne Kupfer unterliegt Apo-COX2 einer rapiden Degradation (Glerum *et al.*, 1996a; Speno *et al.*, 1995). Die Überexpression von jeweils einem der beiden Homologe *Sco1* bzw. *Sco2* supprimiert die Null-Mutation von *Cox17*. Eine *Sco1*-Nullmutante kann dagegen durch die Überexpression von *Cox17* nicht revertiert werden (Glerum *et al.*, 1996b). Aus diesen Befunden wurde die Schlussfolgerung gezogen, daß Kupfer gerichtet von COX17 an SCO1 übergeben wird (siehe Abb. 2).

Während die Deletion von *Cox17* durch hohe extrazelluläre Kupferspiegel supprimiert werden kann, ist das bei der *Sco1*-Mutante nicht möglich. Auch die Überexpression von *Cox17* bzw. *Ctr1* führen zu keiner Reversion (Glerum *et al.*, 1996b). SCO1 übt seine Funktion vermutlich stromabwärts von COX17 aus. Aus diesen Befunden können zwei Folgerungen gezogen werden. In einer *Cox17*-Mutante wird die COX ausreichend mit Kupfer beladen, entweder durch Überflutung der Zelle mit Kupfer, oder durch starke Erhöhung der Menge des zur Verfügung stehenden SCO1-Proteins. In beiden Fällen wird ein Faktor postuliert, der Kupfer im Intermembranraum des Mitochondriums an SCO1 übergibt. In *Sco1*-Mutanten wird die COX nicht gebildet, es gibt keinen bekannten Faktor der die Funktion von SCO1 übernehmen könnte (Glerum *et al.*, 1996b).

Im Gegensatz zu COX17 ist SCO1 mit seinem N-terminalen Ende in der inneren Mitochondrien-Membran verankert, dieses Ende verleiht ihm auch seine Spezifität gegenüber seinem Homolog SCO2. Das C-terminale Ende von SCO1 enthält ein CXXXC Kupfer-Bindemotiv, das in den Intermembranraum hineinreicht (beide Cystein-Reste sind essenziell). Kupfer und SCO1 sind im Verhältnis 1:1 koordiniert. SCO1 übernimmt Kupfer vermutlich im mitochondrialen Intermembranraum von COX17 und inseriert es in die Cu<sub>A</sub>-Stelle von COX2 (Horng *et al.*, 2004; Maxfield *et al.*, 2003). Sowohl die Bildung von SCO1-Homomeren, als auch die Interaktion von SCO1 mit dem C-Terminus von COX2 wurde belegt. Beide Prozesse sind nicht Kupfer-abhängig (Lode *et al.*, 2000; Rentzsch *et al.*, 1999).

### **COX17 übergibt Kupfer mittels COX11 an die COX Untereinheit I**

Das COX1-Cu<sub>B</sub>-Zentrum bezieht Kupfer vermutlich mittels des Kupfer-Chaperons COX11 (siehe Abb. 2). Das COX11 der Hefe ist ein für die Assemblierung der COX essenzielles Protein, welches in der inneren mitochondrialen Membran verankert ist und in den Intermembranraum hineinreicht. Das Kupfer-Chaperon COX11 von *S. cerevisiae* ist ein Ortholog des humanen COX11, des ORF3 von *P. denitrificans* und des COX11 von *Rhodobacter sphaeroides*. Der Prokaryont *R. sphaeroides* benötigt COX11 um Kupfer(I)-Ionen in das Cu<sub>B</sub>-Zentrum der bakteriellen COX zu integrieren (Hiser *et al.*, 2000; Petruzzella *et al.*, 1998; Tzagoloff *et al.*, 1990). Dazu bildet COX11 Homo-Dimere, die über ihren C-Terminus verbunden sind. In solch einem Dimer sind zwei Kupfer(I)-Ionen in einem binukleären Zentrum angeordnet (Carr *et al.*, 2002).

Im Homo-Dimer bindet jedes COX11-Monomer je ein Kupfer(I)-Ion mittels dreier Cystein-Reste. Die Mutation der entsprechenden Cysteine führt zu einer starken Reduktion der Kupfer-Bindfähigkeit von COX11 und zum Absinken der COX-Respiration (Carr *et al.*, 2002).

Vermutlich inseriert COX11 die Kupfer-Ionen direkt in COX1, allerdings ist auch die Mitwirkung weiterer Komponenten denkbar. In Aufbau und Lokalisation ähnelt COX11 dem Kupfer-Chaperon SCO1. COX17 transportiert Kupfer mittels SCO1 zu COX2 und über COX11 zu COX1 (siehe Abb. 2). Die spezifische Übergabe von Kupfer an COX11 konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* demonstriert werden (Horng *et al.*, 2004).

COX17 transferiert Kupfer spezifisch an SCO1 und COX11: Der Kupfer-Transfer wurde *in vitro* mit den gereinigten Proteinen COX17, SCO1 und COX11 gezeigt. Im Rahmen dieses Experiments wurde Kupfer zwar von COX17 auf SCO1 und COX11, nicht aber auf heterologe Proteine (z.B. BSA, Karboanhydrase) übertragen. Auch *in vivo* konnte gezeigt werden, daß COX17 Kupfer spezifisch auf artifizielle zytoplasmatische SCO1- und COX11-Varianten überträgt, in denen die mitochondriale Ziel-Sequenz und die Transmembran-Domäne deletiert wurde.

COX17 übergibt Kupfer durch unterschiedliche Mechanismen an SCO1 bzw. COX11. Wird in das COX17 der Hefe die Mutation C<sup>57</sup>Y eingeführt, kann Kupfer nicht an SCO1 weitergegeben werden, der Kupfer-Transfer zu COX11 ist dennoch nicht beeinflusst. In Wild-Stämmen erfolgt der Kupfer-Transfer zu SCO1 durch COX17-Dimere und Tetramere, wobei Dimere Kupfer weniger effizient übergeben (Hornig *et al.*, 2004).

Nach der Insertion von Kupfer(I)-Ionen in die Kupferzentren Cu<sub>A</sub> und Cu<sub>B</sub> werden die Kernuntereinheiten der COX (COX2 und COX1) korrekt gefaltet, anschließend kann sich der COX-Komplex komplett assemblieren.

#### 1.1.2.4 Ausscheidung von Kupfer

Neben der Regulation des Kupfer-Imports und der Kupfer-Verteilung lässt sich der intrazelluläre Kupfer-Spiegel durch den Kupfer-Export modulieren. In Hefe kann überschüssiges Kupfer durch Mineralisation ausgeschieden werden, dabei werden gelöste Kupfer(II)-Ionen mit Sulfid (S<sup>2-</sup>) zu unlöslichem Kupfer-Sulfid (CuS) kristallisiert.

Mineralisation ist ein chemischer Prozess, bei dem gelöste Kationen (Metall-Ionen) mit gelösten Anionen (z.B. gelöste organische Säuren, gelöste ionisierte Nichtmetalle) unlösliche Salze bilden. Die Menge der gebildeten Salze hängt vom Löslichkeitsprodukt ab, das für jedes Paar von Anion und Kation unterschiedlich ist. Das Anion Sulfid (S<sup>2-</sup>) weist in seinen Salzen meist ein sehr geringes Löslichkeitsprodukt auf, d.h. es ist ideal geeignet unerwünschte Kationen (z.B. überschüssiges Kupfer) zu fällen.

In Hefe ist das Kupfer-bindende Protein SLF1 an entsprechenden Mineralisierungen beteiligt, SLF1 wurde bisher nur initial charakterisiert. Das durch SLF1 gebildete Kupfer-Sulfid wird an der Oberfläche der Zelle in kristalliner Form abgeschieden, die Zell-Oberfläche verfärbt sich dadurch bräunlich (Yu *et al.*, 1996).

#### 1.1.3 Die Bedeutung von Kupfer für entwicklungsbiologische Prozesse

Wachstum und Entwicklung eukaryontischer Zellen und Organismen erfordern die passende räumliche und zeitliche Expression eines Netzwerks von Genen, präzise Signal-Transduktion sowie eine Reihe von biosynthetischen und metabolischen Reaktionen. Entsprechende biochemische Reaktionen benötigen diverse enzymatische Kofaktoren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Einer dieser Kofaktoren ist Kupfer, ein für Wachstum und Entwicklung eines Organismus essenzielles Übergangsmetall (Eide, 2000; Puig und Thiele, 2002; Waggoner *et al.*, 1999). Bereits geringe Störungen des Kupferhaushalts zeigen profunde Wirkungen, Beispiele hierfür sind die Tyrosinase (Pigmentierung), die Peptidylglycyl- $\alpha$ -amidierende Monooxygenase (Neuropeptid-Prozessierung), sowie diverse Kupfer-Transporter (Askwith und Kaplan, 1998; Prigge *et al.*, 2000).

Bei Menschen und im Tier-Modell führen sowohl Kupfer-Mangel in der aufgenommenen Nahrung als auch genetische Defekte (d. h. Erbkrankheiten), die die Verteilung von Kupfer betreffen, zu schweren Störungen der Ontogenese (Lutsenko und Petris, 2003; Prohaska und Lukasewycz, 1990; Waggoner *et al.*, 1999). In Abhängigkeit von der gestörten Funktion wird die Ontogenese zu unterschiedlichen Zeitpunkten beeinflusst, dabei können bereits die ersten Stadien der Embryonal-Entwicklung betroffen sein.

### **1.1.3.1 Kupfer in der Embryonalentwicklung**

Störungen der Kupferhomöostase, die Einzeller wie Hefe nur geringfügig beeinträchtigen, können in Mehrzellern bereits in der Embryonalentwicklung zu letalen Schäden führen. Zusammenhänge zwischen ausreichender Kupferversorgung und Embryonalentwicklung sind seit längerem Thema intensiver Studien. Es wurde beispielsweise gezeigt, daß die neonatale Ataxie (Koordinationsstörung) neugeborener Lämmer darauf zurückzuführen ist, daß deren Mutterschafe auf Kupfer-defizienten Weiden grasten (Bennetts und Chapman, 1937; Smith *et al.*, 1977). Wird das Futter des Mutterschafs während der Schwangerschaft mit geringen Mengen Kupfer ergänzt, weisen die Nachkommen keine Symptome der Krankheit auf (Allcroft *et al.*, 1959). Die Versorgung des Embryos mit Kupfer hängt vollkommen vom Muttertier ab (Hidiroglou und Knipfel, 1981). Unzureichender Kupfer-Transfer zum Embryo verursacht verlangsamtes Wachstum, Abnormalitäten des zentralen Nervensystems, des Skeletts und des Metabolismus im allgemeinen (Widdowson *et al.*, 1974).

### **Störungen der Kupfer-Aufnahme**

CTR1 hat in allen daraufhin untersuchten Spezies die Funktion eines hochaffinen Kupfer-Importers, der Kupfer(I)-Ionen durch die Zytoplasma-Membran in das Zytoplasma der Zelle transportiert (siehe 1.1.2.1). Die Expression von *Ctr1* erfolgt in Säugern Gewebe-spezifisch. In der Maus wird *Ctr1* in allen Geweben transkribiert, das Expressions-Niveau ist jedoch in Leber und Niere erhöht, und in Gehirn und Milz vermindert (Lee *et al.*, 2000; Zhou und Gitschier, 1997). Im Nervengeflecht der Aderhaut des Auges, in Nieren-Tubuli, und in Bindegeweben des Auges, der Ovarien und der Hoden ist das Expressions-Niveau von *Ctr1* ebenfalls stark erhöht (Kuo *et al.*, 2001). Die Deletion einer der beiden Kopien des murinen *Ctr1* führt in entsprechenden Individuen zu Gewebe-spezifischen Defekten Kupfer-abhängiger Enzyme und zu Kupfer-Akkumulation (Lee *et al.*, 2001).

Diploide Mäuse, in deren Zellen eine Kopie von *Ctr1* disruptiert ist, zeigen in Gehirn und Milz um 50% niedrigere Kupfer-Spiegel als der Wild-Typ. Auch die Aktivität einiger Kupfer-Enzyme ist herabgesetzt, so ist die Aktivität der Cu/Zn-SOD und der COX um 20% reduziert. In Leber und Niere von Wild-Stämmen bzw. Mutanten besteht kein Unterschied im intrazellulären Kupfer-Gehalt (Lee *et al.*, 2001).

Mäuse mit homozygoter *Ctrl*-Deletion sind in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung erheblich eingeschränkt, sie sterben *in utero* zwischen Tag 10,5 und 12,5 der Schwangerschaft (Lee *et al.*, 2001). Zellen, die aus Embryos mit *Ctrl*-Nullmutation entnommen wurden, sind durchaus lebensfähig. Gegenüber Wild-Typ-Zellen zeigen sie keinerlei verlangsamtes Wachstum. Ein unbekannter, von CTR1 unabhängiger niedrigaffiner Kupfer(II)-Importer gewährleistet eine ausreichende Versorgung mit Kupfer. *Ctrl*-defiziente Zellen besitzen etwa 30% der Kupfer-Import-Kapazität normaler Wild-Typ-Zellen (Lee *et al.*, 2002b). Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Regulationsgrad der Kupfer-Homöostase zwischen einzelnen Zellen und Mehrzellern. Das murine *Ctrl* ist für Zell-Wachstum und -Teilung nicht erforderlich, für den normalen Ablauf der Embryonalentwicklung aber essenziell.

In *D. melanogaster* wurden drei *Ctrl*-Homologe charakterisiert (*Ctrla*, *Ctrlb* und *Ctrlc*; siehe 1.1.2.1). Das Gen der hochaffinen Kupfer(I)-Permease CTR1B wird ausschließlich in späten embryonalen und in larvalen Stadien der Entwicklung exprimiert. Kupfer-Mangel induziert die Expression von *Ctrlb* zusätzlich. Eine *Ctrlb*-Nullmutante zeigt merklich reduzierte larvale Kupfer-Spiegel; Defekte in der Pigmentierung des Abdomens, die auf Defekte in der Funktion der Tyrosinase zurückzuführen sind; und den Abbruch der Entwicklung im zweiten Larvenstadium bei Versorgung mit kupferarmer Nahrung (Zhou *et al.*, 2003).

### **Dysfunktionalität der COX**

Die Verminderung der Kupfer-Aufnahme bewirkt bei Mehrzellern eine Reihe von Dysfunktionen während der Ontogenese. Auch die Modulation intrazellulärer Kupfer-Stoffwechsel-Wege beeinflusst die Entwicklung. Von besonderem Interesse ist hierbei die Belieferung der COX mit Kupfer, die durch Kupfer-Importer, -Bindeproteine und -Chaperone gewährleistet wird.

Die Biogenese der COX bedarf des Zusammenspiels zweier Genome: Das mitochondriale Genom kodiert die drei großen, katalytischen Untereinheiten (COXI-III, sie enthalten die prosthetischen Gruppen). Der Zellkern kodiert 9-10 kleinere Untereinheiten, deren Funktion regulatorischer und struktureller Natur ist (Michel *et al.*, 1998). Weiterhin ist eine Reihe von Assemblierungsfaktoren bekannt, die für Faltung und Reifung der eigentlichen Untereinheiten, sowie für die Insertion der prosthetischen Gruppen in das Holoenzym benötigt werden. Defizienzen der COX können sowohl auf Mutationen der Gene der 13 strukturellen Untereinheiten als auch der akzessorischen Proteine zurückzuführen sein (Schon *et al.*, 1997; Shoubridge, 2001). Im Menschen wurden bisher Mutationen in den Genen der drei Kern-Untereinheiten und den Assemblierungsfaktoren SCO1 (Valnot *et al.*, 2000b), SCO2 (Papadopoulou *et al.*, 1999), COX10 (Valnot *et al.* 2000a) und SURF1 (Zhu *et al.*, 1998) beschrieben. Ein weiteres Beispiel ist das Gen *Cox17*, es kodiert für das Kupfer-Bindeprotein COX17, das an der Belieferung der COX mit Kupfer beteiligt ist (siehe 1.1.2.3).

Die Relevanz des Kupfer-Bindeproteins COX17 für die Ontogenese wurde durch die Deletion einer bzw. beider Kopien des murinen *Cox17* untersucht. Im Vergleich zum Wild-Typ exprimieren Mäuse, die *Cox17* in einer Kopie im Genom enthalten, etwa 50% der *Cox17*



mRNA-Menge in Gehirn, Herz, Niere und Skelett-Muskel. Die COX-Aktivität ist im Gehirn um etwa 20% verringert. In Nieren und Muskeln kann kein Unterschied zum Wild-Typ nachgewiesen werden. (*Cox17*<sup>-/-</sup>)-Mäuse entwickeln sich normal, sind phänotypisch gesund, fertil und von normaler Größe (Takahashi *et al.*, 2002b). Durch die Kreuzung von (*Cox17*<sup>-/-</sup>)-Mäusen entstehen Embryonen ohne *Cox17*. Derartige Embryonen entwickeln sich etwa 6,5 Tage normal. Daher scheint die Aktivität der COX während der ersten 6,5 Tage der Embryonalentwicklung nicht essenziell zu sein. Während sich Wild-Typ-Embryonen nach etwa 7,5 Tagen in der Gastrulation befinden, zeigen *Cox17*-Nullmutanten schwere Defekte. Sie sterben nach 8,5 bis 10 Tagen Embryonal-Entwicklung (Takahashi *et al.*, 2002b). Die Phänotypen von Mäusen mit homozygoter *Cox17*- bzw. *Ctrl*-Deletion gleichen sich. Beide Mutanten sterben während der Gastrulation. Weiterhin wird eine vermehrte Apoptose embryonaler Zellen beobachtet (Kuo *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002b).

### 1.1.3.2 Störungen der Kupferhomöostase

Die präzise Regulation des Kupfer-Stoffwechsels spielt nicht nur während der frühen Ontogenese eine wichtige Rolle, auch in adulten Individuen verursachen Störungen der Kupfer-Homöostase profunde Schäden.

#### Menkes-Syndrom

Das Menkes-Syndrom ist eine rezessive, X-chromosomal vererbte Störung des Kupfer-Metabolismus. Betroffene Menschen sterben während der frühen Kindheit (Menkes *et al.*, 1962). Menkes-Patienten leiden an systemischem Kupfer-Mangel. Die Kupfer-Aufnahme durch den Dünndarm ist beeinträchtigt, die Kupfer-Verteilung innerhalb des Körpers ist gestört. Die Menkes-ATPase gesunder Menschen wird vor allem in Plazenta, Darm und Gehirn detektiert. Kupfer wird in diesen Geweben zur Versorgung des Embryos, zur Aufnahme von Nährstoffen und für das sich entwickelnde Gehirn benötigt. Betroffene Individuen weisen in Gehirn, Leber und Blut-Serum stark reduzierte Kupfer-Spiegel auf. Die Kupfer-Konzentration ist dennoch in Niere und Dünndarm stark erhöht, da Kupfer aus diesen Geweben nicht exportiert werden kann (Danks, 1995).

Klinisch zeigen Menkes-Patienten pleiotrophe Kupfer-Mangel-Symptome, die durch den Ausfall einer Reihe von Kupfer-abhängigen Enzymen charakterisiert sind: Hypopigmentiertes Haar und Hypo-Pigmentierung der Haut (Melanin-Mangel, durch Ausfall der Tyrosinase verursacht, siehe 1.1.2.2), Abnormalitäten/Schäden des Bindegewebes und Aortenaneurysma (Defekt der Lysyl-Oxidase), Kinky-Hair-Syndrom (reduzierte Keratin-Aushärtung), Hypothermie (mangelnde COX-Aktivität) und schließlich schwere neurodegenerative Schäden, die Vermutlich auf einen Mangel an COX-, Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase- und PAM-Aktivität zurückzuführen sind (Danks, 1995).

Das Menkes-Syndrom wird durch den Defekt des Genes *Atp7a* (auch als *MNK* bezeichnet) hervorgerufen. Die P-Typ-ATPase ATP7A (MNK) transferiert Metall-Ionen unter ATP-

Verbrauch durch Bio-Membranen (Chelly *et al.*, 1993; Mercer *et al.*, 1993; Vulpe *et al.*, 1993). Das Hefe Homolog zu ATP7A ist CCC2 (Solioz und Vulpe, 1996; siehe 1.1.2.2).

Das im Trans-Golgi-Netzwerk lokalisierte ATP7A (MNK) ist für den intrazellulären Kupfer-Transport und die Kupfer-Versorgung Kupfer-abhängiger Enzyme sekretorischer Stoffwechselwege – d. h. Tyrosinase, Lysyl-Oxidase und Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase – verantwortlich (Dierick *et al.*, 1997; Petris *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 1996).

Das humane ATP7A wird, wie auch CCC2 in *S. cerevisiae*, durch ein Chaperon mit Kupfer versorgt. HAH1 ist das Kupfer-Chaperon für ATP7A, die Interaktion beider Proteine wurde durch das Zwei-Hybrid-System belegt (Larin *et al.*, 1999). HAH1 ist ein Homolog des *S. cerevisiae* Proteins ATX1, dem Chaperon, welches CCC2 mit Kupfer versorgt (Lin und Culotta, 1995; Lin *et al.*, 1997).

### **Morbus Wilson-Syndrom**

Neben dem Menkes-Syndrom ist auch das autosomal-rezessiv vererbte Wilson-Syndrom eine der besser verstandenen Störungen des Kupfer-Metabolismus. Die bei Menkes- und Wilson-Syndrom betroffenen ATPasen (ATP7A bzw. ATP7B) sind funktionelle Homologe, die auf Proteinebene eine Identität von 67% aufweisen (Tanzi *et al.*, 1993). Beide ATPasen sind funktionelle Homologe der *S. cerevisiae* ATPase CCC2 (Hsi *et al.*, 2004). *Atp7a* und *Atp7b* unterscheiden sich dennoch in ihren Expressions-Mustern.

Das beim Wilson-Syndrom dysfunktionelle Gen *Atp7b* wird überwiegend in Leberzellen exprimiert. ATP7B ist in den Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks lokalisiert. Die Mutation von *Atp7b* unterbindet den Kupfer-Transport in das Lumen des Trans-Golgi-Netzwerks, in dem Kupfer beispielsweise an Ceruloplasmin (ein FET3-Homolog; siehe 1.1.2.2) weitergegeben wird. Im Blut-Serum von Wilson-Patienten wurde nur eine sehr geringe Menge Serum-Ceruloplasmin nachgewiesen (Scheinberg und Gitlin, 1952). In den Hepatozyten der Wilson-Patienten sammelt sich überschüssiges Kupfer an, da es nicht mittels ATP7B in einen der sekretorischen Stoffwechselwege - Ceruloplasmin oder Galle - eingespeist werden kann. Der resultierende Kupfer-Überschuß schädigt die Hepatozyten. Dies führt einerseits zum Absterben der Hepatozyten und andererseits zur Freisetzung des überschüssigen Kupfers in das Blut-Plasma. Überschüssiges Kupfer wird von extrahepatischen Geweben resorbiert, im besonderen von Nervenzellen, die nun ebenfalls geschädigt werden. In entwicklungsbiologischer Hinsicht leiden Wilson-Patienten bereits im Kindesalter an Leberzirrhose und ab dem 30-40 Lebensjahr an neurodegenerativen Schäden. Ursachen sind Kupfer-Ablagerungen in Leber und Gehirn. Weiterhin verursacht überschüssiges Kupfer des Blut-Plasmas sogenannte „Kayser-Fleischer“ Ringe, die auf

Kupfer-Ablagerungen in der Kornea zurückzuführen sind. Kupfer kann aus diesem Gewebe nicht sekretiert werden (Walshe, 1989).

Die ATPasen ATP7A und ATP7B, deren Ausfall im Menschen das Menkes- bzw. Wilson-Syndrom verursachen, enthalten beide Kupfer-bindende MXCXXC-Motive in ihrem Amino-Terminus (DiDonato *et al.*, 1997; Lutsenko *et al.*, 1997), ein CPC-Motiv für den Transport von Kupfer durch die Membran des Golgi-Apparates (Hung *et al.*, 1997; Payne und Gitlin, 1998) und bekannte Domänen für Phosphorylierung und Bindung von ATP. Die konservierte Aminosäure-Sequenz SEHPL befindet sich in ATP7A und ATP7B in der großen zytoplasmatischen Protein-Domäne neben der ATP-Binde-Domäne. Der Histidin-Rest des SEHPL-Motivs ist in allen Kupfer-transportierenden ATPasen konserviert (Petrukhin *et al.*, 1994). Er ist zugleich der Ort mit der häufigsten Mutationsrate (H1069Q) des Wilson-Syndroms. Dieser Histidin-Rest ist für die Funktion von ATP7A und ATP7B essenziell (Hung *et al.*, 1997; Payne und Gitlin, 1998).

### **Aceruloplasminämie**

Menschliches Ceruloplasmin wird von Hepatozyten synthetisiert und anschließend in das Blutplasma sekretiert. Es ist ein im Blut-Serum abundantes Protein, hat eine Molmasse von 132 kDa (1046 Aminosäuren), etwa 7-8% seiner Masse sind auf Glykosylierung zurückzuführen. Ceruloplasmin ist ein Homolog der Eisen(II)-Oxidase FET3 der Hefe (siehe 1.1.2.2). Es wird als Holoprotein synthetisiert und bindet sechs Kupfer-Ionen pro Monomer, die bereits während der Synthese integriert werden (Sato und Gitlin, 1991).

Die Verfügbarkeit von Kupfer hat keinen Einfluss auf die Syntheserate des Ceruloplasmins, sie beeinflusst lediglich dessen Stabilität. Kann Kupfer während der Synthese nicht in Ceruloplasmin integriert werden, wird ein instabiles Apo-Protein sekretiert, das im Plasma rapider Degradation unterliegt (Harris *et al.*, 1998).

Ceruloplasmin ist eine Ferroxidase, die sich der leichten Ionisierbarkeit des Kupfers bedient um Eisen in einer einstufigen Reaktion zu oxidieren, wobei Sauerstoff reduziert wird. Ceruloplasmin regelt einerseits die Oxidation von  $Fe^{2+}$  (resorbierte Form) zu  $Fe^{3+}$  (Transportform) in der Darmmucosa, andererseits den Transport von Kupfer aus den intra- in den extrazellulären Raum. Ceruloplasmin hat die Funktion überschüssiges Eisen aus den Zellen zu entfernen. Fehlt diese Funktion, kommt es zur Eisen-Akkumulation, die mittels der Fenton-Reaktion zur Generierung von ROS führen kann (siehe 1.1.1.2 und 1.2.1).

Die Aceruloplasminämie ist eine autosomal rezessive Erkrankung des Eisen-Stoffwechsels, die durch die Mutation bzw. die Deletion des Ceruloplasmin-Gens verursacht wird. In Folge des gestörten Kupfer- und Eisen-Metabolismus treten Diabetes mellitus, Anämien, retinale Degenerationen, und neurologische Symptome auf. Defekte des Ceruloplasmins führen auch zu Häm siderose (durch Störung des Eisen-Metabolismus), Wilson-Syndrom (Störung der Kupferspeicherung) und Menkes-Syndrom (Störung der Kupferresorption).

Das in der Leber synthetisierte Ceruloplasmin zeigt eine Akute-Phase-Reaktion: Ein erniedrigter Spiegel ist bei primärer Leberzirrhose, primärer Gallengangsatresie und in einigen schweren Fällen von Hepatitis zu beobachten. Die erniedrigte Konzentration entsteht infolge der Einschränkungen des gesamten Leberstoffwechsels und nicht infolge eines Defekts der spezifischen Ceruloplasmin-Synthese. Da das Ceruloplasmin-Gen während der Akute-Phase-Reaktion verstärkt exprimiert wird, sind in der Regel bei allen Entzündungskrankheiten erhöhte Ceruloplasmin-Konzentrationen festzustellen. Ein erhöhter Spiegel ist außerdem bei der retikuloendothelialen Neoplasie, Gallenwegsobstruktion, Östrogen-therapie und in der Schwangerschaft zu beobachten.

Ceruloplasmin spielt eine wichtige Rolle bei der Eisen-Homöostase im Gehirn, so schützt es das Gehirn vor zu hohen ROS-Spiegeln. Weiterhin ist die astrozyten-spezifische Ceruloplasmin-Genexpression entscheidend für den Eisenstoffwechsel und das Überleben der Neurone in der Retina und den Basalganglien (Logan *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1995). Auch bei Morbus Parkinson und der Alzheimer'schen Erkrankung spielen Eisenablagerungen eine Rolle.

### **Morbus Alzheimer**

Alzheimer ist eine progressive, neurodegenerative Krankheit, die prominenteste Ursache der Alters-Demenz. Nach heutiger Erkenntnis ist die Akkumulation des Amyloid- $\beta$ -Proteins die Ursache sowohl für die sporadische, als auch für die erbliche Form von Alzheimer (Selkoe, 1998). Dieses Protein ist ein proteolytisches Spaltprodukt des transmembranen Amyloid-Vorläuferproteins, dessen Mutation zur Anhäufung des Amyloid- $\beta$ -Proteins in Nervenzellen, und damit zur erblichen Form von Alzheimer führen kann (Price und Sisodia, 1998).

Die für die Degeneration der Neuronen verantwortlichen Mechanismen sind auf molekularer Ebene kaum verstanden: Prinzipiell führt die Akkumulation des Amyloid- $\beta$ -Proteins zur Produktion freier Radikale und damit zur Schädigung von Neuronen (Butterfield, 2002; Schöneich *et al.*, 2003). Das Amyloid- $\beta$ -Protein ist befähigt Aggregate zu bilden, die vermutlich zytotoxischen Sauerstoff-Stress verursachen (Selkoe, 1998). Unter leicht sauren Bedingungen scheint Kupfer eine Rolle bei der Bildung der Amyloid- $\beta$ -Aggregate zu spielen, damit propagiert Kupfer indirekt die Bildung von ROS (Atwood *et al.*, 1998).

Das Amyloid-Vorläuferprotein ist in der Lage Kupfer zu binden und zu reduzieren (Hesse *et al.*, 1994; Multhaup *et al.*, 1996). In gesunden Individuen ist es möglicherweise für den transzellulären Kupfer-Transport relevant (Selkoe, 1998). Das mutierte Amyloid-Vorläuferprotein könnte in Alzheimer-Patienten den normalen intrazellulären Kupfer-Transport stören. Weiterhin wird gebundenes Kupfer in Anwesenheit von  $H_2O_2$  oxidiert, dabei wird das Amyloid-Vorläuferprotein in definierte kleine Peptide fragmentiert. Eines dieser Peptide ist der Amino-Terminus des Amyloid- $\beta$ -Proteins. Wird ein zusätzlicher Mechanismus postuliert, bei dem Kupfer die Aggregation des Amyloid- $\beta$ -Proteins vermittelt, so wird dadurch das Ausmaß Radikal-induzierter Schäden potenziert (Multhaup *et al.*, 1998).

### **Kupfer und Alterungsprozesse**

Die präzise Regulation der Kupfer-Homöostase beeinflusst einerseits die Ontogenese und andererseits die Vitalität juveniler und adulter Individuen unterschiedlicher Spezies. Kupfer beeinflusst sowohl den Verlauf der Seneszenz, als auch die Alterungsprozesse direkt. Nach einer allgemeinen Einführung in das Thema der biologischen Alterung, werden im nächsten Kapitel Befunde präsentiert, die Kupfer-Homöostase, Ontogenese und aktuelle Theorien der Alterung miteinander verknüpfen.

## 1.2 Biologische Alterung

Die natürliche Lebensspanne der meisten bekannten Spezies ist begrenzt. Ausnahmen bilden eine Reihe einzelliger Pro- und Eukaryonten sowie einige mehrzellige Eukaryonten. Spezies mit begrenzter Lebensspanne zeigen nach juveniler und adulter Lebensphase zunehmend Alterungserscheinungen und sterben schließlich. Aber was versteht man unter dem Prozess der Alterung? Die Alterung eines biologischen Systems lässt sich als entwicklungsbiologischen Prozess definieren, bei dem mit fortschreitendem Alter Biomoleküle wie z.B. Proteine, Lipide, Polysaccharide und DNA zunehmend (zum Teil irreversibel) geschädigt werden. Übersteigt die Summe der Schäden eine kritische Schwelle, führt das unweigerlich zum Tod des Individuums.

Bis heute wurden über 300 unterschiedliche Theorien über die Prozesse, die zur Alterung führen aufgestellt (Medvedev, 1990). Die Alterungsprozesse diverser Spezies weisen zwar gemeinsame Grundprinzipien auf, unterscheiden sich aber in Details. Unterschiede liegen in Organisationsstufe, Ontogenese und Metabolismus begründet. Obwohl der Alterungsprozess nur zum Teil verstanden ist, trat in den vergangenen Jahren „Die Freie-Radikalthorie des Alterns“ erneut in den Vordergrund. Diese Theorie sieht in den durch freie Radikale verursachten Schäden die Hauptursache des Alterns. Dabei stehen die Mitochondrien als endogene Quelle von Sauerstoff-Radikalen im Vordergrund.

### 1.2.1 Mitochondrien und Alterungsprozesse

Mitochondrien sind Organelle, die in nahezu allen eukaryontischen Zellen vorkommen. Als Endosymbionten stammen sie von Purpur-Bakterien ab, die vor etwa 1,5 Milliarden Jahren von eukaryontischen Zellen aufgenommen wurden (Schwartz und Dayhoff, 1978).

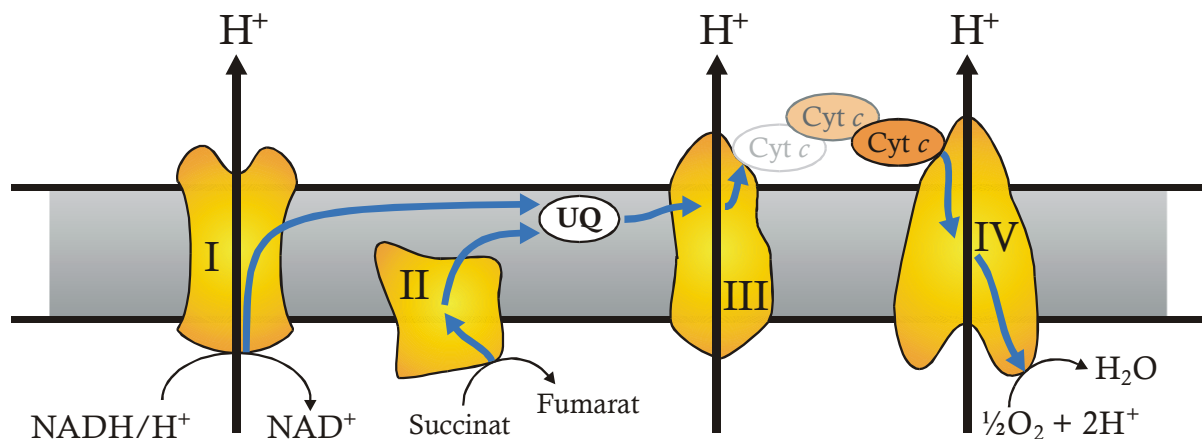
Die Endosymbionten-Theorie besagt, daß Mitochondrien und Chloroplasten in den Zellen von Eukaryonten durch Aufnahme oder Fusion von verschiedenen Prokaryonten entstanden sind. Die Hypothese wurde erstmals zu Beginn des 20. Jahrhunderts formuliert. Doch erst seit ihrer Verbreitung durch Lynn Margulis (1971) wurde sie bekannter. Nach einer Zeit der Kritik ist die Endosymbionten-Theorie heute unter Biologen weitgehend anerkannt (Berry, 2003).

Als Überbleibsel ihrer einstmaligen eigenständigen Existenz enthalten Mitochondrien ihr eigenes Erbgut, meist in Form einer zirkulären DNA (mtDNA). Jede menschliche Zelle beinhaltet einige Tausend Mitochondrien, von denen jedes zwischen einem und 15 (durchschnittlich 4,6) mtDNA-Zirkel enthält (Sato und Kuroiwa, 1991). Die mtDNA unterscheidet sich von Spezies zu Spezies in Länge und den darauf lokalisierten Genen. In *S. cerevisiae* umfasst die mtDNA, in Abhängigkeit vom untersuchten Stamm, etwa 85 kBp (Foury *et al.*, 1998). In *P. anserina* ist sie mit etwa 94 kBp (Rasse s) etwas länger (Cummings *et al.*, 1989).

Von den etwa 94 kBp mtDNA (Stamm *s*) entfallen 24,5 kBp auf Gen *CoxI*, das für die erste Untereinheit der COX kodiert, *CoxI* enthält 16 Introns (Cummings *et al.*, 1989). Auch *P. anserina* zeigt stamnesspezifische Unterschiede, so ist die mtDNA der Rasse *S* beispielsweise etwa 100 kBp lang (Cummings *et al.*, 1990). Das mitochondriale Genom aller Metazoa ist hingegen relativ kompakt, die humane mtDNA umfasst etwa 16.5 kBp. Sie kodiert für zwei rRNAs, 22 tRNAs und 13 Proteine (Anderson *et al.*, 1981).

Obwohl die Mitochondrien diverse metabolische Reaktionen bewältigen, bleibt ihre Hauptaufgabe die oxidative Phosphorylierung und damit die Versorgung der Zelle mit ATP. An der oxidativen Phosphorylierung sind fünf große transmembrane Enzym-Komplexe beteiligt. Diese sogenannte Atmungskette ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert, und besteht aus NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Reduktase (Komplex II), Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex (Komplex III), Cytochrom-*c*-Oxidase (COX, Komplex IV) und ATP-Synthase (Komplex V). Während der aeroben Zell-Atmung pumpen die Komplexe I, III und IV Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembran-Raum (siehe Abb. 3). Fließen Protonen entlang dieses Gradienten durch Komplex V in die mitochondriale Matrix zurück, ermöglicht die freiwerdende Energie die Synthese von ATP.

## Intermembran-Raum



## Matrix

**Abbildung 3: Elektronenfluß und Protonentransfer der Atmungskette.** NADH/H<sup>+</sup> und Succinat liefern Elektronen an die Komplexe I und II, die sie auf Ubichinon (UQ) übertragen. Das resultierende Ubichinol (UQH<sub>2</sub>) transportiert Elektronen und Protonen innerhalb der inneren mitochondrialen Membran zu Komplex III, dort werden die Elektronen an Cytochrom *c* (Cyt *c*) übertragen. Komplex IV überträgt Elektronen von Cytochrom *c* auf Sauerstoff (O<sub>2</sub>), der mit 2 Protonen (H<sup>+</sup>) Wasser (H<sub>2</sub>O) bildet. Der Elektronenfluß durch die Komplexe I, III und IV ist mit dem Protonenfluß aus der Matrix in den Intermembran-Raum verbunden. Blaue Pfeile symbolisieren Elektronen-Transport und schwarze Pfeile symbolisieren Protonen-Transport. Komplex V nutzt den Protonen-Gradienten über der mitochondrialen Membran zur Synthese von ATP (nicht gezeigt).

## Die Atmungskette

Das Ausgangssubstrat der Atmungskette ist NADH/H<sup>+</sup>, das bei zahlreichen Reaktionen des Zellstoffwechsels anfällt. Im ersten Schritt wird NADH durch die NADH-Dehydrogenase (Abb. 3, Komplex I) oxidiert. Dabei werden zwei Elektronen (und zwei Protonen) auf das

Flavinenzym Flavinmononukleotid (FMN) übertragen, das dadurch in den reduzierten Zustand (FMNH<sub>2</sub>) übergeht.

FMN ist ein Derivat des Vitamin B<sub>2</sub>, das nur von Pflanzen und Mikroorganismen gebildet werden kann. Tiere müssen Vitamin B<sub>2</sub> aufnehmen um FAD synthetisieren zu können.

Nach einer Reihe von Redoxreaktionen werden die zwei Elektronen von FMNH<sub>2</sub> auf Ubichinon übertragen, das dabei unter Aufnahme von zwei Protonen auf der Matrixseite der Membran zu Ubichinol reduziert wird. Quelle der beiden Protonen ist das FMNH<sub>2</sub>, daß diese auf der cytoplasmatischen Seite der Membran abgibt.

Ubichinon oder Koenzym Q ist ein Chinon-Derivat mit lipophiler Polypren-Seitenkette. Bei der oxidativen Phosphorylierung (Atmungskette) überträgt es Elektronen in der inneren Mitochondrienmembran von Komplex I zu Komplex III der Atmungskette. Der reduzierte Zustand des Koenzyms wird als Ubichinol bezeichnet. Seinen Namen verdankt Ubichinon der Tatsache, daß es in biologischen Zellen allgegenwärtig (ubiquitär) ist.

Das Ubichinol diffundiert innerhalb der inneren mitochondrialen Membran zum Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex (Abb. 3, Komplex III) und wird an der Außenseite der Membran unter Abgabe von zwei Protonen oxidiert. Über mehrere Redox-Komponenten (Cytochrome, Eisen-Schwefel-Proteine) werden einzelne Elektronen auf Cytochrom *c* übertragen. Dabei wird Cytochrom *c* (genauer: das enthaltene Fe<sup>3+</sup>-Ion) reduziert.

Innerhalb des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes findet der Q-Zyklus statt, in dessen Verlauf zwei weitere Protonen durch die Membran transportiert werden. Die Elektronen-Übertragungen des Q-Zyklus zwischen Cytochromen und Ubichinon sind Einelektronen-Reaktionen, bei denen das Semichinon-Radikal als Zwischenstufe gebildet wird. Der Q-Zyklus ist ein Modell zum Protonentransfer durch die katalytisch aktiven Domänen innerhalb des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes, er wurde von Mitchell vorgeschlagen (Mitchell, 1975) und später weiterentwickelt (Brandt und Trumpower, 1994; Crofts *et al.*, 2003). Dieser Zyklus beschreibt die Übertragung von Elektronen, die aus der Oxidation von Ubichinol gewonnen werden, auf das im Intermembranraum lokalisierte Cytochrom *c*. Das Cytochrom *c* vermittelt die Übertragung der Elektronen aus der Oxidation des Ubichinols auf die COX.

Von reduziertem Cytochrom *c* (genauer von Fe<sup>2+</sup>) werden Elektronen mit Hilfe der COX (Abb. 3, Komplex IV) auf molekularen Sauerstoff übertragen. Das dabei entstehende O<sub>2</sub><sup>2-</sup>-Anion vereinigt sich mit zwei Protonen zu Wasser, dem Endprodukt der Zellatmung.

### **Freie Radikale – ein Nebenprodukt der Atmungskette**

Das Superoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) wird *in vivo* sowohl enzymatisch, als auch nicht-enzymatisch (siehe Abb. 4) produziert (siehe 1.1.1.2).

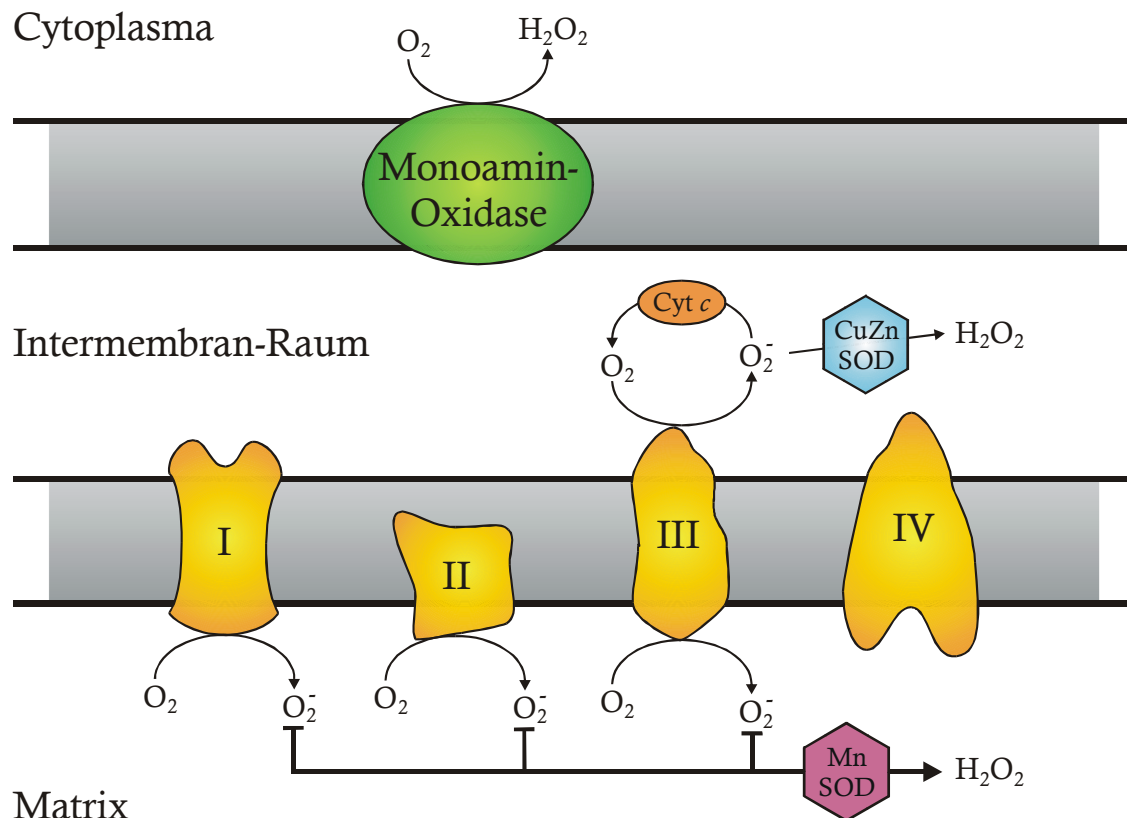
Die enzymatischen Quellen beinhalten Cytochrom P<sub>450</sub>-abhängige Oxygenasen (Coon *et al.*, 1992; siehe Abb. 4) und die NADPH-Oxidasen der Zellwände der polymorphonuklearen Zellen, Makrophagen und Endothel-Zellen (Babior, 2000, 2004; Babior *et al.*, 2002; Vignais, 2002). Die proteolytische Spaltung der Xanthin-Dehydrogenase zur Xanthin-Oxidase stellt eine weitere enzymatische Quelle für Superoxid, und für Wasserstoff-Peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dar. Das daraus hervorgehende Hydroxyl-Radikal (OH<sup>•</sup>) schädigt die Zelle *in vivo* (Yokoyama *et al.*, 1990; siehe 1.2.2).

Das hoch-reduzierte Milieu im Inneren der Mitochondrien ermöglicht es einigen Komponenten der Atmungskette (z.B. Flavine oder Eisen-Schwefel-Cluster) Elektronen auf Sauerstoff zu übertragen, wodurch Superoxid-Radikale entstehen (siehe Abb. 4). Dieses

„Elektronen-Leck“ ist in den meisten Geweben die Hauptquelle endogen erzeugter Superoxid-Radikale.

Befunde, die die Mitochondrien als ROS-Quelle belegen, wurden an Säugern erarbeitet: Die Lunge der Ratte wurde in Scheiben geschnitten und dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Dabei wurde etwa 9% des von den Lungenzellen metabolisierten Sauerstoffs zu Superoxid umgewandelt (Halliwell und Gutteridge, 1999). Selbst unter physiologischen Bedingungen, in denen die zelluläre Sauerstoff-Konzentration deutlich geringer ist, reagieren bis zu 2% des Sauerstoffs zu Superoxid (Boveris und Chance, 1973; Joenje, 1989).

Welches sind nun die Entstehungsorte der Sauerstoff-Radikale? Die Bildung von Wasserstoffperoxid erfolgt an der äußeren mitochondrialen Membran. Superoxid wird an beiden Seiten der inneren mitochondrialen Membran und in der Matrix gebildet (siehe Abb. 4, siehe Tab. 4). Das in der Matrix produzierte Superoxid wird auch dort abgebaut. Das im Intermembran-Raum produzierte Superoxid kann durch Spannungs-abhängige Anionen-Kanäle zum Teil in das Zytoplasma befördert werden (Han *et al.*, 2003).



**Abbildung 4: Quellen von Superoxid-Anionen.** Einige mitochondriale Komplexe verlieren Elektronen an Sauerstoff ( $O_2$ ) und bilden das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ). Vergleiche Tabelle 4. Im Intermembran-Raum können Superoxid-Radikale Cytochrom *c* (*Cyt c*) reduzieren, Sauerstoff wird dabei regeneriert. In Matrix (Mn-SOD) und Intermembran-Raum (Cu/Zn-SOD) werden Superoxid-Anionen von Superoxid-Dismutasen zu Wasserstoff-Peroxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Weitere Erklärungen siehe Text.

Welche Komponente der Atmungskette den größten Teil des Superoxids produziert hängt sowohl vom untersuchten Gewebe, als auch vom Grad der Respiration ab. In den Mitochondrien von Herz und Lunge hat Komplex III den größten Anteil an der Superoxid-Produktion (Turrens *et al.*, 1985; Turrens und Boveris, 1980). Neuere Befunde untermauern



die Bedeutung der an Komplex III generierten ROS für den Alterungsprozess (Crofts, 2004). An Komplex III wird Superoxid durch Semichinon gebildet. Das Semichinon-Radikal ist ein Zwischenprodukt des Q-Zyklus, da es selbst ein Radikal ist, kann es ein Elektron direkt auf Sauerstoff übertragen und Superoxid auf beiden Seiten der Membran bilden (Raha *et al.*, 2000; Trumpower, 1990).

Im Gehirn wurde Komplex I als primäre Quelle für Superoxid identifiziert (Barja, 1999; Barja und Herrero, 1998; Kudin *et al.*, 2004). Das von Komplex I generierte Superoxid wird unter anderem für Parkinson und den Alterungsprozess verantwortlich gemacht (Kushnareva *et al.*, 2002; Sherer *et al.*, 2003; Trojanowski, 2003). Die Quelle dieser Superoxid-Anionen scheint einer der beiden Eisen-Schwefel-Cluster N-1 $\alpha$  oder N-2 zu sein (Kushnareva *et al.*, 2002).

Neben Komplex I und III produziert auch Komplex II zumindest eine basale Menge an Superoxid. Der präzise Entstehungsort der ROS innerhalb der Succinat-Reduktase ist nicht bekannt (McLennan und Degli Esposti, 2000).

Zur Untersuchung der ROS-Produktion wurde Komplex II spezifisch durch Carboxin gehemmt. Die Menge *in vitro* (Mitochondrien, isoliert aus Ratten-Leber) produzierter Superoxid-Anionen wurde durch Messung der Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffes DCFDA bestimmt. DCFDA wird durch Superoxid chemisch verändert, sein Produkt zeigt starke Fluoreszenz (McLennan und Degli-Esposti, 2000).

**Tabelle 4: Lokalisierung mitochondrialer ROS-Quellen.** NADH-Dehydrogenase, Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom  $bc_1$ -Komplex sind Teil der Atmungskette. ROS-Quellen sind entweder in innerer bzw. äußerer mitochondrialer Membran (m. M.) bzw. in der mitochondrialen Matrix lokalisiert. Membran-lokalisierte Komplexe geben ROS auf die innere und/oder äußere Seite der mitochondrialen Membran ab.

Komplex / Enzym	Mitochondriale Lokalisation	Seite der Membran	Referenz
NADH-Dehydrogenase	Innere m. M.	innen	Genova <i>et al.</i> , 2001; Kushnareva <i>et al.</i> , 2002; Turrens und Boveris, 1980.
Succinat-Dehydrogenase	Innere m. M.	innen	Lenaz, 2001; McLennan und Degli-Esposti, 2000; Zhang <i>et al.</i> , 1998.
Cytochrom $bc_1$ -Komplex	Innere m. M.	innen	Boveris <i>et al.</i> , 1976; Cadenas <i>et al.</i> , 1977; Turrens <i>et al.</i> , 1985.
Cytochrom $bc_1$ -Komplex	Innere m. M.	außen	Han <i>et al.</i> , 2001; Starkov und Fiskum, 2001.
Externe NADH-Dehydrogenase (Hefe)	Innere m. M.	außen	Fang und Beattie, 2003.
Glycerinphosphat-Dehydrogenase	Innere m. M.	außen	Drahota <i>et al.</i> , 2002.
Dehydroorotat-Dehydrogenase	Matrix	-	Forman und Kennedy, 1976.
Mono-Amino-Oxidase	Äußere m. M.	innen	Cadenas und Davies, 2000.

Elektronen, die die Atmungskette durchlaufen, werden schlussendlich von der COX auf Sauerstoff übertragen. Da sich Sauerstoff in seinem Grundzustand in der Triplett-Konfiguration befindet (siehe 1.1.1.2), muss seine Reduktion in vier aufeinanderfolgenden Schritten erfolgen. Bei jedem Schritt wird ein (weitere) Elektron auf das Sauerstoff-Molekül übertragen. Entsprechende radikalische Zwischenprodukte würden sich hervorragend zur ROS-Produktion eignen. Obwohl einige der parziell reduzierten Zwischenprodukte relativ stabil sind, werden sie in der COX zurückgehalten, bis alle vier Elektronen transferiert sind. Dabei wirkt der Kofaktor Kupfer stabilisierend. Die COX selbst generiert keine Sauerstoff-Radikale.

Das endogen in den Mitochondrien gebildete Superoxid reagiert zu Peroxiden und zu Hydroxyl-Radikalen, die Zellen schädigen und eine wichtige Rolle bei der Alterung biologischer Systeme spielen.

## 1.2.2 Die Bedeutung freier Radikale für Alterungsprozesse

Die Freie-Radikaltheorie des Alterns nach Harman besagt, daß freie Radikale alle Arten von Biomolekülen schädigen. Da nicht alle DNA-Schäden durch zelluläre Reparatursysteme behoben werden können, sammeln sich Mutationen an. Die Akkumulation von fehlerhaften Biomolekülen einerseits und die zunehmende Zahl von Mutationen der DNA andererseits führt schließlich zu Seneszenz und Tod.

Die Atmungskette der Mitochondrien stellt die wichtigste endogene Quelle freier Radikale dar. Die Koenzyme von Komplex I und III der Atmungskette können Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen (siehe 1.2.1). Dadurch entstehen Superoxid-Radikale (Kudin *et al.*, 2004; siehe 1.1.1.2), die beliebige Biomoleküle wie DNA (LeDoux *et al.*, 1999; Richter *et al.*, 1988), Proteine (Stadtman und Levine, 2003), Polysaccharide (Kaur und Halliwell, 1994) und Lipide (Rubbo *et al.*, 1994) schädigen, indem sie Elektronen auf diese übertragen und damit nicht beabsichtigte Reaktionen induzieren (siehe 1.1.1.2).

Eine weitere Quelle freier Radikale liegt in Umwelteinflüssen begründet. Beispiele sind ionisierende Strahlung (z.B. natürliche Radioaktivität) bzw. Verbindungen, die die Bildung von Radikalen katalysieren (z.B. Schwermetalle) (Harman, 1956, 1981, 1998a, 2003; siehe auch 1.1.1.2). Harmans Theorie wird durch eine Vielzahl von Befunden unterstützt, die Alterungsprozesse und altersbezogene Krankheiten betreffen (Harman, 1998b).

Die Menge der endogen produzierten ROS lässt sich durch eine um 30%-50% Kalorien-reduzierte Diät (Kalorien-Restriktion) verringern (Gredilla *et al.*, 2001). Eine derartige Kalorien-Restriktion verlängert bei Nagern, Knochenfischen, Insekten und Spinnen die mittlere und die maximale Lebensspanne (McCay *et al.*, 1989; Weindruch und Sohal, 1997).

Die mittlere Lebensspanne wird als die Zeitspanne definiert, nach der 50% aller Individuen einer definierten Population gestorben sind. Die maximale Lebensspanne ist die Lebensspanne des Individuums mit der längsten Lebensspanne einer Population.

Die durch die Kalorien-Restriktion verursachten lebensverlängernden Mechanismen sind zwar im Detail nicht bekannt, scheinen aber mit der Reduktion der endogen produzierten ROS

in Zusammenhang zu stehen. Neuere Befunde deuten darauf hin, daß die bei der Kalorien-Restriktion verringerten ROS-Spiegel auf eine Absenkung des Protonen-Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran zurückzuführen sind. Dieses niedrigere Membran-Potenzial ist auf erhöhte Leckströme von Protonen zurückzuführen. Die Respirationsrate (Sauerstoff-Verbrauch) ist nicht verändert (Lambert und Merry, 2004). Die Ursachen hierfür könnten in durch die Kalorien-Restriktion veränderten Hormon-Spiegeln liegen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen, die belegen, daß die Gabe von Insulin die Wirkung der Kalorien-Restriktion bei Ratten revertiert (Lambert *et al.*, 2004).

Die mitochondrialen ROS-Spiegel werden durch Produktionsrate und Abbaurrate der ROS bestimmt. Die Menge endogen produzierter ROS hängt vor allem vom Zustand der Atmungskette ab (siehe 1.2.1). Zur Entsorgung der ROS tragen Antioxidations- und Reparatur-Systeme, sowie niedermolekulare Antioxidanzien bei. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Superoxid-Dismutasen, Glutathion-Peroxidasen und Katalasen. In Mitochondrien und Zytoplasma werden ROS durch unterschiedliche Enzymsysteme metabolisiert. Der Abbau des Superoxids erfolgt in der mitochondrialen Matrix durch die Mn-SOD, in Intermembran-Raum und Zytoplasma durch die Cu/Zn-SOD (siehe 1.1.2.2). Das resultierende Wasserstoff-Peroxid wird in den Peroxisomen des Zytoplasmas durch die Katalase zur Wasser und Sauerstoff gespalten (Phung *et al.*, 1994).

Die Katalase wurde in Mitochondrien der Herzmuskel-Zellen von Ratten nachgewiesen, in denen sie allerdings nur 1/4000 des gesamten mitochondrialen Proteoms ausmacht (Radi *et al.*, 1991). In den Mitochondrien anderer Zell-Typen, (z.B. Skelettmuskel), konnte der Nachweis bisher nicht erbracht werden (Phung *et al.*, 1994).

In der mitochondrialen Matrix übernimmt die Glutathion-Peroxidase die Funktion der Katalase. In Stoffwechsel-aktiven Leberzellen geht etwa ein Drittel der gesamten Glutathion-Peroxidase-Aktivität auf die Mitochondrien zurück (Chance *et al.*, 1979). Eine weitere Glutathion-Peroxidase – die Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathion-Peroxidase – ist mit der mitochondrialen Membran assoziiert. Sie reduziert Lipid-Peroxide der inneren mitochondrialen Membran (Nomura *et al.*, 2000).

Der Superoxid-Spiegel liegt durchschnittlich bei  $10^{-10}$  M, und der Peroxid-Spiegel bei  $50 \cdot 10^{-10}$  M (Cadenas und Davies, 2000). Dennoch sind diese äußerst geringen Mengen durchaus in der Lage, mitochondriale DNA zu schädigen, da mitochondriale DNA-Reparatur-Systeme weniger effizient arbeiten als die des Nukleus: Im Gegensatz zu nukleärer DNA besitzt die mtDNA keine Histone. ROS können die mtDNA direkt angreifen, dies führt zu einer im Vergleich zum Kern stark erhöhten Mutationsrate. Die mtDNA enthält etwa 10 bis 20 mal mehr 8-Hydroxy-Guanin als die DNA im Zellkern. 8-Hydroxy-Guanin, das Produkt der Oxidation von Guanin, ist ein Indikator für den Grad mutierter DNA (McCord und Fridovich,

1988). Da Teile der Atmungskette mitochondrial kodiert sind, inhibieren Mutationen der mtDNA indirekt die Respiration und stimulieren dadurch wahrscheinlich die Produktion von ROS. Ein Beispiel ist das Cockayne-Syndrom des Menschen, eine rezessiv vererbte Art der Zwergwüchsigkeit, die zu vorzeitiger Alterung führt. Das Cockayne-Syndrom entsteht durch den Ausfall des Enzyms, das die Entfernung des 8-Hydroxy-Guanin aus der mtDNA katalysiert und auf diese Weise Mutationen entgegenwirkt (Bohr *et al.* 1998).

Eine Reihe weiterer Befunde untermauert den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Alterungsprozessen. Beispielsweise besteht eine Korrelation zwischen der Akkumulation oxidierter Proteine und der Lebensspanne (Sohal *et al.*, 1993). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der gezielte Abbau von Superoxid und Wasserstoff-Peroxid und damit die Verringerung des oxidativen Stresses zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt: Die mittlere Lebensspanne von *D. melanogaster* wird durch Überexpression der Katalase und der Cu/Zn-SOD um 25% erhöht (Orr und Sohal, 1994).

Werden die geschilderten Befunde zusammengefasst, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, daß endogen produzierte freie Radikale die Hauptursache für Alterungsprozesse darstellen. Die mittlere Lebensspanne einer Spezies steht in Zusammenhang mit den mitochondrialen ROS-Spiegeln und der Effizienz mitochondrialer DNA-Reparatur-Systeme.

### **1.3 Modellsysteme der Alterungsforschung**

Aus ethischen und wissenschaftlichen Gründen eignet sich der Mensch nur bedingt zur Erforschung der Alterungsprozesse. Alternativ wurden in den vergangenen Dekaden die unterschiedlichsten Spezies zur Altersforschung herangezogen: Pilze (*P. anserina*, *N. crassa*, *S. cerevisiae*), Pflanzen (*A. thaliana*) und Tiere (*Mus musculus*, *D. melanogaster*, *C. elegans*).

#### **1.3.1 Charakteristika geeigneter Spezies**

Welches sind die Charakteristika der zur Alterungsforschung geeigneten Spezies? Wichtige Faktoren sind eine kurze Generationszeit und eine kurze mittlere Lebensspanne. Dies erlaubt die rasche Charakterisierung neu isolierter Mutanten und erhöht somit die Effizienz der Untersuchungen. Von ebenso großer Bedeutung ist die Übertragbarkeit der Befunde. Die den Alterungsmechanismen geeigneter Spezies zugrundeliegende Prinzipien sollten auf die Mehrzahl heute bekannter Ordnungen übertragbar sein. Im Hinblick auf praktische Fragen ist es von Vorteil, Alterungsprozesse an Spezies zu erforschen, die leichte Kultivierbarkeit und gute molekularbiologische Zugänglichkeit aufweisen (Beispiele sind gute Transformierbarkeit und Isolation von Mutanten). Da keine Spezies alle Anforderungen erfüllt, wurden in den

vergangenen Dekaden eine Reihe unterschiedlicher Spezies zur Alterungsforschung herangezogen (siehe Tab. 5):

- Pilze wie *P. anserina*, *S. cerevisiae* und *N. crassa* zeigen einerseits eine kurze Generationszeit bzw. mittlere Lebensspanne, andererseits sind sie von hervorragender molekularbiologischer Zugänglichkeit. Aufgrund ihrer relativ geringen Differenzierung eignen sich Pilze vor allem für die Erforschung grundlegender Mechanismen.
- Tierische Spezies wie *D. melanogaster* und *C. elegans* zeigen eine kurze Generationszeit bzw. mittlere Lebensspanne. Sie sind aber, im Gegensatz zu Pilzen, von höherer Komplexität. Der Einfluss von Mutationen ist phänotypisch leichter zu erkennen. Auch Zusammenhänge zwischen Alterungsmechanismen und der Ontogenese können detailliert untersucht werden.
- Säuger wie Ratten und Mäuse werden zur Untersuchung komplexerer Netzwerke von Alterungsmechanismen herangezogen. Diese Spezies sind vor allem aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft zum Menschen und ihrer hohen Komplexität, die genetische Veränderungen phänotypisch kenntlich macht, von Interesse. Nachteilig ist die relativ hohe Generationszeit und Lebensspanne, sowie die Komplexität molekularbiologischer Methoden (z.B. Transformation, Gen-Deletion etc.).
- Bei der Analyse von Zellkulturen entfällt das Problem hoher Generationszeit bzw. schwieriger Transformierbarkeit. Allerdings ist die Kultivierbarkeit erschwert, da Säuger-Zellen auf Medien angewiesen sind, die beispielsweise Wachstumsfaktoren enthalten müssen.
- Untersuchungen pflanzlicher Alterungsprozesse heben sich von Pilzen und tierischen Modellen ab, die Untersuchung der Blatt-Seneszenz beispielsweise betrachtet nur Alterungsprozesse innerhalb eines Organs.

Eine Aussage über die Lebensspanne des gesamten Organismus kann so nicht getroffen werden. Ein weiteres Problem stellt bei Pflanzen ihr Entwicklungsprogramm dar, einjährige Spezies wären möglicherweise in der Lage länger zu leben, ihr Absterben ist aber Teil ihres Entwicklungsprogramms. Die Unterscheidung zwischen Seneszenz bzw. Absterben als Teil der Entwicklung kann mitunter sehr diffizil sein.

**Tabelle 5: Vergleich von Modellsystemen der Alterung.** Verglichen werden die Hefe *S. cerevisiae*, die filamentösen Ascomyceten *P. anserina* und *N. crassa*, der Nematode *C. elegans*, die Fruchtfliege *D. melanogaster* und die Maus *M. musculus*.

Spezies	Organisationsstufe	Mittlere Lebensspanne	Generationszeit	Referenz
<i>S. cerevisiae</i>	Einzellige Hefe	2-3 Tage	2 Stunden	Bitterman <i>et al.</i> , 2003
<i>P. anserina</i>	Ascomycet	30 Tage	12-14 Tage	Tudzynski und Esser, 1977
<i>N. crassa</i>	Ascomycet	Wochen oder unsterblich	22 Stunden (asexuell)	Stevenson <i>et al.</i> , 2000
<i>C. elegans</i>	Nematode	10 Tage	3 Tage	Jorgensen & Mango, 2002 Vellai <i>et al.</i> , 2003
<i>D. melanogaster</i>	Insekt	7 Wochen	2 Wochen	Helfand & Rogina, 2003
<i>M. musculus</i>	Säuger	2 - 2,5 Jahre	8 Wochen	Droge, 2003

Um die vielfältigen Prozesse zu verstehen, die den Ablauf der Alterung und die Lebensspanne beeinflussen, erscheint es sinnvoll mit weniger komplexen Spezies zu arbeiten. Prinzipielle Grundlagen können auf diese Weise relativ schnell analysiert werden. Eine geeignete Spezies ist *P. anserina*, deren Alterungsprozesse seit einem halben Jahrhundert erforscht werden.

### **1.3.2 Der Ascomycet *P. anserina***

Der filamentöse Hyphenpilz *P. anserina* wird der Klasse der *Ascomycetes*, der Ordnung der *Sphaeriales* und der Familie der *Sordariaceae* zugeordnet. In seinem natürlichen Habitat wächst er auf Herbivoren-Dung. Während seines Lebenszyklus bildet *P. anserina* Perithezien aus, die etwa 100 Asci enthalten. Ein derartiger Ascus enthält normalerweise vier dikaryotische Sporen. Gelegentlich werden Sporen mit nur einem, seltener drei Kernen ausgebildet. Monokaryotische Sporen sind für die genetische Analyse von Interesse, da das aus ihnen hervorgehende homokaryotische Myzel genetisch identisch ist und entweder den Paarungstyp "plus" oder "minus" besitzt. Dikaryotische Sporen enthalten meist Kerne beider Paarungstypen, auswachsendes Myzel ist heterokaryotisch und somit in der Lage Fruchtkörper zu bilden. Aus diesem Grund wird *P. anserina* auch als pseudohomo-thallich bezeichnet.

Alle bisher charakterisierten Wild-Stämme von *Podospora* zeigen eine Stamm-spezifische Lebensspanne im Bereich von einigen Wochen. Stamm s beispielsweise hat eine mittlere Lebensspanne von etwa 24 Tagen (Rizet, 1953a; Rizet, 1953b) bzw. 30 Tagen (Tudzynski und Esser, 1977). Der Unterschied von 6 Tagen ist auf die Verwendung unterschiedlicher Nährmedien zurückzuführen. Nach einer Phase des vegetativen Wachstums zeigt *Podospora* Symptome der Seneszenz: Die Wachsrate nimmt ab, die peripheren Hyphen der Wuchsfrent verändern ihre Morphologie, die Pigmentierung der Kultur ändert sich und es kommt schließlich zur Einstellung des Wachstums und zum Absterben der peripheren Hyphen (Rizet, 1953a und 1953b). Die Lebensspanne eines Stammes hängt von Umweltfaktoren (z.B. Temperatur, Versorgung mit Nährstoffen und Spurenelementen) und genetischer Prädisposition ab. Hierbei sind sowohl nukleäre als auch mitochondriale Gene von Interesse (Esser und Tudzynski, 1980; Osiewacz, 2002A; Osiewacz und Stumpferl, 2001). In den vergangenen Dekaden wurden ein Reihe langlebiger Mutanten charakterisiert. Einige dieser Mutanten zeigen Veränderungen derselben molekularen Stoffwechselwege, ihre Lebensspannen unterscheiden sich dennoch drastisch. Ein Beispiel stellen Mutanten mit stark eingeschränkter COX-Respiration dar.

### 1.3.2.1 Die Kupfermangel-Mutante *grisea*

Eine der am ausführlichsten charakterisierten Mutanten ist *grisea*. Ursprünglich wurde *grisea* als rezessive Mutante charakterisiert, deren Lebenspanne gegenüber dem Wild-Stamm um 60% erhöht ist (Prillinger und Esser, 1977). Der Phänotyp von *grisea* ist pleiotrop, Myzel und Ascosporen sind grau, das Wachstum ist verlangsamt, *grisea* ist temperatursensitiv (Wachstum bei 37°C stark vermindert) und nahezu weiblich steril (verminderte Bildung reifer Perithezien). Weiterhin kann keine Aktivität der Laccase I, II, III oder der Tyrosinase nachgewiesen werden (Prillinger und Esser, 1977; Tudzynski und Esser, 1979). Da Laccasen und Tyrosinasen Kupfer als Kofaktor enthalten, lag die Annahme nahe, daß es sich bei *grisea* um eine Kupfermangel-Mutante handelt. *Grisea* kann durch steigende Kupfer-Konzentrationen im extrazellulären Medium revertiert werden. 10 µM CuSO<sub>4</sub> revertieren *grisea* zum Teil und 100 µM CuSO<sub>4</sub> revertieren *grisea* vollständig. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der unter Kupfer-Mangel angezogene Wild-Stamm s einen *grisea*-ähnlichen Phänotyp aufweist (Marbach *et al.*, 1994). Um die in *grisea* mutierte Komponente des Kupfer-Metabolismus zu identifizieren, wurde eine genomisch Bank von *P. anserina* transformiert. Das durch Komplementation erhaltene Gen *Grisea* kodiert ein 597 AS langes Protein, das in einer Cystein-reichen Domäne 54% bzw. 46% Identität zu dem Kupfer-regulierten Transkriptionsfaktor MAC1 bzw. ACE1 aus *S. cerevisiae* aufweist (Osiewacz und Nuber, 1996). Durch die Supprimierung einer MAC1-Mutante der Hefe konnte GRISEA als Ortholog von MAC1 identifiziert werden (Borghouts und Osiewacz, 1998). Der Transkriptionsfaktor GRISEA wird bereits durch relativ geringe Kupfer-Konzentrationen in seiner Funktion beeinträchtigt. Bei intrazellulärem Kupfer-Mangel stimuliert GRISEA die Transkription von *PaSod2* und *PaCtr3*, deren alleiniger Transkriptionsfaktor es ist. *PaSod2* kodiert für die mitochondriale Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (Mn-SOD). *PaCtr3* kodiert für den hochaffinen Kupfer-Importer PaCTR3, der den intrazellulären Kupfer-Spiegel erhöht und damit die Aktivität von GRISEA reduziert (siehe 1.1.2.1, 1.1.3.3; Borghouts *et al.*, 2002A, 2002B und 2001).

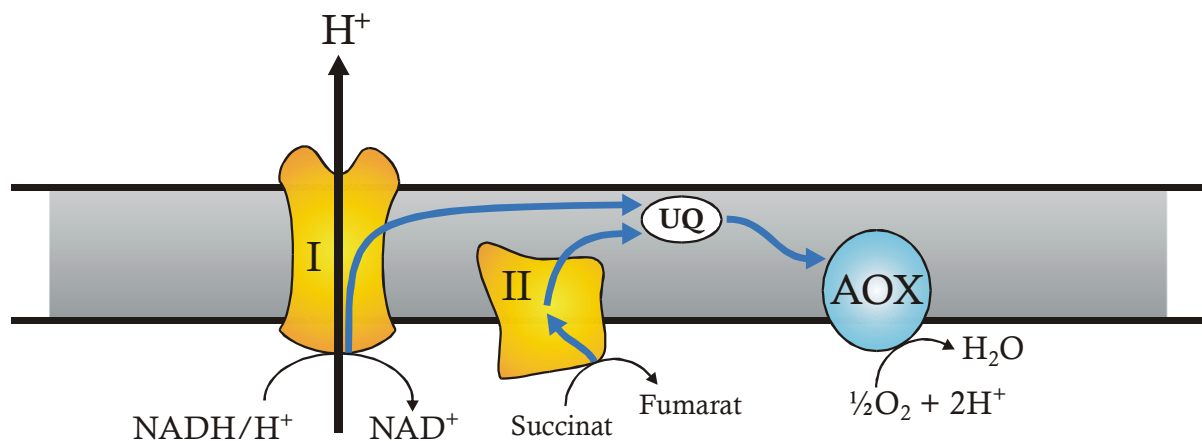
In der Mutante *grisea* kann auch dann kein Transkript von *PaCtr3* und *PaSod2* nachgewiesen werden, wenn die Mutante mit hoher extrazellulärer Kupferkonzentration (250 µM) kultiviert wird. Phänotypisch revertiert *grisea* dennoch zum Wild-Typ (Borghouts *et al.*, 2002a).

Der Befund, daß es sich bei *grisea* um eine Kupfermangel-Mutante handelt, erklärt auch ihren pleiotropen Phänotyp. Neben Laccasen und der Tyrosinase ist Kupfer auch für die Assemblierung und Funktion der COX essenziell. Ein obligater Aerobier ist auf eine funktionelle Atmungskette angewiesen. In *P. anserina* führt der Ausfall der COX allerdings nicht zum Tod, sondern zur Induktion der alternativen Oxidase (AOX).

In *P. anserina* ist die AOX 363 Aminosäuren lang und kommt im Genom in einer Kopie vor. In der inneren mitochondrialen Membran liegt sie vermutlich als Monomer vor, das Eisen als essenziellen Kofaktor benötigt (Borghouts *et al.*, 2001; Übersicht bei: Affourtit *et al.*, 2002).

Die alternative Oxidase (AOX) übernimmt die Rolle der terminalen Oxidase der Atmungskette (Borghouts *et al.*, 2001; Frese und Stahl, 1992; Schulte, 1988). Die Unterschiede zwischen COX- und AOX-Respiration liegen in der Positionierung der Atmungsketten-Komplexe begründet. Bei COX-Respiration werden Elektronen über die Komplexe I und III auf die COX (Komplex IV) übertragen, dabei werden pro Elektronen-Paar drei Protonen aus der Matrix gepumpt (siehe 1.2.1, Abb. 3). Die AOX übernimmt Elektronen paarweise von Ubichinol und überträgt sie auf Sauerstoff (Übersicht: Wood und Hollomon, 2003). Im Gegensatz zur COX pumpt die AOX keine Protonen aus der Matrix, Komplex III ist nicht Teil der AOX-Atmungskette. Verglichen mit der COX-Atmungskette benötigt die AOX-Atmungskette theoretisch die dreifache Elektronen-Menge (und damit auch NADH/H<sup>+</sup>) um die selbe Menge Protonen aus der Matrix zu pumpen (siehe Abb. 5).

## Intermembran-Raum



## Matrix

**Abbildung 5: Elektronenfluß und Protonentransfer der Atmungskette mit AOX als terminaler Oxidase.** NADH/H<sup>+</sup> und Succinat liefern Elektronen an die Komplexe I und II, die sie auf Ubichinon (UQ) übertragen. Das resultierende Ubichinol (UQH<sub>2</sub>) transportiert Elektronen und Protonen innerhalb der inneren mitochondrialen Membran zur alternativen Oxidase (AOX). Die AOX überträgt Elektronen von Ubichinol auf Sauerstoff (O<sub>2</sub>), der mit Protonen (H<sup>+</sup>) Wasser (H<sub>2</sub>O) bildet. Der Elektronenfluß durch Komplex I ist mit dem Protonenfluß aus der Matrix in den Intermembran-Raum gekoppelt. Blaue Pfeile symbolisieren Elektronen-Transport, der dicke schwarze Pfeil symbolisiert Protonen-Transport. Komplex V nutzt den Protonen-Gradienten über der mitochondrialen Membran zur Synthese von ATP (nicht gezeigt).

In Mutante *grisea* wurde COX-Aktivität, bei Wachstum auf Standard-Medium (BMM), nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen (Borghouts *et al.*, 2002B; Borghouts *et al.*, 2001). Die geringe Aktivität der COX scheint für die verlängerte Lebensspanne ursächlich zu sein, da auch andere *P. anserina*-Mutanten mit reduzierter COX-Aktivität eine – im Vergleich zum Wild-Stämmen – erhöhte Lebensspanne aufweisen (Dufour *et al.*, 2000; Kück *et al.*, 1985a;



Stumpferl *et al.*, 2004). In seneszenten *P. anserina* Wild-Stämmen kommt es zur Destabilisierung der mitochondrialen DNA (mtDNA), die mtDNA der Mutante *grisea* ist stabilisiert (Borghouts *et al.*, 2000; Borghouts *et al.*, 1997). Eine derartige Stabilisierung des mitochondrialen Genoms wirkt Alterungsprozessen entgegen (siehe 1.3.2.3).

### 1.3.2.2 Weitere langlebige *P. anserina*-Mutanten

Neben *grisea* wurden weitere Mutanten mit AOX-Atmung charakterisiert. In den mitochondrialen Mutanten *ex1* und *ex2* wurden Teile des Gens *CoxI* deletiert, das für die COXI Untereinheit kodiert. Die Respiration dieser Mutanten erfolgt ausschließlich über den AOX-Atmungsweg (siehe Abb. 5). Im Gegensatz zu *grisea* leben sie bereits seit über 18 Jahren (Kück *et al.*, 1985b; Schulte *et al.*, 1988).

In der mitochondrialen Mutante *mex* ist – ähnlich der Mutante *ex* – das erste Exon und das erste Intron von *CoxI* deletiert. Sie sind ebenfalls sehr langlebig (Belcour und Vierny, 1986; Vierny *et al.*, 1982). Auch die Deletion des Gens *PaCox5* induziert AOX-Atmung und Langlebigkeit (Dufour *et al.*, 2000).

Die Disruption von *PaCox5* verhindert die Assemblierung des COX-Komplexes. Der Ausfall der COX-Respiration induziert den AOX-Atmungsweg (Dufour *et al.*, 2000).

Die Mutanten *grisea*, *ex*, *mex* und *cox5::BLE* nutzen den AOX-Atmungsweg der sich in zwei Punkten grundlegend vom COX-Atmungsweg unterscheidet:

1. Die COX-Atmung ist theoretisch um den Faktor 3 effizienter, da pro Elektronen-Paar das in die Atmungskette eintritt, drei Protonen aus der Matrix gepumpt werden. Bei der AOX-Atmung ist es nur ein Proton, dies führt zur Absenkung des Membranpotenzials (Protonen-Druck) der inneren mitochondrialen Membran.
2. Während beim COX-Atmungsweg ROS an den Komplexen I, II und III gebildet werden können (s. Abb. 4), findet beim AOX-Atmungsweg wahrscheinlich keine ROS-Bildung an Komplex III statt, da er nicht Teil der AOX-Atmungskette ist.

Die Überexpression der AOX revertiert in Mutante *cox5::BLE* die lebensverlängernden Effekte der Deletion von *PaCox5* (Lorin *et al.* 2001). Die lebensverlängernde Wirkung der AOX-Respiration scheint auf die Absenkung des mitochondrialen Membranpotenzials zurückzuführen zu sein, die führt vermutlich zu einer Reduktion der ROS-Produktion. Diese Vermutung wird durch den Befund untermauert, daß *P. anserina* Wild-Stämme, die auf Kupfermangel-Medium kultiviert werden und deren COX-Respiration herabgesetzt ist, ebenfalls eine längere Lebensspanne aufweisen (Marbach *et al.*, 1994).

Auf Kupfermangel-Medium enthält der Wild-Stamm vermutlich sehr wenig aktive COX. Damit bleibt wahrscheinlich auch das Membranpotenzial unter dem des auf Normalmedium gewachsenen Wild-Stammes.

Es zeigt sich eine indirekte Proportionalität zwischen herabgesetztem Protonen-Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran (Membranpotenzial) und verlängerter Lebensspanne.

In Mutante *grisea* induziert Kupfermangel AOX-Respiration, und reduziert vermutlich die mitochondriale ROS-Produktion. Der globale Kupfer-Mangel beeinflusst neben dem Ausfall der COX auch eine Reihe anderer Kupfer-abhängiger Enzyme. Eines davon ist die Cu/Zn-SOD, die an der Entsorgung von ROS beteiligt ist (siehe 1.1.1.1, 1.1.1.2; Borghouts *et al.*, 2002B und 2001).

Da die Expression von *PaSod1* konstitutiv ist, wird das Apo-Protein der Cu/Zn-SOD in *grisea* gebildet, es steht allerdings kein Kupfer zum Einbau zur Verfügung. In *grisea* konnte keine SOD-Aktivität nachgewiesen werden (Borghouts *et al.*, 2002B und 2001).

Da GRISEA der alleinige Transkriptionsfaktor des Gens *PaSod2* ist, kann auch die Mn-SOD nicht exprimiert werden (Borghouts *et al.*, 2001). Das Fehlen einer aktiven SOD könnte eine Erklärung für die – im Gegensatz zu *ex* – geringen Steigerung der Lebensspanne (60%) sein. Die Mutante *ex* besitzt funktionelle Superoxid-Dismutasen (Borghouts *et al.*, 2002b).

### 1.3.2.3 Die Umstrukturierung des Chondrioms während der Seneszenz

Die intrazellulären Kupfer-Spiegel beeinflussen nicht nur die Aktivität diverser Proteine, sie beeinflussen auch die Stabilität der mitochondrialen DNA. In Wild-Stämmen kommt es mit zunehmendem Alter zu Umstrukturierungen des Chondrioms: Teile der mtDNA, die sogenannten *senDNAs* werden amplifiziert; andere Bereiche der mtDNA und der Anteil intakter mtDNA-Zirkel nehmen signifikant ab.

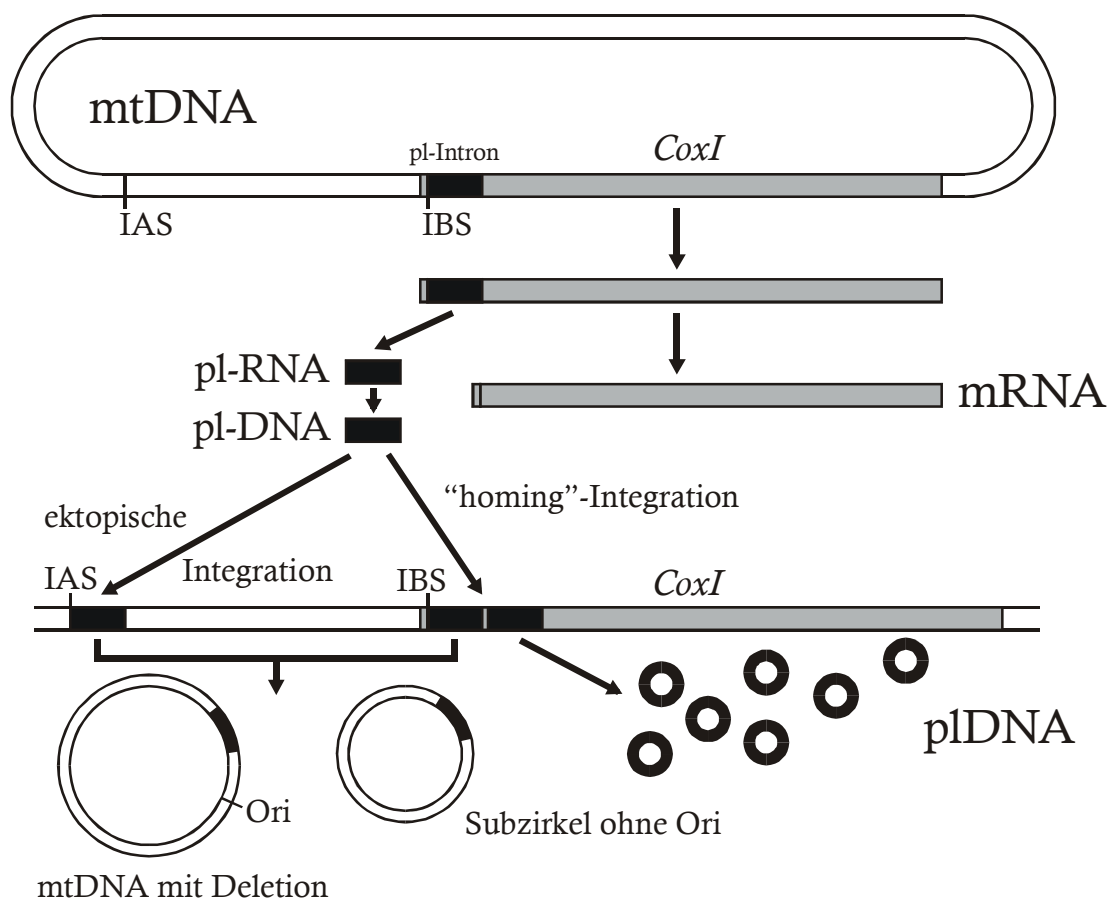
### Die Amplifikation von plDNA

In allen charakterisierten *P. anserina* Wild-Stämmen können mit zunehmendem Alter steigende Mengen zirkulärer plDNA (aus dem englischen: „plasmid like DNA“; auch als  $\alpha$ -*senDNA* bezeichnet) nachgewiesen werden (Cummings *et al.*, 1979; Kück *et al.*, 1985a; Stahl *et al.*, 1978). Gleichzeitig gehen große Teile des Chondrioms verloren. Die Sequenz der plDNA entspricht der des ersten 2,5 kBp langen Introns (pl-Intron) des *CoxI*-Gens der mtDNA (Borghouts *et al.*, 2000; Kück *et al.*, 1981; Osiewacz und Esser 1984). Nachdem das pl-Intron aus der *CoxI*-RNA geschnitten wurde („Splicing“) kann seine Sequenz durch eine von ihm selbst kodierte Reverse Transkriptase in DNA zurückgeschrieben werden (Faßbender *et al.*, 1994; Michel und Lang, 1985; Sellem *et al.*, 1990).

Ein auf dem 2,5 kBp langen pl-Intron befindlicher ORF kodiert für ein Protein mit signifikanter Homologie zu mRNA-Maturasen und reversen Transkriptasen (Michel und Lang, 1985; Osiewacz und Esser 1984). Das überexprimierte Genprodukt besitzt nachweisbare reverse Transkriptase-Aktivität (Faßbender *et al.*, 1994).

Die resultierende Kopie des pl-Introns wird nun in Tandem hinter das bestehende pl-Intron in *CoxI* integriert („homing like“ Integration). An diesem Vorgang ist eine kurze Sequenz des ersten *CoxI*-Exons, die Intron-Bindestelle (IBS) beteiligt, die ebenfalls für das Entfernen des Introns aus dem Primärtranskript benötigt wird (Borghouts *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1990). Werden mehrere Kopien des Introns in Tandem integriert, kann es durch homologe Rekombination zur Bildung von DNA-Zirkeln kommen, die eine oder mehrere Kopien des Introns enthalten. Die Summe dieser DNA-Zirkel bildet die pIDNA (siehe Abb. 6).

Die revers transkribierte DNA-Kopie des Introns kann auch in ektopische Stellen der mtDNA integriert werden, zur Integration dient eine IBS-ähnliche Sequenz (Borghouts *et al.*, 2000; Sellem *et al.*, 1993). Homologe Rekombination zwischen ektopisch integrierten Kopien des pl-Introns teilt die mtDNA in Subzirkel (siehe Abb. 6). Da die mtDNA nur einen Replikations-Ursprung enthält, führt homologe Rekombination zwischen Kopien des pl-Introns zum Verlust von Teilen der mtDNA.



**Abbildung 6: Amplifikation von pIDNA.** Nach der Transkription des Gens *CoxI* der mtDNA wird die pl-RNA aus der mRNA geschnitten und revers in DNA transkribiert. Diese DNA-Kopie des pl-Introns kann in Tandem hinter das bestehende pl-Intron integriert werden („homing like“ Integration). An diesem Vorgang ist die Intron-Bindestelle (IBS) beteiligt. Werden mehrere Kopien des Introns in Tandem integriert, kommt es zu homologer Rekombination und zur Bildung von pIDNA-Zirkeln. Alternativ kann die DNA-Kopie des pl-Introns in mehrere ektopische Positionen der mtDNA integriert werden, zur Integration dient eine IBS-ähnliche Sequenz (IAS). Homologe Rekombination zwischen ektopischen Kopien des pl-Introns teilen die mtDNA in mehrere Subzirkel, von denen nur einer den Replikations-Ursprung (Ori) besitzt. Weitere Erklärungen siehe Text.

Jedes Mitochondrium enthält mehrere mtDNA-Zirkel, der Verlust von DNA-Sequenzen eines mtDNA-Moleküls kann durch intakte mtDNA-Zirkel zu einem gewissen Grad ausgeglichen werden (Sato und Kuroiwa, 1991). Fehlen einem Mitochondrium Sequenzen, die essenzielle Komponenten der Atmungskette kodieren, können diese nicht neu gebildet werden. Da vorhandene Komponenten der Protein-Degradation unterliegen, nimmt die Zahl der entsprechenden Proteine ständig ab. Sind einzelne Komplexe der Atmungskette in zu geringer Zahl vorhanden, kommt es zum Stau der Elektronentransport-Kette. Durch den resultierenden „Elektronen-Stau“ können Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, dies führt zur Bildung von ROS. Die vermehrte Bildung von ROS führt wiederum zu verstärkter Schädigung der mtDNA.

### **Kupfer beeinflusst die Amplifikation von plDNA**

Der Befund, daß Kupfermangel-Mutante *grisea* nur Spuren von plDNA zeigt, ist ein Hinweis darauf, daß zelluläre Kupfer-Spiegel und die Amplifikation von plDNA miteinander in Zusammenhang stehen (Borghouts *et al.*, 1997). Da sich die Transkriptionsrate von *CoxI* in Wild-Stamm und Mutante *grisea* nicht unterscheidet, und auch das Spleißen des pl-Introns nicht beeinträchtigt ist, scheint in *grisea* die Bildung der plDNA *per se* gestört zu sein. Die Hypothese, daß eine ausreichende Versorgung der Zelle mit Kupfer, für die Amplifikation der plDNA notwendig ist, wird zusätzlich von folgendem Befund untermauert: In *grisea* induziert die Zugabe von hohen extrazellulären Kupfer-Mengen (250 µM) die Bildung von plDNA (Borghouts *et al.*, 2000). Beeinflusst Kupfer die Amplifikation der plDNA direkt oder indirekt? In *grisea* wurde gezeigt, daß die Transposition des pl-Introns in *CoxI* oder in eine ektopische Position der mtDNA von Kupfer unabhängig ist. In PCR-Experimenten wurden Kopien des pl-Introns in *CoxI* und in ektopischen Positionen nachgewiesen (Borghouts *et al.*, 2000). Kupfer scheint die plDNA-Amplifikation also indirekt zu stimulieren, beispielsweise über die Assemblierung der Kupfer-abhängigen COX.

Eine weiterer Stamm, der ein stabilisiertes Chondriom zeigt, ist *cox5::BLE*. In dieser Mutante ist *PaCox5* disruptiert, welches für einen essenzieller Bestandteil des COX-Komplexes kodiert. Dementsprechend zeigen *cox5::BLE*-Stämme ebenfalls AOX-Respiration. Im Gegensatz zu *grisea* leidet *cox5::BLE* wahrscheinlich nicht an Kupfer-Mangel, plDNA wird trotzdem nur in geringen Mengen amplifiziert (Dufour *et al.*, 2000). Die Überexpression der AOX in *cox5::BLE*-Stämmen induziert die Amplifikation von plDNA und destabilisiert die mtDNA (Lorin *et al.*, 2001). Die Amplifikation der plDNA ist vermutlich nicht direkt Kupfer-

abhängig, vielmehr scheint ein hohes mitochondriales Membranpotenzial – und damit eine ausreichende Versorgung mit ATP – nötig zu sein (Borghouts *et al.*, 2000).

### **Ist die Amplifikation der pIDNA Ursache der Alterungsprozesse in *P. anserina*?**

Mutante *grisea* (siehe 1.3.2.1) zeigt während der gesamten Lebensspanne ein stabilisiertes Chondriom, pIDNA konnte nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden (Borghouts *et al.*, 1997). Die Lebensspanne von *grisea* ist gegenüber dem Wildstamm um 60% verlängert (Prillinger und Esser, 1977). Dieser Befund ist ein erster Hinweis drauf, daß die Amplifikation der pIDNA mit Alterungsprozessen in Zusammenhang steht.

Das mitochondriale Genom der Mutante *cox5::BLE* ist stabilisiert, pIDNA kann – ebenso wie in *grisea* – nur in Spuren nachgewiesen werden. Die Lebensspanne von *cox5::BLE*-Stämmen ist signifikant verlängert (Dufour *et al.*, 2000). Da *grisea* und *cox5::BLE* durch AOX-Respiration charakterisiert sind, stellt sich die Frage, zu welchen Teilen die verlängerte Lebensspanne beider Mutanten auf die Stabilisierung der mtDNA bzw. auf AOX-Respiration zurückzuführen ist.

Mutante *mid26* zeigt ebenso wie *grisea* und *cox5::BLE* ein stabilisiertes mitochondriales Genom, unterscheidet sich allerdings in ihrem Respirations-Typ. Ebenso wie der Wild-Stamm nutzt *mid26* die COX als terminale Oxidase der Atmungskette. Mutante *mid26* unterscheidet sich vom Wildstamm nur durch das Fehlen des ersten Introns in *CoxI* (COX1 wird in *mid26* funktionell gebildet). Dementsprechend wird in *mid26* keine pIDNA amplifiziert. Ihre Lebensspanne ist zwar gegenüber dem Wild-Stamm verdoppelt, *mid26* ist allerdings nicht unsterblich (Begel *et al.*, 1999). Die Amplifikation der pIDNA ist für die Alterung von *P. anserina* nicht ursächlich, vielmehr wirkt sie als Beschleuniger der Seneszenz.

### **Die Amplifikation von $\beta$ -senDNA**

In *P. anserina* Wild-Stämmen werden mit steigendem Alter neben dem pl-Intron auch andere Bereiche der mtDNA amplifiziert. Dabei handelt es sich um  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\varepsilon$ - und  $\theta$ -senDNAs. Die senDNAs der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Regionen werden sehr häufig in DNA-Proben seneszenten Kulturen nachgewiesen. Im Gegensatz zur pIDNA besteht die  $\beta$ -senDNA aus Monomeren variabler Länge, die durch Rekombination kurzer homologer Sequenzen der mtDNA entstanden sind. Trotz unterschiedlicher Termini beinhalten  $\beta$ -senDNAs einen gemeinsamen Kernbereich von etwa 1 kbp Länge (Cummings *et al.*, 1979 und 1985; Jamet-Vierny *et al.*, 1980 und 1997B; Jamet-Vierny und Shechter, 1994). Die molekularen Mechanismen, die zur Amplifikation von pIDNA bzw.  $\beta$ -senDNA führen sind unabhängig. Die *mex16*-Mutante ist aufgrund der

Deletion eines Teils des ersten Introns von *CoxI* nicht befähigt pDNA zu amplifizieren, die Amplifikation der  $\beta$ -senDNA kann allerdings induziert werden (Jamet-Vierny *et al.*, 1997a).  $\beta$ -senDNAs amplifizieren vermutlich durch Auto-Replikation, beginnend an einem vermuteten Replikations-Ursprung, der in der zentralen Region der  $\beta$ -senDNAs lokalisiert ist (Jamet-Vierny und Shechter, 1994). Durch die Analyse von 36  $\beta$ -senDNAs konnte die Konsensus-Sequenz kurzer direkter Sequenz-Wiederholungen („short direct repeats“, 3-27 Bp) nahe der – durch homologe Rekombination verbundenen – beiden Enden der  $\beta$ -senDNAs ermittelt werden. Diese Konsensus-Sequenzen scheinen für die Amplifikation der  $\beta$ -senDNAs essenziell zu sein (Jamet-Vierny *et al.*, 1997b). In langlebigen Mutanten wie *ex*, *mex*, *cox5::BLE* und *grisea* ist das mitochondriale Genom stabilisiert (siehe oben). Lediglich in *grisea* induziert die Zugabe von Kupfer COX-Atmung und vermutlich in Folge dessen die Amplifikation von  $\beta$ -senDNAs (Borghouts *et al.*, 2000). Wiederum scheint die Amplifikation mitochondrialer Regionen von einer ausreichenden Versorgung mit ATP abhängig zu sein. Dies zeigen auch Ergebnisse, die im Laufe dieser Arbeit präsentiert werden.

## 1.4 Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die zelluläre Kupfer-Homöostase wird durch ein Netzwerk präzise kontrollierter Komponenten gewährleistet. In der Hefe *S. cerevisiae* wurden die molekularen Grundlagen des Kupfermetabolismus in den vergangenen Dekaden ausführlich untersucht: Kupfer kann von niedrigaffinen Transportern passiv (erleichterte Diffusion) bzw. von hochaffinen Transportern aktiv (unter ATP-Verbrauch) in die Zelle importiert werden. Im Zytoplasma wird Kupfer von Speicher-Proteinen komplexiert oder von Chaperonen zu Organellen (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum etc.) bzw. Kupfer-abhängigen Enzymen (Cu/Zn-SOD, Tyrosinase etc.) transportiert (siehe 1.1.2). Auch in dem Ascomyceten *P. anserina* wurde der Kupfermetabolismus eingehend analysiert. Ausgangspunkt war hier die Charakterisierung des Transkriptionsfaktors GRISEA, der in *P. anserina* als zentraler Regulator der Kupferhomöostase wirkt. Neben GRISEA wurde eine Reihe von Komponenten der Kupfer-Homöostase identifiziert: Beispiele sind die niedrigaffinen bzw. hochaffinen Kupfer-Importer PaCTR2 bzw. PaCTR3, das Metallothionein PaMT1 und das Kupfer-Chaperon PaCOX17 (siehe 1.1.2 und 1.3.2).

Die *P. anserina* Mutante *grisea* ist durch globalen Kupfer-Mangel und den daraus resultierenden pleiotropen Phänotyp charakterisiert (siehe 1.3.2). Der Kupfer-Mangel bewirkt einerseits die Induktion der AOX-Respiration und andererseits den Ausfall einer Reihe Kupfer-abhängiger Enzyme, wie beispielsweise der Cu/Zn-SOD, der Laccasen und der

Tyrosinase. Während die AOX-Respiration die Lebensspanne wahrscheinlich positiv beeinflusst, wirkt sich der Ausfall der Superoxid-Dismutasen negativ aus. Erstaunlicherweise ist die mittlere Lebensspanne von *grisea* gegenüber dem Wild-Stamm um 60% erhöht. Um hier eine spezifische Eingrenzung der für die Kontrolle der Lebensspanne relevanten Prozesse vornehmen zu können, sollte das Kupfer-Defizit auf die Mitochondrien beschränkt werden. Dieses zelluläre Kompartiment wurde gewählt, weil es bei *P. anserina* eine in der Vergangenheit durch viele Befunde belegte, wesentliche Rolle bei der Alterung spielt.

Ziel der Arbeit war die Konstruktion eines Gentausch-Plasmids für das Gen *PaCox17*, welches für ein putatives Kupfer-Bindeprotein kodiert, das Kupfer innerhalb der Mitochondrien transportiert und für die Assemblierung der kupferabhängigen COX essenziell ist. In einer *PaCox17*-Nullmutante sollte der Kupfermangel auf Funktionen beschränkt sein, deren Ausfall die Lebensspanne positiv beeinflusst. Im Gegensatz zu *grisea* werden allerdings keine Funktionen beeinträchtigt, deren Ausfall die Lebensspanne reduzieren. Die Isolation einer *PaCox17*-Nullmutante und deren anschließende Charakterisierung sollte tiefere Einblicke in den Kupfer-Metabolismus von *P. anserina* gewähren. Die beobachteten physiologischen Veränderungen der *PaCox17*-Nullmutante belegen klar Zusammenhänge zwischen Kupferstoffwechsel, Ontogenese, oxidativem Stress und Alterung.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material und Bezugsquellen

#### 2.1.1 Bezugsquellen

Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg	[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dCTP, ProbeQuant G-50 Säulchen.
Aurora, Frankfurt	Maismehl.
Boehringer, Mannheim	Ampicillin, CIP alkalische Phosphatase, DIG- $\lambda$ /HindIII Längenstandard, DIG-DNA labelling and detection kit.
Calbiochem	Bleocin, Hygromycin B.
Difco Laboratories, Detroit (USA)	Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Agar, Hefe-Extrakt, Hefe-Stickstoffbasis ohne AS.
Falcon	Plastikröhrchen für die Transformation von <i>S. cerevisiae</i> , Typ: 5490.
Gibco BRL, Karlsruhe	Agar, CsCl.
Invitrogen, Paisley	Select Agar, Tris-HCl.
Macherey-Nagel, Düren	NucleoSpin-Kit, Nucleotrap-Kit.
MBI Fermentas, St. Leon-Roth	100 Bp-Längenstandard, Restriktionsenzyme.
Merck, Darmstadt	Iso-Butanol, Chloroform, CuSO <sub>4</sub> , EDTA, Essigsäure, Glucose, Glycin, Isoamylalkohol, KCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KOH, LiCl, Maleinsäure, Maltose, MgCl <sub>2</sub> , MgSO <sub>4</sub> , MnCl <sub>2</sub> , Na <sub>2</sub> Ac., NaCl, Na <sub>3</sub> Citrat, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaOH.
Millipore, Bedford	Dialyse-Membranen VSWP02500.
Novo Nordisk Ferment AG	$\beta$ -D-Glucanase (Glucanex).
Pharmacia, Freiburg	dNTPs, Klenow DNA Polymerase, Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, T4 Polynucleotid-Kinase.
Qiagen, Hilden	Midi-/Maxi- Plasmid-/Cosmid-Präparations-Kit.
Roche, Penzberg	„Blocking-Reagent“ für DIG-Detektion.
Roth, Karlsruhe	Ethanol, Glycerin (86%), Ka <sub>2</sub> Ac., Methanol, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Phenol, Isopropanol.
Serva, Heidelberg	Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie “Brilliant Blue”, PEG (600, 4000) Ponceau S, RNase A, Sorbit, TEMED (=N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylen-diamin), Triton X 100.
Sigma, Deisenhofen	Aminosäuren, Ascorbinsäure, BCS, CaCO <sub>3</sub> , Casein-Hycroysat, DMPC, GTC, Li <sub>2</sub> Ac., $\beta$ -Mercaptoethanol, MOPS, Tween 20.

#### 2.1.2 Geräte

Autoklav	Getinge.
Präparations-Mikroskop	Heerbrugg, Schweiz (WILD M3Z).
Bunsenbrenner	Schütt Labortechnik; Usbeck Laborgeräte.
Brutschränke	Heraeus (BK6160); Infors (KT); Rubarth Apparate.
CCD-Videodensitometer	Cybertech, Mitsubishi. Zugehörige Software: Wincam für Windows 3 (Hitachi).
Elektrophorese-Kammern	Biorad (Subcell, Wide-Mini-Subcell; Subcell).
Elektroporator, Küvetten	EQUIBIO (EasyjecT Prima, ECU-102 Küvetten).
Heizblock	Techne (DRI-BLOCK DB.2A).
Hybridisierungsöfen	Amersham Lifesciences.
PCR-Geräte	Biometra (T1 Thermocycler), Stratagene (RoboCycler Gradient 40).
pH-Meter	Knick (Calimatic 761).
Rotations-Schüttler	Scientific Industries Inc. (Vortex Genie 2).



Rührer	IKA-Labortechnik (IKAMAG-REO und RTC-basic).
Sauerstoffelektrode	Rank Brothers.
Spektralphotometer	Pharmacia (Ultrospec III).
Sterilbänke	Clean Air (CLF 460 EC; NSF 49).
Thermaldrucker	Mitshubishi „Video Copy Processor“.
Thermomixer	Eppendorf (Thermomixer 5436).
Transformatoren	Pharmacia (GPS 200/400, EPS200); BioRad (Power Pac 3000).
Transilluminator 254 nm	Cybertech TFM (M40).
Trockenschrank	EHRET (TKE117); Köttemann.
UV-Spektralphotometer	Pharmacia (GeneQuant II).
UV-DNA-Vernetzer	Stratagene (Stratalinker 1800).
Vakuum-Pumpe	Pharmacia; Biorad.
Vakuum-Transferapparatur	Pharmacia.
Vakuum-Trockner	Savant (RVt100; SC110A).
Wasserbäder	GFL (1083); Julabo (MP, U3); Köttemann.
Zentrifugen	Du Pont (Sorvall); Eppendorf (5403, 5415); Heraeus (Biofuge fresco, Varifuge 3.0).

### 2.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.**

Bezeichnung	Länge	Nukleotidsequenz (5' → 3')	Verwendung
C17-7	18	CTC AAA CCC GCA AAC ACC	SEQ
CB	21	TAT GGA TCC GAT ATG GGA TTG	PCR
CN	24	CCC GCT AGC ATT GCC GCT GAG CCG	PCR
F20	19	CGC TTT CAC ACA TTC AAG C	PCR
F21	18	CCG CCT AAT CCT TCT TCC	PCR
<i>NcCox11-fw</i>	18	GCG GTT CCG ATT CCG ACG	PCR
<i>NcCox11-rev</i>	18	GGT ACG CCC TTG AGC ACG	PCR
PDIC-fw	12	CCC GAC ATC TGC	PCR
PGET-fw	12	CC(G/C) GG(C/T) GAG ACC	PCR
Reverse	16	AAC AGC TAT GAC CAT G	SEQ
S1	18	CCC CAT CTT TAA ACC TCA	PCR
S2	18	AAT GTC CTC CGC CCA AGC	PCR
S3S2	18	GGA CTG GGC GAA CGG CGG	SEQ
SC- <i>Pst</i> I	24	AAC CTG CAG GGG TAA TCT GCA TGG	PCR
SC- <i>Xba</i> I	22	TTC TAG AGC TTT GAC TTG GAG C	PCR
SC01-NC5	19	CGC TTT CAC ACA TTC AAG C	PCR
SC01-NC3	18	CCG CCT AAT CCT TCT TCC	PCR
SC01-PA1	16	CTC CTC TAC CAG ATC G	SEQ
SC01-SC5	18	GTT CGT ATA AGG CAA GGG	PCR
SC01-SC3	18	CGA TAC ACC TTC GCC GGG	PCR
SEQ3S	18	GAG GTT TAA AGA TGG GGA	SEQ
Universal	17	GTA AAA CGA CGG CCA GT	SEQ
VDHS-rew	12	GCT GTG GTC GAC	PCR
YTFF-rew	12	GAA (A/G)AA (G/C)GT ATA	PCR

Verwendung: PCR, PCR-Amplifikation; SEQ, Sequenzierung. Die Oligonukleotide wurden von BioSpring, Scientific Research & Development GmbH und der Roth GmbH synthetisiert.

## 2.1.4 Vektoren

**Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.**

Bezeichnung	relevante Selektionsmarker	Referenz	Herkunft/Anmerkung
pAD4	Leu, Amp <sup>R</sup>	Stratagene	Propagierbar in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i> . Geeignet als Expressionsvektor für cDNAs in <i>S. cerevisiae</i> .
pAD4- <i>PaCox17</i>	Leu, Amp <sup>R</sup>	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A	Das Plasmid pAD4 wurde mit <i>Hind</i> III und <i>Sal</i> I geschnitten und mit der cDNA von <i>PaCox17</i> ligiert, die cDNA wurde zuvor mit <i>Hind</i> III und <i>Xho</i> I geschnitten.
pAN7-1	Amp <sup>R</sup> , Hyg <sup>R</sup>	Punt <i>et al.</i> , 1987	Ein pAN52-1-Derivat, mit <i>hph</i> -Gen versehen. Die Hygromycin B-Kassette wurde zwischen die <i>Bgl</i> III- und die <i>Hind</i> III-Schnittstelle gesetzt.
pBH-4	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Bei dem Vektor pBH-4 handelt es sich um den mit <i>Nhe</i> I-geschnittenen und religierten Vektor pPaC17- <i>hph</i> . <i>Nhe</i> I deletiert den 5' Bereich von <i>PaCox17</i> und 766 Bp des <i>gpd</i> -Promotors der <i>hph</i> -Kassette, deren Transkription dadurch jedoch nicht nennenswert beeinflusst wird.
pBH-K5	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Zur Konstruktion des Plasmids pBH-K5 wurde Plasmid pBH-4 ( <i>Nhe</i> I geschnitten, geglättet und <i>Kpn</i> I nachgeschnitten) mit der <i>PaCox17</i> -5'-Flanke des Plasmids pPaΔC17-K5 ( <i>Bam</i> HI geschnitten, geglättet und mit <i>Kpn</i> I nachgeschnitten) ligiert.
pBHP-9	Amp <sup>R</sup>	Stumpferl <i>et al.</i> , 2004	Zur Konstruktion des <i>PaCox17</i> -Gentausch-Plasmids pBHP-9 wurde pBH-K5 mit <i>Kpn</i> I linearisiert. In die <i>Kpn</i> I-Stelle wurde das 4,6 kBp lange <i>Kpn</i> I-Fragment des Plasmids pPaCox17::ble kloniert.
pCmt1-2	Amp <sup>R</sup>	Averbeck <i>et al.</i> , 2001	Dieses Plasmid enthält die cDNA des Gens <i>PaMt1</i> von <i>P. anserina</i> . Es wurde zur Herstellung von radioaktiven <i>PaMt1</i> -Sonden verwendet.
pPaCox17g-1c	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle von pPaCox17g-1b wurde durch Restriktion mit <i>Bam</i> HI, Auffüllen mit Klenow-Polymerase und Religation deletiert.
pBSSK(+)	Amp <sup>R</sup>	Stratagene	Klonierungs-Vektor. Dieser Vektor wurde zur Klonierung genomischer Fragmente und cDNAs genutzt.
pBSX-13	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	<i>PaScol</i> / <i>Ssp</i> I/ <i>Xho</i> I (Promotor, ORF, Terminator) in pBSSK/ <i>Ssp</i> I/ <i>Xho</i> I.

pPaCox17Δble	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Der Vektor pPaCox17::ble wurde mit <i>KpnI</i> geschnitten und religiert. Der resultierende Vektor pPaCox17Δble besteht aus pBSSK, dem 2,5 kBp 5'-Bereich von <i>PaCox17</i> und einem kurzen Linker.
pPaC17-hph	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Vektor pPaCox17Δble wurde mit <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i> geschnitten; ca. 0,2 kBp des <i>PaCox17</i> -5'-Bereichs fallen weg. In pPaCox17Δble wurde eine Hygromycin B-Resistenzkassette (3984 Bp) aus pAN7-1 kloniert (mit <i>BglII</i> und <i>HindIII</i> geschnitten). Das <i>BglII</i> - bzw. <i>NcoI</i> -Ende der Fragmente wurde mit Klenow aufgefüllt und glatt ligiert. Dementsprechend wurden beide Schnittstellen eliminiert.
pPaCox17::ble	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Ein pPaΔCox17-Derivat, in dem der <i>BamHI/NheI</i> -Linker durch die 3,0 kBp lange, mit <i>BglII</i> und <i>HindIII</i> geschnittene, Phleomycin-Kassette des Vektors pUT703 ersetzt wurde. Die Phleomycin-Kassette befindet sich zwischen dem 5'-Bereich und dem 3'-Bereich von <i>PaCox17</i> .
pPaΔCox17	Phleo <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Der <i>PaCox17</i> -ORF von pPaCox17g-1c wurde deletiert. Konkret wurde die Sequenz zwischen Bp -130 und +44 durch einen 104 Bp <i>BamHI/NheI</i> -Linker ersetzt.
pEXM	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	<i>E. coli</i> Plasmid pUC18/ <i>EcoRI/HindIII</i> ~MT-Promotor/ <i>EcoRI/HindIII</i> . P <sub>MT</sub> aus pEX-MT geschnitten.
pEXMPaSco1-6	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	pEXM/ <i>PstI/XbaI</i> geschnitten und mit 1169 bp <i>PaSco1</i> -ORF Einschub (durch SC- <i>PstI</i> & SC- <i>XbaI</i> amplifiziert, mit <i>PstI/XbaI</i> geschnitten) ligiert.
pPaCox17g-1b	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Ein pPaCox17g-1-Derivat, dessen 3,1 kBp umfassendes <i>KpnI</i> -Fragment deletiert wurde.
pMY60	Amp <sup>R</sup>	Verbeet <i>et al.</i> , 1983	Derivat von pBR322, enthält ein mit <i>HindIII</i> geschnittenes Fragment einer rDNA Einheit von <i>S. carlsbergensis</i> .
pPaCox17g-1	Amp <sup>R</sup>	Stumpfperl <i>et al.</i> , 2004	Ein pBSSK-Derivat, dessen <i>XbaI</i> -Schnittstelle genomische DNA (8 kBp) aus <i>P. anserina</i> enthält. Dieses Fragment enthält <i>PaCox17</i> .
pPaCox17g-2	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Der Vektor pPaCox17g-2 besteht aus einem 3,2 kBp Fragment, das in die <i>SmaI</i> -Stelle von pUC18 kloniert wurde. Dieses genomische <i>P. anserina</i> Fragment wurde mit <i>PvuI</i> und <i>NdeI</i> geschnitten und mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Es beinhaltet den 5' Bereich und den ORF (nahe <i>NdeI</i> ) von <i>PaCox17</i> .
pPaSco1	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	(=pB- <i>PaSco1</i> -1) pBSSK/ <i>EcoRV/XhoI</i> mit 2 kBp Fragment aus Cosmid 36E11/ <i>EcoRV/XhoI</i> . Das 2 kBp Fragment enthält 2/3 des 3' Endes des Gens <i>PaSco1</i> . Das 3' Ende wurde mit Oligo „reverse“ sequenziert.

pSL( <i>ble</i> )	Phleo <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Brachmann, 2001	Enthält die Phleomycin-Resistenzkassette als 2,4 kBp <i>NotI</i> -Fragment aus pUTHsp70Not (ein Derivat von pUT715 (Cayla)) in die <i>NotI</i> -Schnittstelle von pSL1180 inseriert. Das <i>ble</i> -Gen (aus <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ) wird von dem <i>U. maydis</i> hsp70-Promotor und dem <i>A. nidulans</i> <i>trpC</i> -Terminator flankiert (siehe Anhang). Dieser Vektor diente in der vorliegenden Arbeit zur Isolation von kurzen Linkern, die als Adaptoren bei Ligationen verwendet wurden.
pSP17	Amp <sup>R</sup>	Stahl <i>et al.</i> , 1982	Vektor pBR322 mit zwei Kopien der pDNA (entspricht erstem Intron von <i>PaCoxI</i> ) in <i>SalI</i> -Stelle.
pPaΔCox17g-2	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Der Vektor pPaCox17g-2 wurde mit <i>BglII</i> ( <i>PaCox17</i> -Fragment) und <i>EcoRI</i> (im pUC18 Rückgrat) geschnitten, mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und religiert. Dem resultierenden Vektor pPaΔCox17g-2 fehlen 0,8 kBp ( <i>PaCox17</i> -ORF).
pUC18	Amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985	Pharmacia, Klonierungs-Vektor, Kontrollvektor zur Bestimmung der DNA-Konzentration und Transformationseffizienz.
pUC19	Amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985	Pharmacia, Klonierungs-Vektor, Kontrollvektor zur Bestimmung der DNA-Konzentration und Transformationseffizienz.
pPaΔCox17ΔK	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Der Vektor pPaΔCox17g-2 wurde mit <i>KpnI</i> geschnitten (im <i>PaCox17</i> -Teil), mit Klenow-Polymerase geglättet und religiert. Es resultierte pPaΔCox17ΔK.
pPaΔC17-K5	Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit	Zur Konstruktion dieses Vektors wurde pUC18 mit <i>SmaI</i> geschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 2,5 kBp Fragment kloniert, welches von pPaΔCox17ΔK mittels PCR (Universal und Reverse Oligos) amplifiziert wurde. Dieses Fragment enthält den 5'-Bereich von <i>PaCox17</i> , und ist in Richtung der <i>KpnI</i> -Stelle von pUC18 (oberhalb <i>SmaI</i> ) hin orientiert.
pUT703	Phleo <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Calmels <i>et al.</i> , 1991	Enthält 3,0 kBp Phleomycin-Kassette zwischen <i>BamHI</i> - und <i>HindIII</i> -Schnittstellen. Die Transkription von <i>ble</i> erfolgt durch den <i>gpd</i> -Promotor, die Termination durch den <i>ble</i> -Terminator.

## 2.1.5 Radiochemikalien

Zur radioaktiven Markierung von Nukleinsäuren wurde [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) verwendet. Für eine typische Markierungsreaktion wurden 25  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (8,33 pmol) eingesetzt.

## 2.1.6 Medien

Der pH-Wert der im folgenden beschriebenen Medien wird mittels geeigneter Säuren (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bzw. Basen (NaOH, KOH) eingestellt. Dabei ist jeweils die Substanz zu wählen, deren Anion (bei Säuren) bzw. Kation (bei Basen) bereits Teil des entsprechenden Medium ist. So wird beispielsweise HCl und NaOH zum Einstellen des pH-Werts eines Medium verwendet, welches NaCl enthält.

### 2.1.6.1 Medien zur Kultivierung von *E. coli*.

LB-Broth	1% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Trypton; 170 mM NaCl; pH = 7,0.
LB-Festmedium	0,5% (w/v) Hefe-Extrakt, 1% (w/v) Trypton; 85 mM NaCl; 2% (w/v) Agar für Festmedium; pH = 7,0.
LBA-Medium	LB Medium mit 50 mg/l Ampicillin.
TB-Medium	2,4% (w/v) Hefe-Extrakt; 1,2% (w/v) Trypton; 0,34% (v/v) Glycerin; 1/10 Vol. TB-Phosphatpuffer.

### 2.1.6.2 Medien zur Kultivierung von *P. anserina*.

Amoniumacetat-Medium	BM-Medium mit 60 mM Amoniumacetat; 2% (w/v) Agar.
BM-Medium (BMM)	Grob gefilterter Extrakt von 50 g/l Maismehl in H <sub>2</sub> O p.a. (12 Stunden, 60°C); 8 g/l Biomalz; 2% (w/v) Agar für Festmedium; pH = 6,5 (mit KOH eingestellt).
CM-Medium	70,0 mM NH <sub>4</sub> Cl; 11,0 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 6,7 mM KCl; 2,0 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1% (w/v) Glucose; 0,2% (w/v) Trypton; 0,2% (w/v) Hefe-Extrakt, 0,1% (v/v) CM-Stammlösung A; pH = 6,5.
Transformationsmedium, stabilisiert; für <i>P. anserina</i>	3,7 g NH <sub>4</sub> Cl; 2 g Trypton; 1 g Casaminoacids; 1 g Hefe-Extrakt; 10 g Glucose-Monohydrat; 342,3 g Saccharose; 1,5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,5 g KCl; 0,54 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 1 mg MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O; 1 mg FeSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; 1 mg CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O; 1 mg ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O; mit H <sub>2</sub> O p.a auf 1 L auffüllen; pH = 6,0. Grundmedium: 1,2% Agar. Überschichtungsmedium: 0,5% Agar.

### 2.1.6.3 Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae*.

SD-Medium	0,67% Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, 1 M Sorbit; 2% (w/v) D-Glucose; 2% (w/v) Agar für Festmedium; pH = 5,8. Neben der Glucose (in H <sub>2</sub> O p.a. gelöst) werden die folgenden AS (L-Isomere; Temperatur < 60°C) zugegeben: 20 mg/l Adenin-hemisulfat; 20 mg/l Arginin HCl; 100 mg/l Asparaginsäure; 100 mg/l Glutaminsäure; 20 mg/l Histidin HCL Monohydrat; 30 mg/l Isoleucin; 100 mg/l Leucin; 30 mg/l Lysin HCl; 20 mg/l Methionin; 50 mg/l Phenylalanin; 40 mg/l Serin; 200 mg/l Threonin;
-----------	--

20 mg/l Tryptophan; 30 mg/l Tyrosin; 20 mg/l Urazil;  
150 mg/l Valin. Die Aminosäure(n) die zur Selektion benutzt  
werden sollen werden nicht zugegeben.

YPAD-Medium	40 mg/l L-Adenin-hemisulfat; 2% (w/v) Pepton; 1% (w/v) Hefe-Extrakt; 2% (w/v) D-Glucose; 2% (w/v) Agar für Festmedium; pH = 5,8.
YPG-Medium	3% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) Pepton; 1% (w/v) Hefe-Extrakt; pH = 6,3.

## 2.1.7 Puffer und Lösungen

30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	30% (w/v) Acrylamid; 0,8% (w/v) Bisacrylamid.
AM-Puffer	0,35 M Mannitol; 30 mM MOPS; 1 mM EDTA; 0,2% BSA. pH = 7,6.
CsCl-Lösung	5,7 M CsCl; 0,1 M EDTA; pH = 7,4; Refraktionsindex (autoklaviert) mit DMPC-H <sub>2</sub> O auf 1,400 einstellen.
Coomassie-Entfärber	20% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure; 3% (v/v) Glycerin.
Coomassie-Lösung	50% (v/v) Methanol; 7% (v/v) Essigsäure; 0,1% (w/v) Coomassie-Brilliantblau.
Denaturierungs-Lösung	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.
Denhardt	0,2 g/l Ficoll <sub>400</sub> ; 0,2 g/l BSA; 0,2 g/l Polyvinylpyrrolidon.
DIG-Puffer 1	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl.
DIG-Wasch	997 ml DIG-Puffer 1; 3 ml Tween 20 (Polyoxoethylen-Sorbit-Monolaurat).
DIG-„Block“	0,5 g „Blocking-Reagent“ (Roche); ad. 100 ml DIG-Puffer 1.
DIG-Puffer 3	1 M Tris-Cl (pH=9,5); 5 M NaCl.
DMPC-H <sub>2</sub> O	1 ml DMPC in 100 ml 50% (w/v) Ethanol p.a. lösen, Zugabe von 900 ml autoklaviertem Wasser, Inkubation 30 Min. (RT), autoklavieren.
GTC-Puffer	5,5 M Guanidinthiocyanat; 25 mM Na <sub>3</sub> Citrat; 0,5% (w/v) N-Lauroylsarkosin; pH = 7,0.
KCN-Lösung	100 mM KCN in Sauerstoff-Puffer lösen.
Laemmli-Probenpuffer	10% (w/v) Glycerin; 5% (v/v) β-Mercaptoethanol; 3% (w/v) SDS; 0,001% (w/v) Bromphenolblau; 62,5 mM (w/v) Tris-HCl. pH = 6,8. Bei -20°C lagern.
LiSORB	100 mM LiAc; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 1 M Sorbit; pH = 8,0.
Lysozym-Lösung	10 g/l in TE gelöst.
10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS; 50 mM NaAcetat; 10 mM EDTA; pH = 7,0.
MW-Puffer	0,3 M Mannitol; 20 mM MOPS; 1 mM EDTA; 0,2% BSA; pH = 7,2.
Nativer Laufpuffer	25 mM Tris; 150 mM Glycin.
Nativer Probenpuffer	7,5 ml Glycerin (86%); 9,375 ml 0,5 M Tris (pH = 7,0); 0,25 g Brom-Phenol-Blau; ad. 25 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
NBT-Lösung	2 g/l NBT in Phosphat-Puffer P gelöst.
Neutralisierungs-Lösung	2 M NaCl; 1 M Tris-HCl; pH = 5,5.

OPL-I	10 µg/ml Hexanukleotide (pd(N) <sub>6</sub> , Pharmacia) in TE gelöst.
OPL-II-C	0,5 M Tris-HCl; 0,1 M MgCl <sub>2</sub> ; 70 mM β-Mercaptoethanol; 5 mM dATP; 5 mM dGTP; 5 mM dTTP; pH = 7,5.
P-Block	0,2% (w/v) I-Block (Tropix); 0,1% (v/v) Tween-20 in 1x PBS gelöst.
P-Wasch	0,1% Tween-20 in 1x PBS.
PaTENS	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 100 mM NaCl; 2% (w/v) SDS; pH = 8,0.
PBS-Puffer	137 mM NaCl; 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 5 mM KCl; 1 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . pH = 7,5.
PEG-Lösung	60% (w/v) PEG 4000; 50 mM CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; 10 mM Tris-HCl; pH = 7,5. (für die <i>P. anserina</i> -Transformation).
PEG-Lösung	50% (w/v) PEG 3350 in H <sub>2</sub> O p.a. (für die <i>S. cerevisiae</i> -Transformation).
Phosphat-Puffer P	0,1 M Kaliumphosphat, pH = 7,8.
Prähybridisierung („high-SDS“, DIG)	5x SSC; 0,1% Laurosylysarkosin; 7% SDS, 2% Blocking-Reagenz, 50 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; pH = 7,0.
Prähybridisierung (radioaktiv)	5x SSC; 40 mM Tris-HCl; 5x Denhardt-Lösung; 0,5% SDS. Dazu kommen 100 µg/ml frisch Hitze-denaturierte Heringssperma-DNA.
Riboflavin-Lösung	1 g/l Riboflavin (Sigma R-4500) in Phosphat-Puffer P gelöst.
Sammelgel-Puffer	375 mM Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS. pH = 8,8.
Sauerstoff-Puffer	0,1% (w/v) Glucose; 2,0 mM Succinat; 13,2 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 86,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH = 6,0. Nicht autoklavieren, steril filtrieren.
SHAM-Lösung	40 mM Salicyl-Hydroxaminsäure in Sauerstoff-Puffer bei 60°C lösen.
SSC	150 mM NaCl; 15 mM Na <sub>3</sub> Citrat; pH = 7,0.
ST-DNA	10 g/l Heringssperma in H <sub>2</sub> O p.a.
STC-Lösung	1 M Sorbit; 10 mM Tris-HCl; 50 mM CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O; pH = 7,5.
STET	0,1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 5% (w/v) Triton X100; pH = 8,0.
TE	10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH = 8,0.
TGM-Puffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl; 20% (v/v) Methanol. pH = 8,3.
TGS-Puffer	192 mM Glycin; 0,25 M Tris-HCl; 1% (w/v) SDS.
TPS	5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 45 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 800 mM Saccharose; pH = 5,5.
Trenngel-Puffer	125 mM Tris-HCl; 0,1% (w/v) SDS; pH = 6,8.

## 2.2 Stämme

### 2.2.1 *E. coli*-Stämme

**Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stämme.**

Stamm	relevante Selektionsmarker, Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$	F', <i>endA1</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , <i>sup44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recA1</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15.	Hanahan, 1985
XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15, Tn10(Tet <sup>r</sup> ).	Bullock <i>et al.</i> , 1987

### 2.2.2 *P. anserina*-Stämme

**Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete *Podospora anserina*-Stämme.**

Stamm	relevante Selektionsmarker, Genotyp	Referenz
ex1	<i>ex1</i>	Schulte <i>et al.</i> , 1988
grisea	<i>grisea</i>	Prillinger und Esser, 1977
PaCox17::ble-P1-P12	<i>PaCox17::ble</i>	Diese Arbeit, *
PaCox17::ble-37312	<i>PaCox17::ble</i>	Diese Arbeit, **
PaCox17::ble-47690	<i>PaCox17::ble</i>	Diese Arbeit, **
PaCox17::ble-47692	<i>PaCox17::ble</i>	Diese Arbeit, **
s	-	Esser, 1974
T28	Heterokaryon, enthält Wildtyp und <i>PaCox17::ble</i> Kerne	Diese Arbeit

\* Stammen von einem homokaryotischen Sphäroplasten des Stammes T28 ab, welcher Kerne mit der *PaCox17::ble* Mutation enthält.

\*\* Nachkommen (Monokaryotische Ascosporen) der Kreuzung PaCox17::ble-P12 (*mat*<sup>-</sup>) und Wildtyp Stamm s (*mat*<sup>+</sup>).

### 2.2.3 *S. cerevisiae*-Stämme

**Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme.**

Stamm	relevante Selektionsmarker, Genotyp	Referenz
W303	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	*
W303 $\Delta$ COX17	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 <math>\Delta</math>cox17::TRP1</i>	Glerum <i>et al.</i> , 1996a
W303 $\Delta$ COX17-pAD4	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 <math>\Delta</math>cox17::TRP1</i> pAD4	Diese Arbeit
W303 $\Delta$ COX17- <i>PaCox17</i>	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 <math>\Delta</math>cox17::TRP1</i> <i>PaCox17</i>	Diese Arbeit
W303 $\Delta$ SCO1	<i>ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 <math>\Delta</math>sco1::URA3</i>	Glerum <i>et al.</i> , 1996b

\* Dr.Rodney Rothstein, Department of Human Genetics, Columbia University.



## **2.3 Mikrobiologische und genetische Methoden**

### **2.3.1 Bestimmung der Zelldichte**

#### ***E. coli***

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde photometrisch in einem LKB Ultrospec III Photometer (Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Dabei entspricht die optische Dichte bei 600 nm  $OD_{600} = 1$  im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums etwa  $1 \cdot 10^9$  Zellen / ml Kultur.

#### ***S. cerevisiae***

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem LKB Ultrospec III Photometer bei 600 nm bestimmt. Dabei entspricht  $OD_{600} = 1$  im Verhältnis zum Leerwert des jeweiligen Kulturmediums etwa  $1-5 \cdot 10^7$  Zellen / ml Kultur.

### **2.3.2 Kultivierung**

#### **2.3.2.1 Kultivierung von *E. coli***

*E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180-200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden aus bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen bzw. direkt von Transformationsplatten angeimpft.

#### **2.3.2.2 Kultivierung von *P. anserina***

*P. anserina*-Stämme wurden entweder als Flüssigkulturen (CM) bei 144 Upm oder auf Festmedien (BMM, BMM mit 60 mM Ammoniumacetat) unter aeroben Bedingungen bei 27°C unter Dauerlicht (Leuchtstoffröhre) kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Dauerkulturen wurden auf Festmedium (BMM) bei 4°C für maximal sechs Monate kultiviert. Nach spätestens sechs Monaten wurde ein Myzelstück auf frisches Medium überimpft.

#### **2.3.2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae***

*S. cerevisiae*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 180 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 30°C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtskulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4°C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80°C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

### **2.3.3 Transformation**

#### **2.3.3.1 Transformation von *E. coli***

##### **CaCl<sub>2</sub>-Transformation von *E. coli* (Cohen *et al.*, 1972)**

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium 1/200 mit einer frischen XL1blue-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Sorvall) sedimentiert und in 100 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung von ~0°C resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Sorvall), der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung, die 15% (v/v) Glycerin enthielt (~0°C), resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 100 µl mit 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. 2 µl Ligationsansatz versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 min bei 42°C wurde der Transformationsansatz zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 900 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 180 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf LBA-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von bis zu 10<sup>6</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

##### **Transformation von *E. coli* durch Elektroporation**

Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium 1/200 mit einer frischen XL1blue-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,4 bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Sorvall) sedimentiert und zweimal in 100 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4°C, Sorvall), der Überstand verworfen und die Zellen in 2 ml eiskaltem Wasser, das 10% (v/v) Glycerin enthielt, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu je 120 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 60 µl mit 2 µl Plasmidlösung (1-5 ng Plasmid) bzw. 2 µl dialysiertem Ligationsansatz versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 µl dieses Ansatzes in eine Elektroporations-Küvette (EQUIBIO ECU-102) überführt. Die DNA wird bei einer Spannung von 2,5 kV in die Zellen

transformiert (Elektroporator, EQUIBIO EasyjecT Prima). Zur phänotypischen Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz wurden die Zellen mit 950 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 180 Upm und 37°C in einem Eppendorf-Wärmeblock inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurde auf LBA-Platten (mit 50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von bis zu 10<sup>9</sup> Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

### **2.3.3.2 Transformation von *P. anserina***

Zur Transformation von *P. anserina* wurde ein Verfahren verwendet, bei dem Myzel zerkleinert und dessen Zellwand abgebaut wird. Anschließend wurde die zu transformierende DNA eingebracht (Osiewacz *et al.*, 1991; Ridder und Osiewacz, 1992).

### **Anzucht und Herstellung von Sphäroplasten**

Der zu transformierende *P. anserina*-Stamm wurde 2-5 Tage auf 5 Platten BMM angezogen. Waren die Platten überwachsen, wurde das Myzel je einer Platte abgezogen und in einen Kolben mit 200 ml CM überführt. Nach 2-4 Tagen Wachstum wurde das Myzel vereinigt und mit TPS gespult.

Anschließend wurde das Myzel ausgedrückt, 20 g wurden entnommen und mit dem vierfachen Volumen Glucanex-Lösung (20 g/l TPS) gemischt. Das Gemisch wurde dann in einem Mixer (Waring, USA) homogenisiert (2 mal 5 Sek. Stufe „low“, 2 mal 5 Sek. Stufe „high“) und anschließend zwei Stunden bei 35°C und leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert.

Die resultierende Sphäroplasten-Suspension wurde durch 2 Lagen Verbandmull und dreimal durch Glasrichter mit Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde 10 Min. bei 3500 g, RT (Heraeus Varifuge 3.0) zentrifugiert. Das Sphäroplasten-Sediment wurden in 1 ml TPS resuspendiert und 10 Min. bei 3500 g und RT (Heraeus Biofuge fresco) zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde weitere zwei mal wiederholt. Anschließend werden die Sphäroplasten in 1 ml TPS aufgenommen und ihre Konzentration mit der Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration lag in der Regel zwischen 0,5-4,5 \* 10<sup>8</sup> Sphäroplasten pro ml. Pro Transformationsansatz wurden in der Regel 10<sup>8</sup> Sphäroplasten eingesetzt, die entsprechende Menge an Sphäroplasten wurde aliquotiert, abzentrifugiert (10 Min, 3500 g, RT, Biofuge), in 200 µl STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt.

## **Transformation**

Alle im folgenden beschriebenen Schritte erfolgen auf Eis. Jedem Transformationsansatz wurden 10 µg in 40 µl Wasser gelöste DNA zugegeben (Negativkontrolle: 40 µl Wasser, Positivkontrolle: Plasmide dessen Resistenz-vermittelnde Eigenschaft bekannt ist). Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden 50 µl frische, eisgekühlte PEG-Lösung zugegeben, vorsichtig gemischt und weitere 20 Min. auf Eis inkubiert. Weitere 2 ml PEG-Lösung wurden abwechselnd in Aliquots von 500 µl zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Ansätze 10 Min. bei RT inkubiert. Abschließend wurden zu jedem Transformationsansatz 4 ml STC-Puffer zugegeben, vorsichtig gemischt und Aliquots von 400 µl mit 4 ml flüssigem Regenerationsmedium (im Wasserbad auf 50°C temperiert) versetzt auf Petri-Schalen mit Regenerationsmedium ausplattiert.

## **Selektion**

Zur Bestimmung der Regenerationsrate wurde ein Teil der nicht transformierten Sphäroplasten in Verdünnungen zwischen  $10^{-1}$  und  $10^{-6}$  auf Regenerations-Medium ohne Antibiotikum und Wasser-Medium verteilt.

Die Regenerationsrate ist die Anzahl regenerierter Sphäroplasten pro Gesamtzahl aller produzierten Sphäroplasten. Zur Berechnung der Regenerationsrate wird von der Anzahl der auf Platten mit Regenerations-Medium gewachsenen Kolonien (dabei handelt es sich sowohl um regenerierte Sphäroplasten als auch um nicht-sphäroplastierte Myzel-Stückchen) die Anzahl der auf Platten mit Wasser-Medium gewachsenen Kolonien (die ausschließlich auf nicht-sphäroplastierte Myzelstückchen zurückgehen) abgezogen. Dabei ist der Verdünnungs-Faktor der Regenerations-Platten bzw. Wasser-Platten zu berücksichtigen.

Zur Selektion transformierter Sphäroplasten wurde dem Regenerations-Medium, in Abhängigkeit von transformierten Resistenz-Kassetten, Bleocin (10 µg/ml) bzw. Hygromycin B (100 µg/ml) zugegeben. Diese Platten wurden zur Bestimmung der Transformationsrate genutzt, die im Bereich von etwa 10 Transformanten pro µg transformierter DNA liegt (Ridder und Osiewacz, 1992).

Die Transformationsrate ist die Anzahl transformierter Sphäroplasten bezogen auf 1 µg transformierte DNA. Zur Berechnung der Transformationsrate wird die Anzahl der Kolonien aller Platten auf die der Transformationsansatz verteilt wurde, addiert, diese Summe wird anschließend durch die transformierte DNA-Menge (in µg) dividiert. Der Quotient entspricht der Transformationsrate.

Zur Positivkontrolle wurden die Plasmide pAN7-1 (vermittelt Hygromycin B-Resistenz) bzw. pUT703 (vermittelt Bleocin-Resistenz) transformiert.

Die Platten wurden zwischen 4 (Regenerations-Kontrolle, Wasser-Kontrolle) und 12 Tagen (Transformations-Platten, Positiv-Kontrolle) bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Anschließend konnten die Transformationsrate und die Regenerationsrate ermittelt werden. Transformanten wurden zur weiteren Kultivierung auf BMM überimpft.

### 2.3.3.3 Transformation von *S. cerevisiae*

#### LiAcetat-Transformation von *S. cerevisiae* (Gietz und Woods, 1994)

Um *S. cerevisiae* zu transformieren wurde die Fähigkeit von Lithium-Ionen genutzt, Zellen Transformationskompetenz zu verleihen. Bei dieser Methode fungiert Lithium-Acetat als Lithium-Ionen-Donator. Die im folgenden angegebenen Mengen und Volumina sind für einen Transformationsansatz angegeben. Bei mehreren Ansätzen sind die Volumina mit der Anzahl der Ansätze zu multiplizieren.

Ein frisch ausgestrichener Hefe-Stamm wurde in 10 ml YPAD angeimpft und 24-36 Stunden bei 30°C im Schüttler (180 Upm) inkubiert. Ein Teil dieser Vorkultur wurde nun in 50 ml YPAD angeimpft, so daß die OD<sub>600</sub> etwas 0,2 betrug (Hauptkultur). Nun folgte ein weiterer Inkubationsschritt bei 30°C (Schüttler, 180 Upm). Nachdem die Hauptkultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht hatte wurde sie 10 Min. bei 5000 Upm abzentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, GSA-Rotor). Das Sediment wurde in 10 ml H<sub>2</sub>O p.a. resuspendiert und der obige Zentrifugationsschritt wurde wiederholt. Das resultierende Sediment wurde in 5 ml LiSORB aufgenommen, 30 Min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert und 10 Min. bei 4000 Upm zentrifugiert (Eppendorf 5403). Das Sediment wurde nun in 50 µl LiSORB resuspendiert und anschließend mit 50 µl ST-Lösung (25 µl ST-DNA 10 Min. aufgekocht, 5 Min. auf Eis inkubiert, 25 µl LiSORB zugegeben) gemischt. Nach dem Ansetzen eines Gemisches von 50% (w/v) PEG / 10x TE / 10x LiAc (8:1:1) wurden 900 µl zum Transformationsansatz zugegeben.

An dieser Stelle wurde die zu transformierende DNA (Plasmide: 10 ng/µl) in ein Falcon-Röhrchen (5490) vorgelegt, anschließend wurde 1 ml Zellsuspension zugemischt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 30°C (Wasserbad) erfolgte ein Hitzeschock (8 Min., 42 °C, Techne Heizblock) und nach 8-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein zweiter, identischer Hitzeschock. Dann wurden 10 ml SD-Medium zugegeben. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation von 10 Min. bei 4000 Upm (Eppendorf 5403) wurde das Sediment in 1 ml SD-Medium resuspendiert. Aliquots zwischen 50 µl und 200 µl wurden auf Platten mit SD-Festmedium verteilt. Die Platten werden 4 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert.

## 2.3.4 Kreuzung und Tetradenanalyse

### Kreuzung zweier Stämme auf Platten

Zwei homokaryotische Stämme unterschiedlichen Paarungstyps („plus“ bzw. „minus“) wurden auf Platten gekreuzt, indem Myzelstücke (2-4 mm) beider Stämme gegenüberliegend (1-2 cm Abstand) auf eine Petri-Schale mit BMM überimpft wurden.

Nachdem eine entsprechend beimpfte Platte ca. 2-3 Wochen bei 27°C und Dauerlicht inkubiert wurde, erfolgte die Sexualreaktion und die Bildung von Fruchtkörpern. Aus reifen, dunklen Perithezien wurden Asci isoliert. Komplette Asci enthalten in der Regel vier dikaryotische Sporen. In seltenen Fällen kann ein Ascus jedoch bis zu acht Sporen enthalten, dabei ersetzen jeweils zwei monokaryotische Sporen je eine dikaryotische Spore. In der Regel sind jedoch nur monokaryotische Sporen von Interesse, da normalerweise mit homokaryotischen Stämmen gearbeitet wird, die aufgrund ihrer homogenischen Inkompatibilität keine Selbstbefruchtung zeigen (Esser, 1974).

Sporen wurden unter Zuhilfenahme eines Präparations-Mikroskops (Heerbrugg WILD M3Z) mit 50-facher Vergrößerung und einer sterilen Präpariernadel isoliert. Einzelne Sporen wurden auf Keimungs-Medium (BMM mit 60 mM Ammonium-Acetat) übertragen und zwei Tage bei 27°C unter Lichtabschluss inkubiert. Anschließend wurden Stücke des aus der Spore gewachsenen Myzels auf BMM überimpft und dort weiter kultiviert. In Abhängigkeit von nachfolgenden Experimenten (Molekularbiologische Untersuchungen bzw. Bestimmung der Lebensspanne) wurde das zu überimpfende Myzelstück entweder aus der Mitte bzw. von der Wachstumsgrenze entnommen.

Bei der Kreuzung von PaCox17::ble-Stämmen zeigte sich, daß Ascosporen, welche die PaCox17::ble-Mutation tragen, generell sehr schlecht keimten. Bei der Mehrzahl der untersuchten Kolonien stellten die wenigen, aus der Spore auswachsenden Hyphen ihr Wachstum nach etwa 1-5 mm ein. Wurden derartige Kolonien auf BMM ohne Acetat transferiert, nahmen sie ihr Wachstum wieder auf.

### Tetradenanalyse

Zur Tetradenanalyse wurde der zu untersuchende, homokaryotische Stamm gegen den ebenfalls homokaryotischen Wildstamm  $s$  des anderen Paarungstyps gekreuzt. Aus Perithezien dieser Kreuzung wurden vollständige Asci mit 5-8 Sporen isoliert. Alle Sporen wurden ihrer Reihenfolge entsprechend auf Ammoniumacetat-Medium gesetzt, gekeimt und mit den Wildstämmen  $s^+$  und  $s^-$  gekreuzt. Auf diese Weise konnten die Paarungstyp-Allele aller aus den Sporen gekeimten Myzelien bestimmt werden. Phänotypische und

molekularbiologische Untersuchungen erlauben es die Postreduktionsfrequenz interessierender Merkmale zu ermitteln.

Die Ascosporen von *P. anserina* sind normalerweise heterokaryotisch, d.h. sie enthalten zwei Nicht-Schwester-Kerne. Wenn ein Merkmal in der ersten Teilung segregiert, tragen beide Kerne einer Ascospore das selbe Merkmal (Asci sind präreduziert; Segregation nach erster Teilung). Im Falle eines „Crossing-Overs“ tragen die beiden Kerne einer Ascospore unterschiedliche Allele (Asci sind postreduziert; Segregation nach zweiter Teilung). Die Postreduktionsfrequenz errechnet sich aus dem Quotienten postreduzierter Asci und der Gesamtzahl der untersuchten Asci. Dieser Quotient wird mit 100% multipliziert. Dividiert man die Postreduktionsfrequenz durch zwei erhält man die Rekombinationsfrequenz (cM) des untersuchten Merkmals.

### 2.3.5 Bestimmung der Lebensspanne

Zur Bestimmung der Lebensspanne eines Stammes wurde exakt 2 bzw. 3 Tage nachdem eine Spore auf Amoniumacetat-Medium abgesetzt wurde, ein Stückchen des resultierenden Myzels von der Wachstumsgrenze abgeimpft und in ein Rennrohr mit BMM übertragen.

Ein Rennrohr ist ein Glasrohr von etwa 45 cm Länge (2 cm Durchmesser; 1,7 cm Innen-Durchmesser), an dessen beiden Enden kurze Stützen (ca. 7 cm Länge) im 60°-Winkel nach oben zeigen. Bei waagrechter Arretierung wird das Rohr zur Hälfte mit Medium (normalerweise 50-60 ml BMM) befüllt. Auf der Oberfläche des Mediums kann nun ein *P. anserina*-Isolat vom einen zum andren Ende des Rohren wachsen. Wildstämme sterben meist bevor sie die 45 cm überwunden haben.

Die Wachstumsgrenze des nun auswachsenden Myzels wird jeden Tag durch einen dünnen Strich markiert. Sobald das Myzel des untersuchten Stammes bis auf ca. 1,5 cm an das andere Ende des Rennrohren herangewachsen war, wurde wiederum von der Wachstumsgrenze, ein Myzelstück auf eine neues Rennrohr überimpft. Der Seneszenzpunkt wurde erreicht, sobald sich das Myzel in seiner Pigmentierung veränderte (zumeist waren dunkle Verfärbungen bzw. ein Verlust der Pigmentierung zu erkennen) und das Wachstum eingestellt wurde (Rizet, 1953b).

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

Standardtechniken, wie z. B. Aufreinigung, Fällung, Restriktion, Ligation und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungs-Techniken sind ausführlich beschrieben (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht  $OD_{260} = 1$  einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw. 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$ . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem GeneQuant II UV-Spektralphotometer (Pharmacia).

## **2.4.1 Isolation von Nukleinsäuren**

### **Isolation plasmidaler DNA aus *E. coli* („STET“-Mini-Präparation)**

Die STET-Methode eignet sich zur schnellen Isolation geringer Plasmid-Mengen, die beispielsweise in Restriktionsanalysen eingesetzt werden können. Um DNA in Sequenzier-Qualität zu erhalten sind andere Methoden (z.B. DNA-Midi-Präparation) anzuwenden.

Die Isolierung erfolgte durch "Lyse durch Kochen" nach Sambrook *et al.* (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (13.000 Upm, 1 Min., RT, Heraeus Biofuge fresco). Das Zell-Sediment wurde in 350 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 25 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 50 sec bei 95°C in einem Eppendorf-Rotationsschüttler inkubiert. Die lysierten Zellen und die denaturierte genomische DNA wurden 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert (Heraeus Biofuge fresco) und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 33 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,8 und 420 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge fresco). Die sedimentierte DNA wurde mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 80 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemäßig, aus 1,5 ml Übernachtskultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

### **Isolation von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli* („Midi“-Präparation).**

Zur Isolation von Plasmiden bzw. Cosmiden in hoher Qualität und Quantität aus *E. coli* wurde der "Qiagen-Midi/Maxi-Präp"-Kit benutzt. 150 ml einer Übernachtskultur wurden laut Anleitung des Protokolls des "Qiagen-Midi/Maxi-Präp"-Kits aufgearbeitet. Die erhaltene DNA wurde einer zusätzlichen Ethanol-Fällung unterzogen und erreichte damit Sequenzierungs-Qualität.

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

Zur Isolation von Gesamt-DNA (genomisch und mitochondrial) aus *P. anserina* wurde die Methode von Lecellier and Silar (1994) leicht modifiziert. Für jeden aufzuarbeitenden Stamm wurde ein kreisförmiges Stück steriler Cellophanfolie auf die Oberfläche des Mediums einer BMM Platte platziert. Auf die Cellophanfolie wurden etwa 30 Myzelstückchen angeimpft. Die Platten wurden anschließend inkubiert, bis das Myzel die Oberfläche der Cellophanfolie komplett überwachsen hatte (2-4 Tage). Das Myzel je einer halben Petrischale wurde in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl PaTENS Puffer versetzt. Zur Freisetzung der DNA wurde die Suspension dreimal 30 s geschüttelt (Scientific Industries



Vortex Genie 2), 1 Min. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und 5 Min. bei 70°C erhitzt (Eppendorf Thermomixer 5436). Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm (Heraeus Biofuge fresco) wurde der Überstand abgenommen, mit 1 Volumen Phenol versetzt und gründlich gemischt (Vortex) um Proteine aus der wässrigen Phase zu entfernen. Anschließend wurde eine weitere Zentrifugation von 5 Min. bei 6000 Upm (Biofuge) durchgeführt. Zum Entfernen von Phenolrückständen (diese würden jegliche nachfolgende enzymatische Reaktion stören) wurde die wässrige Phase mit 1 Volumen eines (25:24:1) Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Gemisches gemischt (Vortex) und wie zuvor zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit 1 Volumen Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Die wässrige Phase (enthält DNA) wurde abgenommen.

Zur Fällung der DNA wurden 0,1 Volumen 3 M NaAcetat (pH = 4,8) und 0,7 Volumen Isopropanol p.a. zugegeben. Das Gemisch wurde bei RT 5 Min. inkubiert und 5 Min. bei 13.000 Upm (Biofuge) zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA in ein adäquates Volumen TE aufgenommen (üblicherweise 100 µl) und erneut gefällt (0,05 Volumen 5 M NaCl; 2 Volumen Ethanol p.a.). Nach einer erneuten Zentrifugation (5 Min., 13000 Upm, Biofuge) wurde das Sediment (DNA) mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen, 12 Min. bei RT getrocknet und in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Fällung und Zentrifugation bei RT diente der Anreicherung langer DNA Fragmente größer 30 kBp.

### **Isolation von RNA aus *P. anserina*.**

Die Isolation von RNA erfolgte nach Borghouts *et al.* (2001). Zum Schutz vor RNAsen wurde steril gearbeitet, Geräte und Lösungen wurden zweifach autoklaviert. Wasser wurde mit DMPC behandelt.

Pro Stamm wurden zwei BMM-Platten mit Myzel-Stückchen beimpft und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert bis Myzel das gesamte Medium bedeckte. Das Myzel zweier Platten wurde mit einem Spatel abgekratzt und in 200 ml CM-Flüssigmedium überführt (junge und mittelalte Stämme). Dort wurde es zwei Tage geschüttelt (144 Upm, 27°C, Dauerlicht). Seneszenten Myzel wurde stattdessen in lediglich 150 ml CM-Flüssigmedium in Fernbachkolben aufgenommen und 2-4 Tage inkubiert. Das Myzel wurde über zwei Lagen Mull filtriert, 5-9 g Myzel wurden anschließend in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das pulverisierte Myzel wurde mit 15 ml GTC-Puffer (60°C) gemischt und das Gemisch wurde in ein SS34-Röhrchen überführt, das 208 µl β-Mercaptoethanol enthielt. Nach gründlichem Mischen wurde 10 Min. bei 60°C inkubiert (Lyse der Zellen). Nach 10 Min. Zentrifugation bei 10.000 Upm (Sorvall SS34 Rotor, RT) wurde der Überstand abgenommen und auf 3 ml

CsCl-Lösung (TH-641-Röhrchen) geschichtet. Anschließend erfolgte eine 18-stündige Ultrazentrifugation bei 34000 Upm und 20°C (Sorvall Ultra Pro 80, TH-641-Rotor). Der Überstand wurde verworfen, das durchsichtige RNA-Sediment wurde dreimal mit je 400 ml 70% Ethanol/DMPC-H<sub>2</sub>O gespült. Das Sediment (RNA) wurde dann 15 Min. bei 60°C in 500 ml DMPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die gelöste RNA wurde zuletzt mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat / DMPC-H<sub>2</sub>O (pH = 5,0) und 2 Volumen Ethanol p.a. versetzt und 1 Stunde bei -80°C gefällt. Nach 15 Min. Zentrifugation mit 15000 Upm bei 0°C wird das Sediment mit 300 ml 70% Ethanol / DMPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut wie zuvor zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde getrocknet und 1 Stunde bei 65°C in 100 µl DMPC-H<sub>2</sub>O gelöst. RNA wird bei -80°C gelagert.

## **2.4.2 Handhabung von Nukleinsäuren**

### **Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA**

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus wässrigen DNA-Lösungen (z.B. DNA-Mini-Präparation) durch Extraktion mit Phenol entfernt. Die Probe wurde mit dem gleichem Volumen 50:50 (v/v) Phenol/Chloroform kräftig gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (13.000 Upm, 5 min, Heraeus Biofuge fresco), die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die gereinigten Nukleinsäuren wurden anschließend mit Ethanol präzipitiert.

### **Fällung von DNA**

Die Reinigung und Konzentrierung von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte durch Fällung. Hierzu wurde die Probe mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH = 5,3) und dem 2,5 Volumen Ethanol p.a. gemischt und 5 Min. auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde durch 10- bis 20-minütiges Zentrifugieren (13.000 Upm, RT, Heraeus Biofuge fresco) gefällt. Das Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter kurzer Zentrifugation wurde das Sediment bei RT getrocknet und in einem adäquaten Volumen H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer gelöst.

## **2.4.3 *In vitro*-Modifikation von DNA**

### **Restriktion von DNA**

Zur Spaltung von doppelsträngiger DNA wurden Typ II-Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperatur-Bedingungen eingesetzt. Ein typischer analytischer Ansatz enthielt:

0,3-0,9 µg DNA  
10 µg Albumin (falls empfohlen)  
1-2 U Restriktionsenzym  
in 20 µl Restriktionspuffer

Nach Inkubation für 1-3 h bei 37°C (bzw. der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur) wurden dem Ansatz 1/8 Volumen Auftragspuffer zugesetzt und die Reaktionsprodukte auf Agarosegelen analysiert.

### **Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente**

5'-terminale Phosphatgruppen können mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) abgespalten werden. Da DNA-Stränge ohne 5'-terminale Phosphatgruppen nicht religieren können, kann so die Religation von linearisierter Plasmid-DNA verhindert werden. Ein typischer Reaktionsansatz enthielt zwischen 0,3 und 1,8 µg DNA. Der hier gezeigte Ansatz wurde entsprechend der eingesetzten DNA Menge angepasst, so daß pro 1 µg DNA genau 1 U alkalische Phosphatase zugegeben wurde:

1 µg Plasmid-DNA (linearisiert)  
1 U Alkalische Phosphatase (CIP)  
in 100 µl Alkalische Phosphatase-Puffer

Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde eine Extraktion mit 100 µl Phenol/Chloroform durchgeführt. Die wässrige Phase wurde gefällt, die DNA in ein adäquates Volumen H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **Ligation von DNA-Fragmenten**

Doppelsträngige DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der T4 DNA-Ligase kovalent verbunden. Das zu klonierende Fragment wurde in der Regel in zwei- bis fünffach molarem Überschuß gegenüber dem dephosphorylierten, linearisierten Plasmid-Rückgrat eingesetzt.

Zur Ligation wurde der „Ready-To-Go“ Kit der Firma Amersham Biosciences benutzt, der auf der T4 DNA Ligase basiert. Es wurde das Protokoll des Herstellers verwendet.

### **Auffüllen überhängender DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I**

Zum Auffüllen 5'-überhängende Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurden 0,1 - 4 µg DNA in 50 µl Klenow-Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; je 12,5 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit 1 U Enzym 30 min bei 37°C inkubiert (Telford *et al.*, 1979). Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 65°C denaturiert. Die Reinigung der DNA erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung (siehe 2.4.2).

## 2.4.4 Markierung von DNA

### Radioaktive Markierung einer DNA-Hybridisierungssonde

Die Herstellung von Hybridisierungssonden mit hoher spezifischer Aktivität erfolgte durch „Primer Extension“ nach Feinberg und Vogelstein (1984).

Unter der spezifischen Aktivität einer Probe versteht man die Summe aller messbaren radioaktiven Emissionen bezogen auf ihr Gewicht oder ihr Volumen.

Etwa 0,5 µg der zu markierenden DNA wurde in H<sub>2</sub>O p.a. gelöst, 10 Min. in kochendem Wasser inkubiert und 5 Min. auf Eis gestellt. Ein typischer Markierungsansatz enthielt in einem Volumen von 50 µl:

0,5 µg DNA  
12,5 µg OPL-I (Hexanukleotidgemisch)  
375 µM OPL-II-C (Nukleotidgemisch ohne dCTP)  
1x Klenow-Puffer (MBI Fermentas)  
12,5 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (Amersham)  
2,0 U Klenow-DNA-Polymerase (MBI Fermentas)

Dieser Ansatz wurde gemischt und 1 Stunde bei 37°C im Heizblock (Techne) inkubiert. Anschließend wurden nicht eingebaute Nukleotide durch Ausschlußchromatographie abgetrennt. Dies geschah mittels „ProbeQuant G-50“-Säulchen (Amersham) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die spezifische Aktivität der Sonden lag zwischen  $2 \cdot 10^7$  d.p.m./µg DNA.

### Nicht-radioaktive Markierung einer DNA-Hybridisierungssonde

Neben der radioaktiven Markierung von DNA kam auch das nicht-radioaktive DIG-dUTP-Verfahren zur Anwendung. In DIG-dUTP ist DIG (Digoxigenin, ein Steroidhapten) an Uridin gebunden. DIG-dUTP wird während der DNA-Synthese an Stelle von dUTP eingebaut und kann später detektiert werden. Die Herstellung von DIG-markierten Hybridisierungssonden erfolgte durch „Primer Extension“ nach Feinberg und Vogelstein (1984).

Etwa 0,5 µg zu markierende DNA wurde in H<sub>2</sub>O p.a. gelöst, 10 Min. in Wasser gekocht, 5 Min. auf Eis gestellt und mit dem „DIG-DNA Labelling and Detection Kit“ (Böhringer) markiert. Ein typischer Markierungsansatz enthielt in 20 µl:

0,5 µg DNA  
1x Hexanukleotidgemisch (Böhringer)  
0,1 mM dNTP-Markierungsgemisch (Böhringer)  
2,0 U Klenow-DNA-Polymerase (MBI Fermentas)

Der Ansatz wurde 20 Stunden bei 37°C im Heizblock (Techne) inkubiert, anschließend wurde die Markierungsreaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH = 8,0) gestoppt und die markierte DNA nach Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl Ethanol p.a. für 30 Min. bei –

80°C gefällt. Das Gemisch wurde 20 Min. bei 15.000 Upm und 4°C zentrifugiert (Eppendorf 5403). Das Sediment (markierte DNA) wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 10 Min. bei RT getrocknet und in 50 µl TE aufgenommen.

Die Konzentration markierter DNA kann durch Vergleich mit markierter Kontroll-DNA bestimmt werden. Es wurde den Anweisungen des „DIG-DNA Labelling and Detection Kits“ (Böhringer) gefolgt.

## **2.4.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren**

### **Nicht-denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). In der Regel wurden Gele mit 1% (w/v) Agarose benutzt. Hierfür wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE- bzw. 1 x TBE-Puffer durch aufkochen gelöst und nach Abkühlung auf ca. 60°C in einen Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde mit dem Gelträger in die Elektrophorese-Kammer (mit 1 x TAE- bzw. 1 x TBE-Puffer gefüllt) gesetzt. Die Proben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 8:1 mit nativem Auftragspuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Spannung (6-12 V/cm). Nach der Elektrophorese wurde das Gel entnommen und im Ethidiumbromid-Bad (0,5 µg/ml) für 20 Minuten gefärbt. Die DNA-Banden wurden im UV-Durchlicht (254 nm) mit dem Transilluminator M40 (TFM, Cybertech CSI) detektiert, auf Thermalpapier photographisch dokumentiert (Mitsubishi „Video Copy Processor“) und als TIFF-Datei auf Diskette gesichert (Cybertech CCD-Videodensitometer). Digital gespeicherte Abbilder von Gelen dienen der Quantifizierung von DNA (siehe 2.8.1).

### **Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für die Isolierung von definierten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (beispielsweise zur Herstellung von Sonden oder zur Anreicherung eines zu klonierenden Fragments) wurde der „Nucleospin 2 in 1 Extract“-Kit (Macherey und Nagel) verwendet. Das Prinzip besteht darin, die DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikatmatrix zu binden, Verunreinigungen abzuwaschen und sie schließlich unter Niedrigsalzbedingungen von dieser Matrix zu eluieren. Die Isolierung wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Mit dieser Methode konnten DNA-Fragmente einer Länge von 200 Bp bis 9 kBp aus Agarosegelen zu etwa 70-90% isoliert werden.

### **Denaturierende Formamid/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA**

Da RNA-Fragmente, insbesondere solche mit hohem Molekulargewicht, partiell Sekundärstrukturen ausbilden, die das Laufverhalten im Agarosegel beeinflussen können, muß eine Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen erfolgen.

Die RNA-Probe (üblicherweise 10 µg RNA in 7 µl wässriger Lösung) wurde mit 1 µl 10 x MOPS-Puffer mit 3,5 µl Formaldehyd und 10 µl Formamid (deionisiert) für 10 Min. bei 65°C denaturiert, 5 Min. auf Eis gekühlt und anschließend mit 2,5 µl denaturierendem RNA-Ladepuffer gemischt. Pro Gel wurden 0,75 g Agarose in 40 ml H<sub>2</sub>O aufgeköcht und auf etwa 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von 5,55 ml 10 x MOPS-Puffer und 10 ml 37% Formaldehyd wurde die Lösung gut gemischt und in Gelträger gegossen. Das erstarrte Gel wurde in der Elektrophorese-Kammer mit 1 x MOPS-Puffer überschichtet. Die aufgetragenen Proben wurden bei 60 Volt (6 V/cm) 2,5 h aufgetrennt. Die 18S- und 28S-rRNA-Banden konnten im UV-Durchlicht (254 nm) mit dem Transilluminator M40 (TFM) detektiert, auf Thermalpapier gedruckt (Mitsubishi VCP) und digital gespeichert (Cybertech CCD) werden.

Für analytische Zwecke wurde RNA auf je einem Gel aufgetrennt und gefärbt. Für Northern-Analysen wurden zwei identische Gele angefertigt, davon wurde eines gefärbt, das andere wurde für „Blot“ und Hybridisierungen eingesetzt.

### **2.4.6 Nukleinsäurehybridisierung**

Zur Hybridisierung von DNA (bzw. RNA) mit einer DNA-Sonde ist die zu analysierende Probe zuerst (wie unter Punkt 2.4.5 beschrieben) auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufzutrennen. Anschließend werden die entsprechend ihrer Größe verteilten Fragmente aus dem Gel auf eine Nylon-Membran transferiert.

#### **Transfer von DNA auf Nylonmembranen (Southern-Blot)**

Um DNA aus einem Agarose-Gel auf eine Membran zu transferieren wird der Transfer nach Southern (1975) angewandt, der sogenannte „Southern-Blot“. Zum Transfer der Nukleinsäuren wurde die Vakuum-Transfer-Technik benutzt. Dabei wurde das Gel auf die Nylon-Membran gelegt und Luft-dicht in die Transfer-Apparatur (Pharmacia) eingesetzt. Unterhalb der Membran wurde ein Unterdruck von konstant 50 mBar erzeugt. So konnten Lösungen, mit denen das Gel überschichtet wurde, durch das Gel und die Nylon-Membran gesaugt werden. Zuerst wurde das Gel für 20 Min. mit 0,25 M HCl bedeckt, um die DNA zu depurinieren und größere Fragmente in kleinere zu spalten. Dieser Schritt erleichtert den Transfer der DNA. Anschließend wurde das Gel 20 Min. mit Denaturierungs-Lösung bedeckt,

um doppelsträngige in einzelsträngige Fragmente zu teilen. Dieser Schritt erleichtert später die Anlagerung der Sonde. Zum Ausgleich des pH-Wertes wurde das Gel 20 Min. mit Neutralisierungs-Lösung bedeckt. Dies erlaubt die Bindung der DNA an die Nylon-Membran. Durch Überschichten des Gels mit 20x SSC für 1-2 Stunden wurde die DNA auf die Nylon-Membran transferiert. Die Nylon-Membran wurde in 2x SSC gewaschen, die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (254 nm; 120 mJ) im Stratalinker (Stratagene) auf der Membran fixiert.

### **Transfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern-Blot)**

Der Transfer von RNA auf Nylon-Membranen erfolgte, wie der Transfer von DNA, durch eine Vakuum-Transfer-Apparatur (Pharmacia). RNA-Gele wurden bei 50 mBar Unterdruck für 3 Stunden mit 20x SSC überschichtet. Nylon-Membranen, auf die RNA transferiert wurde, lagerten bei +4°C im Kühlschrank.

### **Spezifischer radioaktiver Nachweis von an Membranen gebundener DNA bzw. RNA**

Zum Nachweis definierter DNA- bzw. RNA-Sequenzen wurden radioaktive DNA-Sonden (siehe 2.4.4) genutzt. Nylon-Membranen (bzw. Membranen der Cosmid-Bank) mit darauf fixierten Nukleinsäure-Molekülen wurden zuerst 3 Stunden bei 37°C in Prähybridisierungs-Lösung inkubiert. Anschließend wurden 300-900 ng radioaktiv markierter und Hitze-denaturierter Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C (stringent) oder bei 24°C (nicht stringent). Anschließend wurden die nicht hybridisierenden Sonden-Fragmente abgewaschen. Dabei wurde die Membran je zweimal 10 Min. mit 2x SSC; 0,5% SDS (RT) und mit 0,1 SSC; 0,1% SDS (37°C) gewaschen (stringent). Bei nicht stringenter Hybridisierung wurde lediglich zweimal 1 Minute mit 2x SSC; 0,5% SDS (RT) gewaschen. Zur Anfertigung einer Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm auf die getrocknete Membran gelegt, über den Film wurde eine Verstärker-Folie gelegt. In Abhängigkeit von der Radioaktivität wurde die Membran zwischen einer Stunde und 14 Tagen bei -80°C exponiert. Bei der Hybridisierung von RNA wurden ausschließlich Lösungen benutzt, die mit DMPC behandelt wurden.

### **Spezifischer nicht-radioaktiver Nachweis von an Membranen gebundener DNA**

Um definierte DNA-Sequenzen nachzuweisen wurden neben radioaktiv-markierten Sonden auch DIG-markierte Sonden (siehe 2.4.4) genutzt. Membranen – auf denen zu untersuchende DNA-Proben fixiert waren – wurden zuerst 5 Min. mit 10 ml DIG-Waschpuffer bei RT

gewaschen und 3 Stunden in 10 ml DIG-Hybridisierungs-Puffer bei 68°C prähybridisiert. Anschließend wurden 10-20 ng/ml Hitze-denaturierte DIG-Sonde zugegeben, die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Membran wurde je zweimal bei 68°C gewaschen: 5 Min. 2x SSC; 0,5% SDS und 10-20 Min. 0,1x SSC; 0,1% SDS. Wurden nicht stringente Bedingungen gewählt, erfolgten Prähybridisierung, Hybridisierung und die Waschschrte bei 50°C. Es wurde lediglich zwei mal eine Minute mit 2x SSC; 0,5% SDS gewaschen.

Um die an homologe Fragmente der Membran hybridisierte DIG-Sonde zu detektieren, wurde die Membran 5 Min. in 60 ml DIG-Waschpuffer äquilibriert, 30 Min. in 60 ml DIG-„Blocking“-Puffer und 30 Min. in 10 ml DIG-„Blocking“-Puffer mit 1 µl Anti-DIG-Antikörper-Konjugat (1:10000) inkubiert. Die Membran wurde dreimal 10 Min. mit 60 ml DIG-Waschpuffer und 5 Min. mit 20 ml DIG-Puffer 3 gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit 0,5 ml DIG-Puffer 3 und 5 µl CSPD-Lösung bedeckt, in Folien eingeschweißt und gut verstrichen. Die alkalische Phosphatase der DIG-Addukte dephosphorylierte nun das CSPD. Die anschließende Oxidation produzierte das Photonen-emittierende Methyl-Meta-Oxybenzoat. Abschließend wurde ein Röntgen-Film zwischen 30 Minuten und 3 Stunden bei RT belichtet.

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine Membran von 100 cm<sup>2</sup> Oberfläche. Zur DIG-Detektion wurde der „DIG-DNA labelling and detection kit“ (Boehringer) verwendet.

#### **2.4.7 Sequenzierung von DNA**

Zur Sequenzierung von DNA nach Sanger *et al.*, (1977) wurden 16-18 Bp lange Oligonukleotide benötigt. Unbekannte Fragmente wurden in pUC18 bzw. pBSSK kloniert und von beiden Seiten mit den auf den Klonierungs-Vektoren lokalisierten Oligonukleotiden „Universal“ und „Reverse“ sequenziert. Sequenzierungen wurden von den Firmen MWG Biotech, Seqlab und Scientific Research & Development GmbH durchgeführt. Der entsprechenden Firma wurde ein Aliquot der zu sequenzierenden DNA und ein entsprechendes Oligonukleotid übergeben. Pro Sequenzierung wurden zwischen 600 und 900 Bp stromabwärts der Bindestelle des Oligonukleotids sequenziert. Zur Kontrolle der Sequenz wurde der zweite Strang ebenfalls sequenziert.



## 2.4.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur selektiven *in vitro* Amplifikation spezifischer DNA Bereiche (Saiki *et al.*, 1985). Für diese Arbeit wurde die Methode nach Innis *et al.* (1990) modifiziert. Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 1-10 ng DNA-Vorlage („Template“), die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$ , dNTPs in einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  (d. h. je 200  $\mu\text{M}$  dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in 1x PCR-Puffer mit 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Um den Verlust von Flüssigkeit zu vermeiden wurde jeder Ansatz mit 60  $\mu\text{l}$  Paraffin überschichtet.

Bei einer Amplifikat-Länge von unter 1 kbp sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus:

2 Min.	94°C	Initiales Aufschmelzen dsDNA	1 x
<hr/>			
1 Min.	94°C	dsDNA aufschmelzen	
1 Min.	50-60°C	Anlagerung der Oligonukleotide	30 x
1 Min.	72°C	Polymerisation neuer DNA-Stränge	
<hr/>			
9 Min.	72°C	Auffüllen synthetisierter Stränge	1 x

Bei der Herstellung längerer Amplifikate mussten die Hybridisierungs-Temperatur bzw. die Elongations-Zeit entsprechend angepasst werden. PCR-Ansätze mit Dynazyme- bzw. Pfu-DNA-Polymerase wurden mit den mitgelieferten Reaktionspuffern durchgeführt. Es wurden die PCR-Geräte T1 Thermocycler (Biometra) und RoboCycler Gradient 40 (Stratagene) verwendet.

## 2.5 Proteinbiochemische Methoden

### 2.5.1 Isolation nativer Proteine aus *P. anserina*

Die Isolation nativer Proteine (verändert nach Brakhage *et al.*, 1992) erlaubte es deren enzymatische Aktivität (z.B. der SOD) zu bestimmen. Zur Isolation nativer Proteine aus *P. anserina* wurden zuerst Myzel-Stückchen auf BMM-Platten für 2-4 Tage inkubiert. Sobald das Myzel die Platte überwachsen hatte wurde es abgezogen und in 200 ml CM überführt, nach weiteren 2-4 Tagen Inkubation erfolgte die eigentliche Protein-Isolation.

Etwa 5 g Myzel einer Probe wurde abfiltriert, ausgedrückt und unter flüssigem Stickstoff zu Mehl zermörsert. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis ausgeführt, das Material lagerte zum Teil bei  $-80^\circ\text{C}$  kurz zwischen. Das Myzel-Pulver wurde anschließend mit 20 ml NPE-Puffer

und den folgenden Proteinase-Inhibitoren gemischt: 40 µl 0,1 M PMSF; 40 µl 1 M DTT; 2 µl Pepstatin A (1 g/l); 2 µl Leupeptin (10 g/l) und 2 µl Aprotinin (10 g/l). Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe 10 Min. bei 13 Kupm im GSA-Rotor (Sorvall-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde über 30 Min. unter rühren mit 13,2 g gemahlenem NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> versetzt, das Gemisch wurde eine weitere Stunde bei 0°C gerührt. Nach einer 50-minütigen Zentrifugation bei 8,5 kUpm im GSA-Rotor (Sorvall) wurde das Sediment in 0,5 ml NPE-Puffer und 50 µl 86% Glycerin gelöst. Dem Gemisch wurden sofort die folgenden Protease-Inhibitoren zugegeben: 2,5 µl 0,1 M PMSF; 2,5 µl 1 M DTT; 1 µl Pepstatin A (1 g/l); 1 µl Leupeptin (10 g/l) und 1 µl Aprotinin (10 g/l). Zuletzt wurde die Probe in 100 µl Aliquots portioniert und bei -80°C eingefroren.

### **2.5.2 Isolation intakter Mitochondrien aus *P. anserina***

Die Isolation intakter Mitochondrien erlaubte es deren enzymatische Aktivität (z.B. Atmungsrate) zu bestimmen. Zur Mitochondrien-Isolation aus *P. anserina* wurden pro Ansatz Myzel-Stückchen auf fünf BMM-Platten verteilt und für 2-4 Tage inkubiert. Sobald das Myzel die Platten überwachsen hatte wurde es abgezogen und 1,5 L CM (Schikanekolben) vereinigt, nach weiteren 3-4 Tagen Inkubation wurde das Myzel filtriert und ausgedrückt.

Die weitere Arbeit erfolgte bei 0°C im Kühlraum oder auf Eis, alle Puffer wurden auf 0°C vorgekühlt. Das Feuchtgewicht des Myzels wurde notiert, die folgenden Angaben beziehen sich auf 20 g Feuchtgewicht. Anschließend wurde das Myzel unter flüssigem Stickstoff gemörsert, in 100 ml AM-Puffer resuspendiert, mit 0,6 g Polyvenylpolypyrrolidon und 0,126 g Cystein gemischt. Das Gemisch wurde eine Stunde gerührt und im GSA-Rotor (Sorvall-Zentrifuge) für 10 Min. bei 3 Kupm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch zwei Lagen Mull filtriert und bei 11 Kupm und 4°C für 30 Min. im GSA-Rotor zentrifugiert (Sorvall). Das Sediment wurde in 10 ml MW-Puffer aufgenommen und im Homogenisator homogenisiert. In ein SS-34 Röhrchen wurden 8 ml 0,6 M Saccharose vorgelegt. Nach der Zugabe von weiteren 10 ml MW-Puffer zum Homogenisat wurde mit dem Gemisch das Saccharose-Kissen überschichtet. Das SS-34 Röhrchen mit Saccharose und Homogenisat wurde für 20 Min. bei 9,5 Kupm im SS-34-Rotor zentrifugiert (Sorvall). Das Sediment wurde in 300-600 µl 0,1 M K<sub>2</sub>P0<sub>4</sub>-Lösung (pH=7,2) aufgenommen, resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

### 2.5.3 Immundetektion von Proteinen

Zum Nachweis spezifischer *P. anserina* Proteine wurde ein Gesamt-Proteinextrakt auf einem Polyacrylamid(PAA)-Gel aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Spezifische Proteine konnten schließlich mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen werden.

#### Polyacrylamid-Gelelektrophorese (“SDS-PAGE”)

Zur Gelelektrophorese zellulärer Protein-Extrakte wurde die Mini-Protean II-Apparatur (BioRad) verwendet. Proteine bis zu einer Masse von etwa 100 kDa wurden in 10%-igen PAA-Gelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Dabei wurde zuerst das Trenn-Gel gegossen, mit 2-Butanol überschichtet (Sauerstoff-Abschluss) und 30 Min. bei RT inkubiert (Polymerisation des Trenn-Gels). Nach dem Abgießen des 2-Butanol wurde das Sammel-Gel auf das Trenn-Gel gegossen und ein Kamm eingesetzt (siehe Tab. 11).

**Tabelle 11: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gele.**

Komponenten	Trenn-Gel	Sammel-Gel
30% 30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	1,74 ml	0,35 ml
4x Trenngel-Puffer	1,25 ml	-----
4x Sammelgel-Puffer	-----	0,54 ml
Wasser p.a.	1,95 ml	1,10 ml
10% APS	20,00 µl	20,00 µl
TEMED	2,00 µl	2,00 µl

Nach einer Stunde Polymerisation bei RT wurde der Kamm aus dem PAA-Gel entfernt, die Gel-Taschen mit 1x TGS-Puffer gespült und das Gel in die Gel-Kammer eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Laemmli-Probenpuffer gemischt, 1 Min. aufgekocht und in die entsprechenden Taschen des PAA-Gels pipettiert. Neben den Proben wurde routinemäßig ein Protein-Längenstandard (BioRad) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt bis zum Auslaufen der Bromphenolblau-Bande (im Laemmli-Probenpuffer enthalten). Nach der Elektrophorese wurde das PAA-Gel 15 Min. in Coomassie-Lösung gefärbt und über Nacht in Coomassie-Entfärber entfärbt. Nach dieser Prozedur waren die aufgetrennten und durch Coomassie gefärbten Proteine deutlich sichtbar (blaue Färbung).

### **Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran**

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem PAA-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch in einer Mini-Transfer-Apparatur (BioRad). Alle Arbeits-Schritte erfolgten bei 0-4°C im Kühlraum.

Zuerst wurden Membran, zwei Schwämme und zwei Whatman-Papiere (identische Fläche) 15 Min. in TGM-Puffer inkubiert. Nach der PAA-Gelelektrophorese der Proteine wurde das Trenn-Gel kurz in TGM-Puffer gewaschen und anschließend (ohne Luftblasen) auf die in TGM-Puffer präinkubierte Nitrozellulose-Membran gelegt. Zu beiden Seiten wurden je ein Whatman-Papier und ein Schwamm addiert, der Stapel wurde dann in die Apparatur eingespannt, diese wurde mit TGM-Puffer gefüllt. Der Apparatur wurde ein Eiskern (auf – 80°C vorgekühlt) und ein Rührfisch addiert. Die Kammer wurde auf einen Magnet-Rührer gestellt. Die Elektrophorese erfolgte bei 0°C für eine Stunde bei 100 Volt. Zur qualitativen Analyse des Transfers wurde die Membran nach dem Transfer kurz mit Ponceau S-Lösung gefärbt und mehrmals in 1x PBS Puffer gewaschen.

### **Nachweis spezifischer Proteine**

Zum Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulose-Membran wurden entsprechende Antikörper genutzt. Der Erst-Antikörper wurde anschließend mit einem Zweit-Antikörper gebunden, der kovalent an eine alkalische Phosphatase gebunden ist. Nach Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates CSPD wurde dieses durch die alkalische Phosphatase gespalten, was zur Emission von Photonen führte. Die Detektion spezifischer Proteine erfolgte also über sichtbares Licht, das einen Röntgenfilm belichtet. Es wurde das „Western-Light chemiluminescent detection system“ von Tropix benutzt, dessen Protokoll exakt befolgt wurde.

Die Nitrozellulose-Membran mit den darauf transferierten Proteinen wurde kurz in 10 ml PBS gewaschen und 1 Stunde in 10 ml P-Block geschwenkt. Der Erst-Antikörper wurde in 10 ml P-Block 100x verdünnt (Endkonzentration etwa 1 µg/ml), auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4°C geschwenkt.

Als Primär-Antikörper wurde im Rahmen dieser Arbeit ein monoklonaler Antikörper der Maus gegen die AOX aus *S. guttatum* eingesetzt (Elthon *et al.*, 1989).

Die Membran wurde dreimal 5 Min. in 10 ml P-Wasch gewaschen (RT) und anschließend 30 Min. mit Zweit-Antikörper (1:5000 verdünnt) in 10 ml P-Block inkubiert. Danach wurde die Membran erneut dreimal 5 Min. mit 10 ml P-Wasch gewaschen und zweimal 2 Min. mit 1x Assay-Puffer (Tropix-Kit) gewaschen. Nach dem entfernen überschüssiger Lösung wurde die Membran mit 475 µl CSPD und 25 µl Nitroblock-Lösung (beide aus dem Tropix-Kit)

überschichtet und in Folie eingeschweißt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde das Substrat entfernt und die Membran auf einen Röntgenfilm gelegt. Der Film wurde bei RT zwischen 1 Minute und 1 Stunde exponiert.

### **Quantifizierung eingesetzter Protein-Mengen**

Um die Signale detektierten Proteine unterschiedlicher Spuren untereinander quantitativ in Beziehung setzen zu können, wurde nach der eigentlichen Protein-Detektion zusätzlich die Untereinheit V der  $\beta$ -ATPase nachgewiesen (Nelson und Schatz, 1979).

Da die  $\beta$ -ATPase Untereinheit V *in vivo* in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist eignet sie sich sowohl zur Quantifizierung von Gesamt-Protein als auch mitochondrialen Protein-Extrakten. Die  $\beta$ -ATPase Untereinheit V hat eine Masse von 47,5 kDa (Nelson und Schatz, 1979).

Nach eine 30-minütigen Inkubation der Nitrozellulose-Membran in P-Block wird sie über Nacht bei 4°C mit dem  $\beta$ -ATPase-Antikörper (Primär-Antikörper, in P-Block gelöst) geschwenkt. Die Membran wurde dann dreimal je 5 Min. mit 10 ml PBS gewaschen und 30 Min. in 10 ml P-Block inkubiert (RT). Anschließend wurde die Membran 1 Stunde mit 10  $\mu$ l PAAP in 10 ml P-Block geschwenkt.

PAAP ist eine Abkürzung für ein Konjugat aus Protein A und die alkalische Phosphatase. Dabei ist Protein A in der Lage den  $\beta$ -ATPase-Antikörper hochaffin zu binden. Die alkalische Phosphatase ist (wie zuvor beschreiben) in der Lage CSPD unter Licht-Emission zu spalten.

Die Membran wurde dann dreimal 5 Min. mit 15 ml PBS und zweimal 2 Min. mit 10 ml Assay-Puffer (Tropix-Kit) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit einer Mischung aus 475  $\mu$ l CSPD und 25  $\mu$ l Nitroblock (beides aus dem Tropix-Kit) bestrichen. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten exponiert.

### **2.5.4 SOD-Aktivitätstest nativer Proteine**

Die SOD-Aktivitäts-Analyse dient dazu die Aktivität der Cu/Zn-SOD (SOD1) und der Mn-SOD (SOD2) qualitativ zu bestimmen. Für diese Analyse eignen sich ausschließlich nativ isolierte Proteine (siehe 2.5.1), die durch Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit NBT gefärbt werden.

#### **Native Protein-Gelelektrophorese**

Zur Gelelektrophorese nativer Proteine wurde die Mini-Protean II-Apparatur (BioRad) verwendet. Dabei wurde zuerst das Trenn-Gel gegossen, mit 2-Butanol überschichtet (Sauerstoff-Abschluss) und 30 Min. bei RT inkubiert (Polymerisation des Trenn-Gels). Nach Abgießen des 2-Butanols wurde das Sammel-Gel auf das Trenn-Gel gegossen und ein Kamm eingesetzt (siehe Tab. 12).

---

**Tabelle 12: Zusammensetzung nativer Polyacrylamid-Gele.**

---

Komponenten	10% Trenn-Gel	Sammel-Gel
30% 30:0,8 Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	3,00 ml	0,85 ml
1,5 M Tris-Puffer; pH= 8,9	2,20 ml	0,85 ml
Wasser p.a.	4,80 ml	3,30 ml
10% APS	50,00 µl	50,00 µl
TEMED	16,70 µl	5,00 µl

---

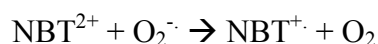
Nach einer Stunde Polymerisation bei RT wurde der Kamm aus dem Gel entfernt, die Gel-Taschen mit nativem Laufpuffer gespült und das Gel in die Gel-Kammer eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x nativem Probenpuffer gemischt und in die entsprechenden Taschen des Gels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt in nativem Laufpuffer bis zum Auslaufen der Bromphenolblau-Bande (im nativen Probenpuffer enthalten).

Zur groben Quantifizierung der aufgetragenen Proteine wurde ein Duplikat des Gels 15 Min. in Coomassie-Lösung gefärbt und über Nacht in Coomassie-Entfärbter entfärbt. Nach dieser Prozedur waren die aufgetrennten und durch Coomassie gefärbten Proteine deutlich sichtbar (blaue Färbung).

### **Bestimmung der SOD-Aktivität**

Die Bestimmung der SOD-Aktivität wurde nach Flohe und Ötting (1984) durchgeführt. Der Methode liegen folgende Reaktionen zu Grunde:

Riboflavin und TEMED produzieren bei Belichtung Superoxid-Anionen. Das gelbliche Kation des Tetrazoliumsalzes  $\text{NBT}^{2+}$  wird durch Licht-induzierte Superoxid-Anionen zu  $\text{NBT}^{\cdot+}$  reduziert:



Das gebildete  $\text{NBT}^{\cdot+}$  ist ein Radikal, es kann in einer Disproportionierungs-Reaktion zu  $\text{NBT}^{2+}$  und NBT reagieren:



Hierbei wird  $\text{NBT}^{2+}$  regeneriert und das dunkelviolette NBT (Formazan) gebildet, das in wässrigen Lösungen unlöslich ist und ausfällt. In Gelbereichen mit SOD-Aktivität werden Superoxid-Anion zu Wasserstoff-Peroxid umgewandelt. Dadurch kommt es zu keiner Blaufärbung durch Formazan-Bildung. Diese Methode erlaubt die direkte, kolorimetrische Bestimmung der SOD-Aktivität.

### **Vorgehensweise:**

Nach der Elektrophorese der zu analysierenden nativen Proteine wurde das Gel in 10 ml Phosphat-Puffer P (pH=7,8) mit 400  $\mu\text{l}$  NBT-Lösung gelegt und für 20 Minuten in Dunkelheit (NBT ist lichtempfindlich) geschwenkt. Anschließend wurde die Lösung abgegossen, das Gel wurde einmal mit Phosphat-Puffer P gespült und in 10 ml Phosphat-Puffer P mit 200  $\mu\text{l}$  Riboflavin-Lösung und 10  $\mu\text{l}$  TEMED gegeben. Nach 20 Min. in Dunkelheit wurde die Lösung abgegossen, das Gel auf einen Leuchttisch gelegt und belichtet bis helle Signale auf dunklem Hintergrund sichtbar wurden. Entsprechende Gele wurden anschließend fotografiert.

## **2.6 Physiologische Methoden**

### **2.6.1 Messung des Sauerstoff-Verbrauchs**

Diese Methode erlaubt es, den Sauerstoff-Verbrauch einer definierten Menge Myzel in definierten Volumen pro Zeit zu messen. Durch die Gabe von Inhibitoren kann die terminale Oxidase (AOX und/oder COX) und damit die Art der Respiration bestimmt werden.

#### **Vorbereitung der Sauerstoff-Elektrode**

Die verwendete Sauerstoff-Elektrode (Rank-Brothers) besteht im wesentlichen aus einer temperierten, verschließbaren Küvette. Zuerst wurden Anode (Silber) und Kathode (Platin) gründlich gereinigt. Auf die Kathode wurde anschließend ein Tropfen gesättigter KCl-Lösung pipettiert. Auf Anode und Kathode wurden dann ein kreisrundes (1 cm Durchmesser) Stück Zigaretten-Papier, ein gleichgroßes Stück Teflon-Folie und ein Dichtring gelegt. Der Dichtring wurde durch den Applikator luftblasenfrei über die Anode gedrückt. Die Küvette wurde dann an ein 27°C Wasserbad mit Umwälzpumpe angeschlossen. In die Küvette kamen ein 1 cm, Rührfisch und 4,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Nach vier Stunden Rühren waren die Elektroden eingependelt und die Apparatur war messbereit. Danach wurde der angeschlossene Schreiber auf 90% Ausschlag eingestellt (Drehknopf Sensitivität). Dementsprechend entsprachen 90% Schreiberausschlag 100% Sauerstoff-Sättigung, dies entspricht bei 27°C einer Sauerstoff-

Konzentration von 0,246 mM (Alan und Holmes, 1986). Nach der Zugabe einer Spatel-Spitze Natrium-Dithionit wurde der in der Küvette enthaltene Sauerstoff reduziert, die Nadel der Schreibers näherte sich rasch dem Nullwert. War dies nicht der Fall, wurde der Nullwert eingestellt. Schließlich wurde die Küvette mehrmals mit Wasser gespült um das Natrium-Dithionit zu entfernen.

### **Anzucht und Vorbereitung der zu untersuchenden *P. anserina*-Stämme**

Der zu analysierende Stamm wurden zuerst auf BMM-Platten (mit definierter Kupfer-Konzentration) angezogen und anschließend in 200 ml CM-Flüssigmedium überführt. Nach einer zweitägigen Inkubation im Schüttler (27°C, 144 Upm) bestand die Kultur aus vielen kleinen Myzel-Kugeln von etwa 0,5 bis 1,0 cm Durchmesser. Pro Messung wurden 0,5 – 1,0 g Myzel-Kugeln (Feuchtgewicht) drei mal in Sauerstoff-Puffer gewaschen (nach Frese und Stahl, 1992).

### **Messung der Sauerstoff-Aufnahme**

Etwa 0,5-1,0 g gewaschenes Myzel wurde in die, mit 4,5 ml Sauerstoff-Puffer gefüllte, Küvette gegeben. Die Küvette wurde sofort mit dem Applikator verschlossen, die Sauerstoff-Aufnahme der Probe wurde für etwa eine Minute gemessen. Anschließend wurde mittels des Applikators ein Respirations-Inhibitor zugegeben: Entweder 50 µl KCN-Lösung oder 500 µl SHAM-Lösung. Nach einer weiteren Mess-Periode (0,5-1,5 Min.) wurde auch der jeweils andere Inhibitor zugegeben. In der darauffolgenden Messung (etwas 1-2 Minuten) sollte der Sauerstoff-Verbrauch normalerweise auf Null zurückgehen.

Zwischen den Messungen wurde die Küvette mehrmals gründlich mit Wasser gespült. Nach erneuter Zugabe von 4,5 ml Sauerstoff-Puffer wurde der Schreiber-Ausschlag auf 90% geprüft.

Am Ende jeder Messung wurde das Myzel aus der Küvette entnommen, abzentrifugiert, an der Luft getrocknet und das Trockengewicht bestimmt. Die Sauerstoff-Aufnahme wurde anschließend mit folgender Formel errechnet:

$$\text{Sauerstoff-Aufnahme [mM/min/g Myzel]} = (S * 0,246 * 1000) / 90 * G * T$$

S: Veränderung der Schreiber-Ausschlags während der gemessenen Zeit in Prozent.

G: Trockenes Myzel-Gewicht in mg

T: Gemessene Zeit in Minuten



## **2.7 Zellbiologische Methoden**

### **2.7.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen der Morphologie von *P.***

#### ***anserina***

Die morphologische Betrachtung von *P. anserina* erfolgte an einem Mikroskop (Leitz LABORLUX S bzw. Heergrugg Wild M3Z). Agar-Platten, Perithezien, Asci und Sporen wurden mit der einer Digitalkamera (Nikon Coolpix) dokumentiert. Zur Dokumentation des Vergrößerungs-Faktors wurde ein Stück Millimeter- bzw. Zentimeter-Papier am Rande des Bildes mit fotografiert. Die digitalen Photographien wurden mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (Ausrichtung, Kontrast-Verstärkung) überarbeitet. Anschließend konnten die Bilder in das Programm Coral Draw 8.0 exportiert und dort beschriftet werden.

## **2.8 *In silico*-Analysen**

### **2.8.1 Quantifizierung von DNA**

Die Konzentrations-Bestimmung der DNA erfolgte videodensitometrisch. Dabei wird zuerst ein definiertes Volumen der zu untersuchenden DNA-Probe in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Ethidium-Bromid (EtBr) angefärbt. Das Gel wird anschließend fotografiert. Bei dieser Methode wird die Intensität der zu untersuchenden DNA-Bande mit DNA-Banden bekannter Konzentration verglichen. EtBr bindet quantitativ an doppelsträngige DNA (dsDNA), dadurch nimmt die Intensität der DNA-Bande innerhalb eines gewissen Bereichs linear zu.

Es ist zu beachten, nicht im Bereich der Sättigung zu Messen, da in diesem Bereich die Intensität nicht mehr linear mit der DNA-Menge zunimmt, sondern einen zu geringen Wert vermuten lässt. Wird mit halb-maximaler Banden-Intensität gearbeitet, weisen die Messwerte die größte Genauigkeit auf.

Als Referenz für die Messungen wurde, neben den zu untersuchenden Proben, DNA des Phagen  $\lambda$  (zuvor mit dem Restriktionsenzym *Hind*III in definierte Fragmente geschnitten) auf dem Agarose-Gel aufgetrennt. Die eigentliche Konzentrations-Bestimmung der DNA-Proben erfolgt über die Auswertung der Photographie des gefärbten Agarose-Gels. Dazu wurde das Programm Wincam (Hitachi) für das PC-Betriebs-System Windows 3 benutzt.

### **2.8.2 Datenbanksuche**

Zur Analyse einer DNA-Sequenz wurden zuerst Teilsequenzen mit Hilfe des Programms „Clone Manager 6“ in 5'-3'-Richtung zusammengesetzt. Die entsprechende DNA-Sequenz und die Sequenz putativer, darauf kodierter Proteine wurden mit bekannten Sequenz-Informationen verglichen. Dazu wurde das Internet-Portal des NCBI genutzt (Im Internet unter:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Der verwendete Such-Algorithmus „Blast-Search“ erlaubt es DNA- mit DNA-, Protein- mit Protein- und Protein- mit DNA-Sequenzen (alle 6 Leserahmen) zu vergleichen (Altschul *et al.*, 1997).

Zur Analyse möglicher Transkriptionsfaktor-Bindestellen der Promotor-Region der Gene *PaCox17* und *PaScol* wurden die Datenbanken PLACE („Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements“; Im Internet unter: <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) und SCPD (*S. cerevisiae* Promoter Database; in Internet: <http://cgsigma.cshl.org/jian/>) genutzt. Um Zugriff auf die Objekt-orientierte Transkriptionsfaktor-Datenbank ooTFD zu erhalten, wurde das Programm Tfsitescan des Instituts für transkriptionelle Informatik (IFTI, Im Netz: <http://www.ifti.org/>) verwendet (Ghosh, 1999).

Literatur-Datenbanken wurden mit Hilfe des Services „PubMed“ nach Stichworten bzw. einer Kombination von Stichworten durchsucht. Das entsprechende Internet-Portal ist unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed> zu finden.

### **2.8.3 Homologievergleiche**

Homologievergleiche auf DNA- bzw. Protein-Ebene wurden mit dem Programm „Clone Manager 6“ durchgeführt. Dabei wurde eine DNA-Sequenz als Referenz ausgewählt, weitere Sequenzen wurden entsprechend des „Blast“-Algorithmus darunter angeordnet. Alternativ wurde der „Blast“-Algorithmus des NCBI verwendet (Altschul *et al.*, 1997). Die auf diese Art erhaltenen Homologievergleiche konnten digital weiterbearbeitet werden (z.B. Export in die Textverarbeitung Word).

### **2.8.4 Virtuelle Klonierung**

Die virtuelle Klonierung überlappender DNA-Sequenzen erfolgte durch das Programm „Clone Manager 6“, welches in der Lage ist DNA virtuell zu schneiden, zu ligieren, DNA-Enden aufzufüllen bzw. glätten. Weiterhin konnten DNA-Sequenzen nach Leserahmen durchsucht, in Proteine translatiert bzw. invertiert werden.

## 3 Ergebnisse

Die molekularen Grundlagen des Kupfer-Metabolismus wurden in dem Ascomyceten *P. anserina* vor allem durch die Charakterisierung der langlebigen Kupfermangel-Mutante *grisea* erforscht (siehe 1.3.2.1). Um Kupfer-Transportwege und ihre Bedeutung für die Alterung genauer zu untersuchen, schien es sinnvoll einzelne Komponenten der Kupfer-Homöostase auszuschalten. Befunde, die in vergangenen Dekaden erbracht wurden, unterstreichen dabei die zentrale Rolle der Mitochondrien im Bezug auf Alterungsprozesse. Da der mitochondriale Kupfer-Mangel der Mutante *grisea* zum Ausfall der COX-Respiration und zur Induktion des alternativen Atmungsweges führt, war es von großem Interesse, speziell die Kupfer-Versorgung der COX zu unterbinden. Zu diesem Zweck wurde eine *PaCox17*-Nullmutante isoliert und charakterisiert.

### 3.1 Der *PaCox17*-Locus von *P. anserina*

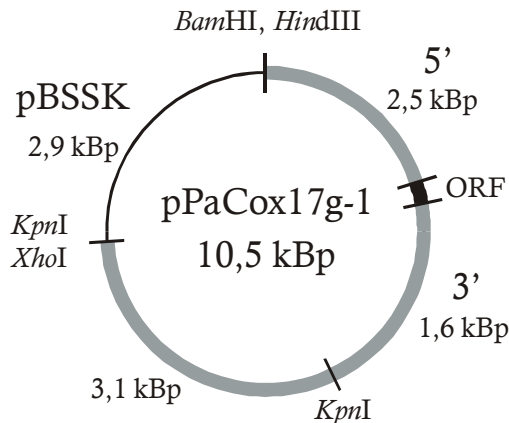
Zur Isolation einer *PaCox17*-Nullmutante sollte ein Gentauchplasmid konstruiert werden, daß die endogene Kopie von *PaCox17* in *P. anserina* durch eine Resistenz-Kassette ersetzt. Der Austausch sollte durch homologe Rekombination zu beiden Seiten des Leserahmens (ORF, engl.: „open reading frame“) von *PaCox17* erfolgen. Für einen derartigen Gentauch sind die 5'- und die 3'-Flanken von *PaCox17* essenziell. Im Rahmen der Diplomarbeit von O. Stephan (1999) wurde die genomische Kopie von *PaCox17* mit flankierenden Sequenzen isoliert, das resultierende Plasmid pPaCox17g-1 war das Ausgangs-Konstrukt der vorliegenden Arbeit.

#### 3.1.1 Isolation der flankierenden Bereiche von *PaCox17*

Zur Konstruktion eines für die geplanten Experimente geeigneten Gentauch-Plasmids war es nötig, ausreichend lange Sequenzen des 5'- und 3'-Bereichs von *PaCox17* zur Verfügung zu stellen. Plasmid pPaCox17g-1 ist ein pBSSK(+)-Derivat. Es enthält 7,6 kBp DNA aus *P. anserina*, genauer den *PaCox17*-Locus nebst flankierenden Sequenzen (siehe Abb. 7; Stephan, 1999).

Das klonierte genomische Fragment in pPaCox17g-1 ist ein Subfragment des Cosmids 28H1, welches etwa 30 kBp *P. anserina*-DNA enthält (Stephan, 1999).

Die molekulare Analyse ergab, daß in diesem 7,6 kBp langen Fragment ca. 2,5 kBp DNA stromaufwärts und ca. 4,7 kBp DNA stromabwärts des ORF von *PaCox17* lokalisiert sind (siehe Abb. 7). Der ORF von *PaCox17* ist 372 Bp lang und enthält zwei Introns (Stephan, 1999).



**Abbildung 7: Restriktionskarte von Plasmid pPaCox17g-1.** Es enthält ein 7,6 kBp langes Fragment aus *P. anserina* (grauer Kreisbogen) inklusive des 372 Bp langen ORF von *PaCox17* (dicker, schwarzer Kreisbogen), das zwischen die Schnittstellen *HindIII* und *XhoI* in pBSSK(+) (dünner, schwarzer Kreisbogen) integriert wurde. Die 5'-Flanke umfasst 2,5 kBp, die 3'-Flanke 4,7 kBp.

Das klonierte Fragment in pPaCox17g-1 ist ein Subfragment eines Cosmids einer *P. anserina*-Genbank. Bei der Herstellung repräsentativer (überlappender) Genbanken kann niemals ausgeschlossen werden, daß nicht kolineare (d. h. nicht im Genom benachbarte) Fragmente aus dem Genom artifiziell benachbart werden. Prinzipiell können dies auch mehrere nicht kolineare Fragmente sein. Da für die Konstruktion des Gentausch-Plasmids beide Flanken von *PaCox17* mit ausreichender Länge benötigt werden, war es erforderlich, die Kolinearität der entsprechenden Sequenzen zu prüfen. Dazu wurden zunächst 1150 Bp stromaufwärts und 1889 Bp stromabwärts des ersten Basenpaares des Gens *PaCox17* sequenziert. Die durch die Sequenzanalyse erhaltenen Daten erleichterten die Planung von Southern-Analysen, deren Ziel es war, die klonierten *P. anserina*-Sequenzen mit den entsprechenden genomischen Sequenzen zu vergleichen (siehe Abb. 8). Zur Klärung der Kolinearität wurde DNA des Plasmids pPaCox17g-1, genomische DNA des *P. anserina*-Stammes *s*<sup>-</sup> und DNA des Cosmids 28H1 mit mehreren Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Methoden).

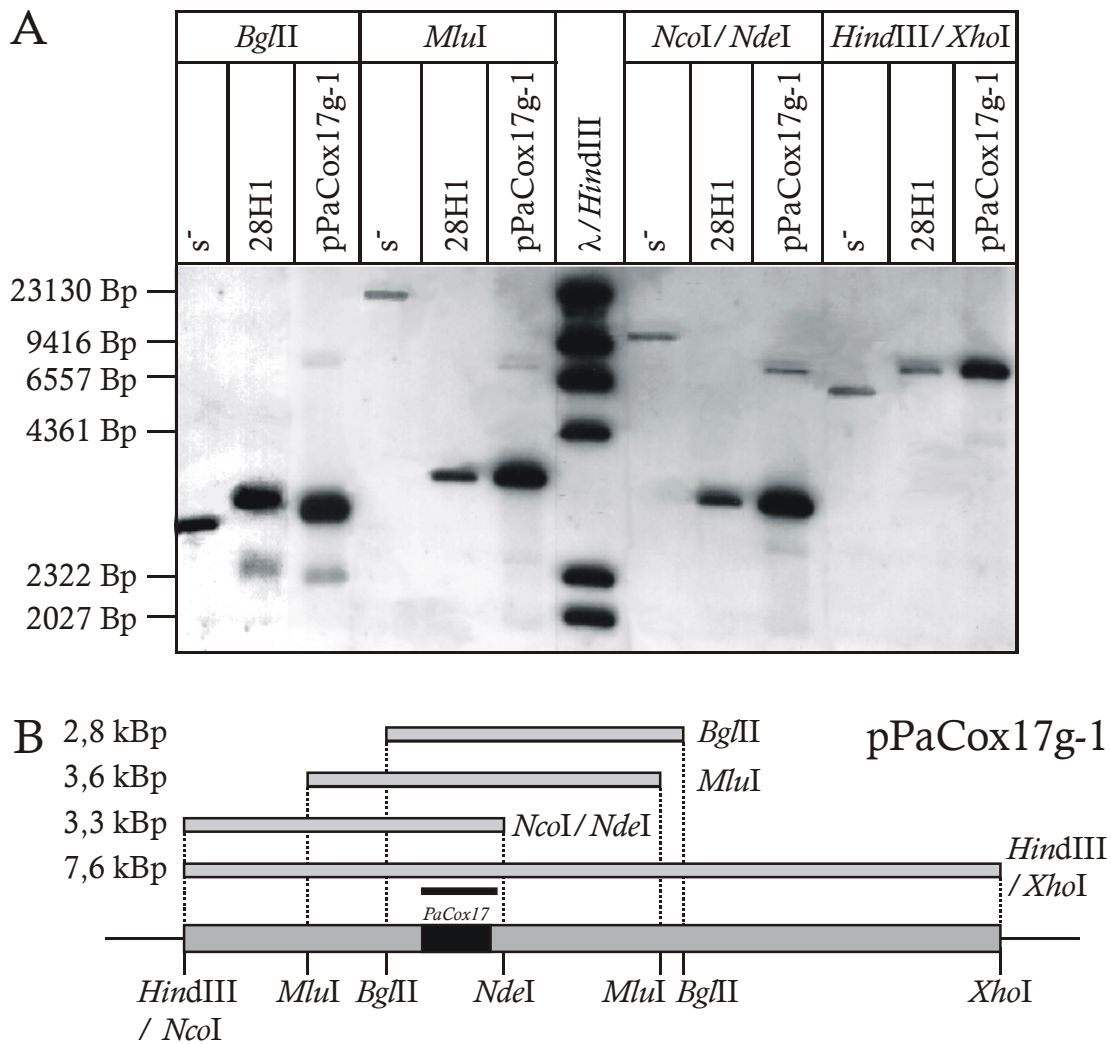
Das 7,6 kBp Fragment des Plasmids pPaCox17g-1 ist ein Subfragment des Cosmids 28H1 (Stephan, 1999). Cosmid 28H1 dient als zusätzlichen Kontrolle, die die Integrität von Plasmid pPaCox17g-1 belegen soll.

Die geschnittenen DNA-Proben wurden einer Southern-Analyse unterzogen und anschließend mit der DIG-markierten *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Diese Sonde umfasst den ORF von *PaCox17* (372 Bp) und einen Teil des angrenzenden 3'-Bereichs, präzise -1 bis 494 (siehe Methoden).

DNA des Plasmids pPaCox17g-1 wurde mittels der Oligonukleotide S1 und S2 durch PCR amplifiziert und anschließend mit DIG markiert. Die resultierende Sonde wird als *PaCox17*-ORF-Sonde bezeichnet (siehe Methoden).

Alle durchgeführten Restriktionen schneiden jeweils ein definiertes Subfragment aus dem 7,6 kBp Fragment von pPaCox17g-1. Sind das 7,6 kBp Fragment, Cosmid 28H1 und die

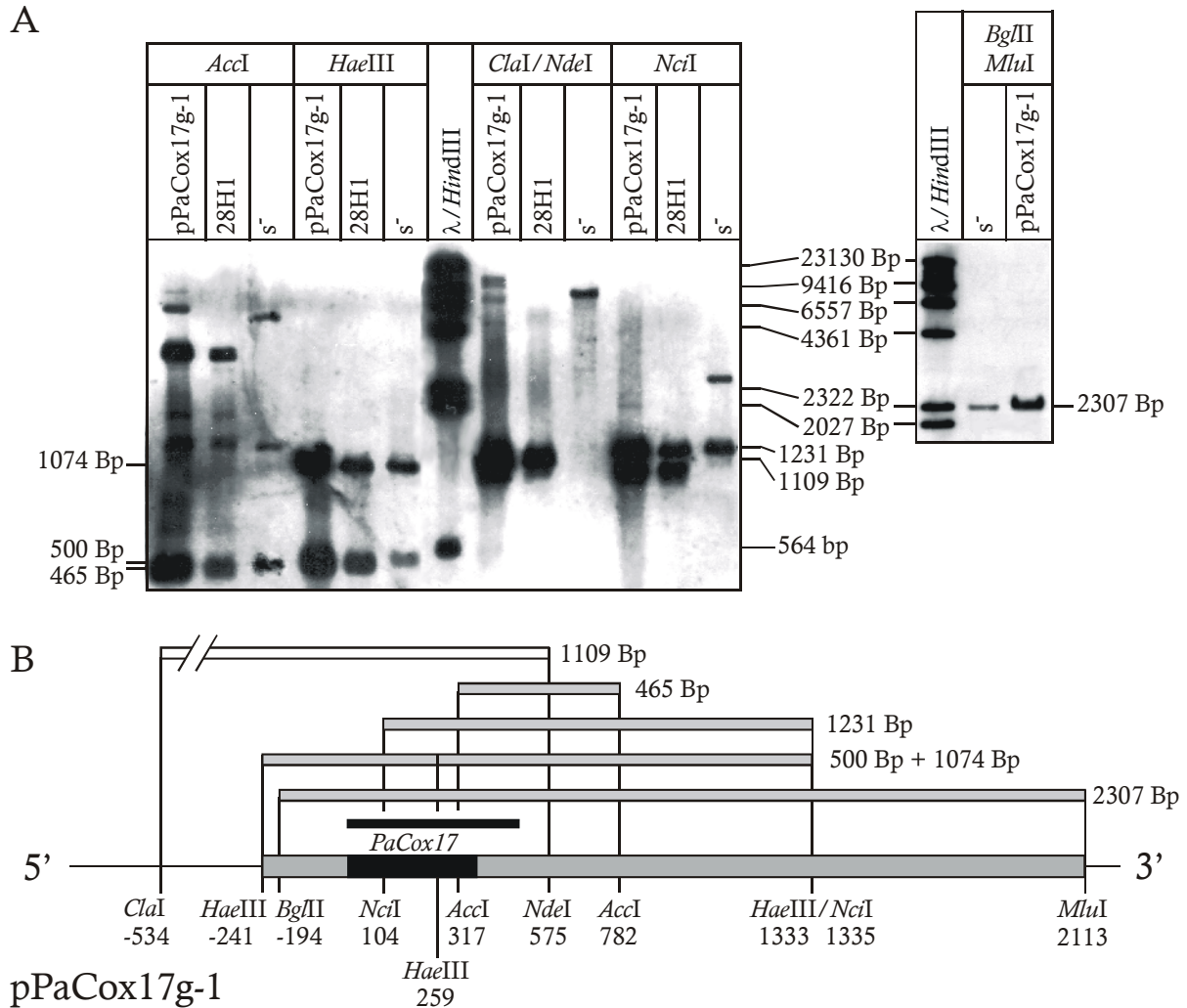
genomische DNA kolinear, müssen sie hybridisierende Fragmente der gleichen Länge aufweisen (siehe Abb. 8). Da Plasmid pPaCox17g-1 zuvor kartiert wurde, wurden hybridisierende Fragment von 2,8 kBp (Restriktion mit *Bgl*II), 3,6 kBp (*Mlu*I), 3,3 kBp (*Nco*I + *Nde*I) und 7,6 kBp (*Hind*III + *Xho*I) erwartet.



**Abbildung 8: Southern-Analyse von Plasmid pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und genomischer DNA von *P. anserina*.** (A) DNA von pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und Stamm s<sup>-</sup> wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Die DNA wurde mit *Bgl*II, *Mlu*I, *Nco*I + *Nde*I bzw. mit *Hind*III + *Xho*I geschnitten. Als Längenstandard diente DIG-markierte DNA des Phagen  $\lambda$  (*Hind*III geschnitten), dessen Fragmentlängen sind links neben der Fotografie angegeben. (B) Schematische Darstellung der in pPaCox17g-1 klonierten genomischen DNA (dicker, grauer Balken, unten). Der Leserahmen von *PaCox17* ist als schwarzer Balken dargestellt. Der darüber liegende dünnere schwarze Balken symbolisiert die *PaCox17*-ORF-Sonde. Für die Southern-Analyse relevante Schnittstellen sind eingezeichnet. Erwartete hybridisierende Subfragmente der vier Restriktionen von Plasmid pPaCox17g-1 sind als graue Balken oberhalb von pPaCox17g-1 dargestellt. Die erwarteten Längen hybridisierender Fragmente betragen 2,8 kBp (*Bgl*II), 3,6 kBp (*Mlu*I), 3,3 kBp (*Nco*I + *Nde*I) und 7,6 kBp (*Hind*III + *Xho*I). Weitere Informationen siehe Text.

Die Southern-Analyse belegt die Kolinearität von Plasmid pPaCox17g-1 und Cosmid 28H1, beide weisen bei allen Restriktionen identische Fragment-Längen auf. Es besteht allerdings keine Kolinearität zum Genom von *P. anserina*, da sich die Länge hybridisierender,

genomischer Fragmente deutlich von Plasmid bzw. Cosmid unterscheidet (siehe Abb. 8). Um den Bereich einzugrenzen, in dem pPaCox17g-1 zum Genom von *P. anserina* kolinear ist, wurden eine Reihe weiterer Southern-Analysen durchgeführt (siehe Abb. 9).



**Abbildung 9: Southern-Analyse von pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und genomischer DNA.** (A) DNA von pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und Stamm *s*<sup>-</sup> wurde mit den Restriktionsenzymen *AccI*, *HaeIII*, *ClaI/NdeI*, *NciI* (links oben) bzw. *BglII/MluI* (rechts oben) geschnitten, auf einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit der DIG-markierten *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Die Fragmentlängen relevanter hybridisierender Fragments sind beiderseits der Fotografien angegeben. Als Längenstandard diente *HindIII*-geschnittene, DIG-markierte DNA des Phagen  $\lambda$ . Die Fragmentlängen sind zwischen den beiden Fotografien angegeben. (B) Darstellung der in pPaCox17g-1 integrierten, zum Genom kolinearen DNA (dicker, grauer Balken, unten), der Leserahmen von *PaCox17* ist als dicker schwarzer Balken dargestellt. Der darüber liegende dünnere schwarze Balken entspricht der *PaCox17*-ORF-Sonde. Für die Southern-Analyse relevante Schnittstellen sind eingezeichnet. Erwartete hybridisierende Subfragmente der fünf Restriktionen sind als Balken oberhalb von pPaCox17g-1 dargestellt. Graue Balken symbolisieren kolineare Fragmente. Der unterbrochene weiße Balken symbolisiert ein Fragment, daß im Genom nicht in dieser Form vorkommt. Die erwarteten Längen hybridisierender Fragmente sind neben den Balken angegeben, sie betragen 1109 Bp (*ClaI/NdeI*), 465 Bp (*AccI*), 1231 Bp (*NciI*), 500 Bp + 1074 Bp (*HaeIII*) bzw. 2307 Bp (*BglII/MluI*). Weitere Informationen siehe Text.

Der Bereich, in dem Plasmid pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und genomische DNA bezüglich *PaCox17* kolinear sind, erstreckt sich von -241 (*HaeIII*) bis +2113 (*MluI*). Da die *ClaI*-Schnittstelle – in pPaCox17g-1 an Position -534 lokalisiert – an dieser Position nicht im Genom enthalten ist, besteht in diesem Bereich keine Kolinearität. Lediglich 241 Bp der 5'-

Flanke der *PaCox17*-Kopie des Plasmids pPaCox17g-1 sind zum Genom von *P. anserina* kolinear (siehe Abb. 9B). Eine Flanke dieser Länge eignet sich nicht zur homologen Rekombination, ein größerer Abschnitt der 5'-Flanke (minimal 1 kBp) musste isoliert werden.

### **Isolation der 5'-Flanke von *PaCox17***

Zur Isolation der 5'-Flanke des *P. anserina* Gens *PaCox17* wurde die Hälfte einer *P. anserina*-Cosmidbank mit der *PaCox17*-ORF-Sonde (PCR mit Oligonukleotiden S1 und S2,  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP markiert) hybridisiert. Anschließend wurde eine Autoradiographie angefertigt (siehe Methoden).

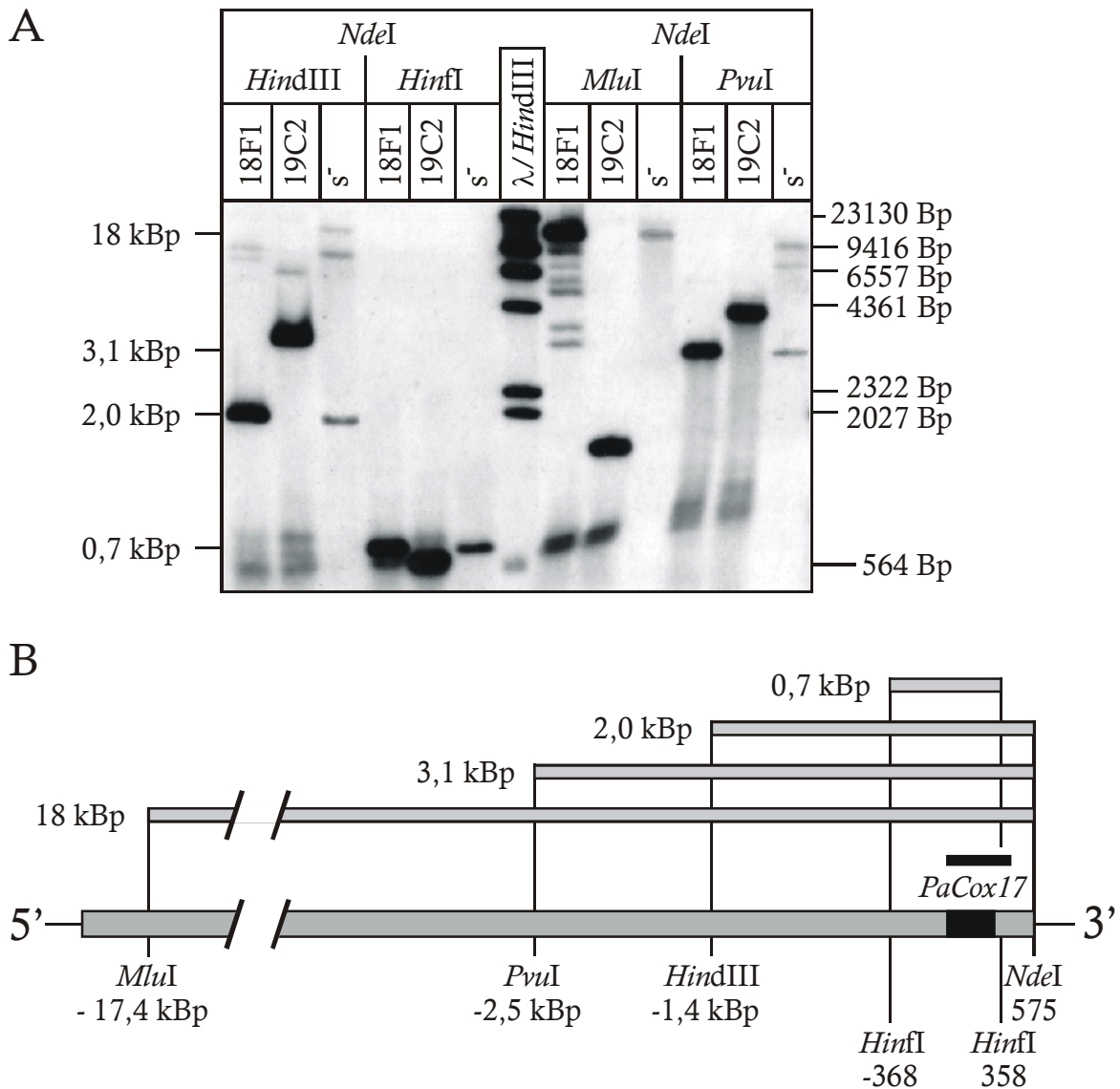
Die zweite Hälfte der hier verwendeten Cosmidbank (Membranen 24-46) wurde zuvor zur Isolation des Cosmids 28H1 verwendet (Stephan, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die erste Hälfte der Cosmidbank (Membranen 1-23) mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert.

Da die Cosmidbank fünffach redundant ist, wurden statistisch 2,5 hybridisierende Cosmid-Klone pro halber Cosmidbank erwartet. Die beiden Cosmide 18F1 und 19C2 erwiesen sich als positiv. Die DNA beider Cosmide und genomische DNA des *P. anserina* Stammes s<sup>-</sup> wurden durch eine Southern-Analyse auf Kolinearität geprüft. Proben der DNA wurden jeweils mit *NdeI* und einem weiteren Restriktionsenzym geschnitten: *HindIII*, *Hinfl*, *MluI*, *PvuI*, sowie *XhoI*. Als Sonde wurde die *PaCox17*-ORF-Sonde (DIG-markiert) eingesetzt (siehe Methoden). Ein Cosmid, welches eine zum Genom von *P. anserina* kolleare *PaCox17*-5'-Flanke enthält, müsste zumindest bei einigen Restriktionen hybridisierende Fragmente aufweisen, deren Länge hybridisierenden Fragmenten genomischer DNA entspricht (siehe Abb. 10).

Die Restriktionen dieser Southern-Analyse wurden jeweils mit *NdeI* und einem weiteren Enzym (*HindIII*, *Hinfl*, *MluI*, *PvuI* bzw. *XhoI*) durchgeführt. *NdeI* schneidet bezüglich *PaCox17* an Position +575, die Sonde (-1 bis +494) hybridisiert oberhalb der *NdeI*-Stelle. Die Länge hybridisierender Banden hängt nur von dem zweiten, im 5'-Bereich schneidenden Restriktionsenzym ab. Weisen Cosmid und Genom bei einer Enzym-Kombination Fragmente identischer Länge auf, handelt es sich um kolleare Bereiche.

Lediglich Cosmid 18F1 ist zum Genom kolleare (siehe Abb. 10). Die Restriktion von Cosmid 18F1 und genomischer DNA mit *NdeI* und *PvuI* ergaben hybridisierende Fragmente von 3,1 kBp Länge. Da *NdeI* bezüglich des *PaCox17*-ORF an Position +575 schneidet, bilden 2,5 kBp des 3,1 kBp Fragments die vermutlich kolleare 5'-Flanke von *PaCox17* (siehe Abb. 10B).

Da bei der Restriktion mit *NdeI* und *MluI* hybridisierende Fragmente von etwa 18 kBp detektiert wurden, lässt sich nicht mit Sicherheit erkennen, ob es sich hierbei tatsächlich um Fragmente mit identischer Länge handelt.

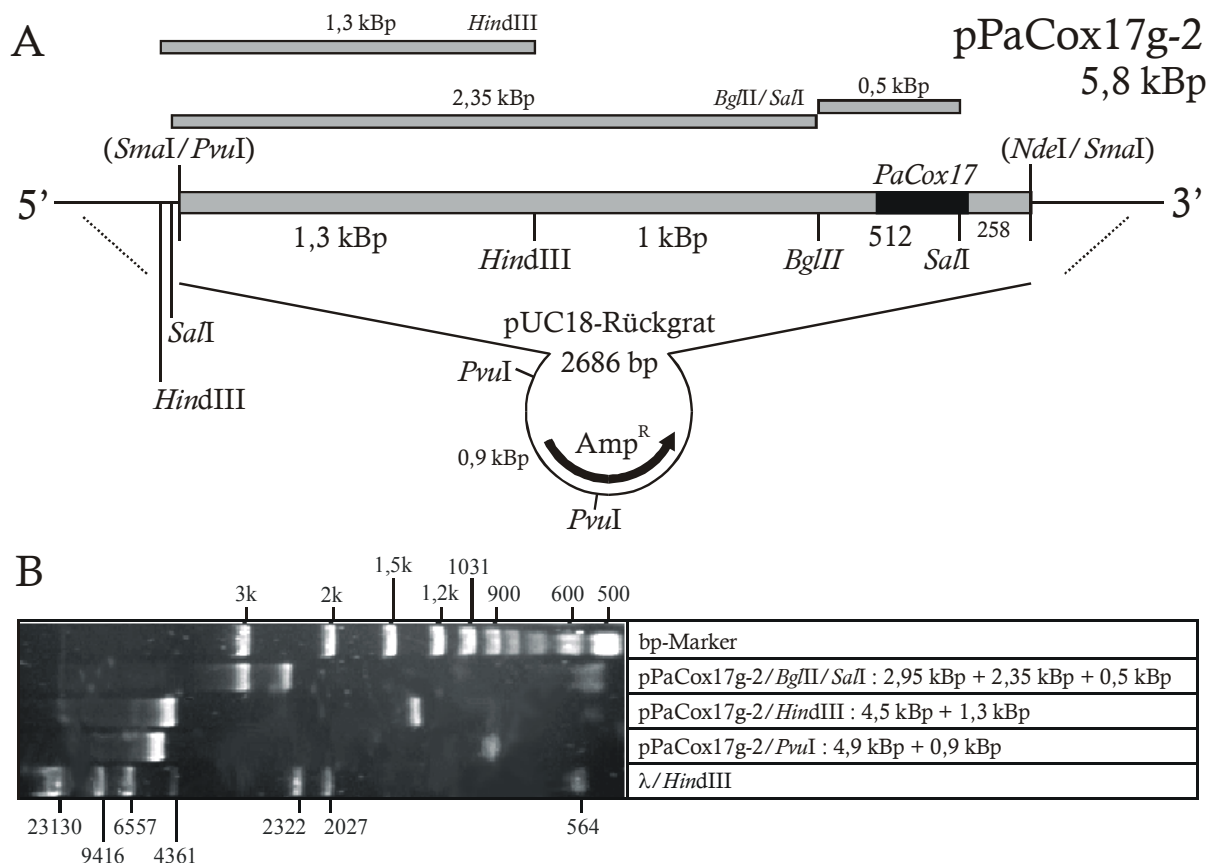


**Abbildung 10: Southern-Analyse der Cosmide 18F1, 19C2 und genomischer DNA von *P. anserina*.** (A) DNA der Cosmide 18F1, 19C2 und Stamm s' wurde mit dem Restriktionsenzymen *NdeI* und je einem weiteren Enzym *HindIII*, *HinfI*, *MluI* bzw. *PvuI* geschnitten, auf einem 1%-iges Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit der DIG-markierten *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Die Fragmentlängen relevanter hybridisierender Fragments sind links neben der Fotografie angegeben. Als Längenstandard diente *HindIII*-geschnittene, DIG-markierte DNA des Phagen  $\lambda$ . Die Fragmentlängen sind rechts angegeben. (B) Schematische Darstellung hybridisierender Fragmente mit Kolinearität zu genomischer DNA (dicker grauer Balken). Der ORF von *PaCox17* ist als dicker schwarzer Balken dargestellt. Der darüber liegende dünnere schwarze Balken entspricht der *PaCox17*-ORF-Sonde. Für die Southern-Analyse relevante Schnittstellen und ihre Position bezüglich *PaCox17* sind angegeben. Erwartete hybridisierende Subfragmente der vier Restriktions-Ansätze sind als hellgraue Balken oberhalb der genomischen DNA dargestellt. Die erwarteten Längen dieser Fragmente sind links von ihnen angegeben. Weitere Informationen siehe Text.

Zur Isolation der 5'-Flanke von *PaCox17* wurde DNA des Cosmids 18F1 mit *PvuI* und *NdeI* geschnitten. Die Enden der resultierenden Fragmente wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, das Fragment-Gemisch wurde durch Elektrophorese (1%-iges TAE-Gel) aufgetrennt und die 3,1 kBp Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Anschließend wurde die DNA aus dem Gel-Stück extrahiert (NucleoSpin-Kit). Die DNA wurde in das mit *SmaI* geschnittene und dephosphorylierte Plasmid pUC18 ligiert, die resultierenden Plasmide wurden in *E. coli* XL1blue transformiert, und auf LB-Medium mit

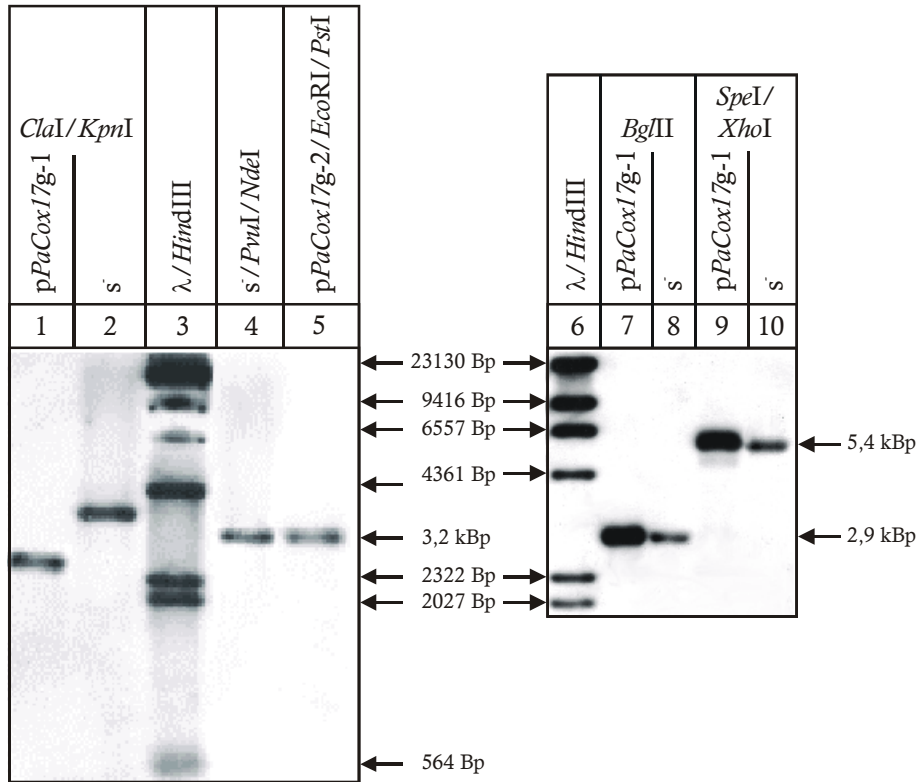


Ampicillin selektioniert (siehe Methoden). Aus den *E. coli*-Kolonien wurden Plasmide isoliert und mit *PvuI* geschnitten. Plasmide, in deren pUC18-Rückgrat das 3,1 kBp lange *P. anserina*-Fragment (enthält 5'-Flanke und ORF von *PaCox17*) ligiert wurde, sollten nach der Restriktion mit *PvuI* Fragmente von 4,9 kBp und 0,9 kBp aufweisen. Zwei weitere Restriktionen mit *HindIII* bzw. *BglII* und *SaI* gaben Aufschluss über die Orientierung des in pUC18 ligierten Fragments aus *P. anserina*. Die Orientierung des Einschubs eines Klon wurde bestimmt, das resultierende Plasmid wurde pPaCox17g-2 benannt (siehe Abb. 11).



**Abbildung 11: Schematische Darstellung und Restriktionsanalyse des Plasmids pPaCox17g-2.** (A) Plasmid pPaCox17g-2 besteht aus 3,1 kBp DNA aus *P. anserina* (dicker grauer Balken; enthält *PaCox17*-ORF, schwarzer Balken), die in die *SmaI*-Stelle von pUC18 ligiert wurde. Darüber abgebildete dünnere graue Balken symbolisieren Subfragmente der in (B) gezeigten Restriktionen. (B) Restriktion von pPaCox17g-2 mit diversen Enzym-Kombinationen. Verwendete Enzyme und erwartete Fragmentlängen sind rechts neben dem Agarose-Gel angegeben. Vergleiche auch postulierte Subfragmente in (A). Weitere Erklärungen siehe Text.

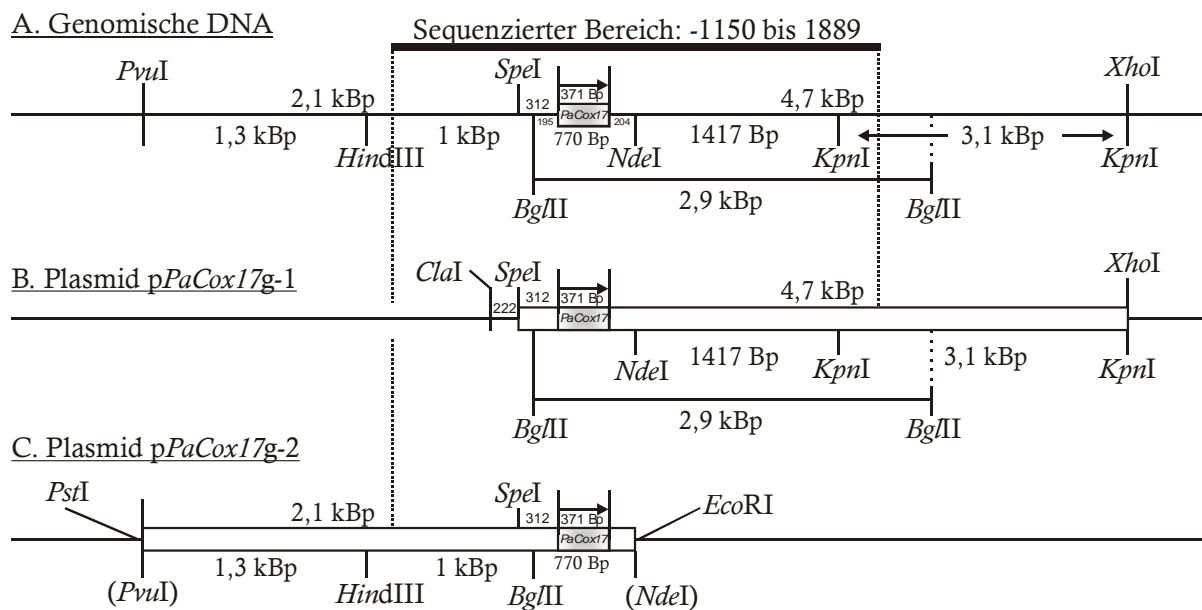
Um die Kolinearität der Plasmide pPaCox17g-1 und pPaCox17g-2 zum Genom von *P. anserina* zu verifizieren, wurden beide Plasmide und genomische DNA des Stammes *s*<sup>-</sup> (690766) einer Southern-Analyse unterzogen. Dabei wurden die geschnittenen DNA-Proben mit der DIG-markierten *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert (siehe Methoden). Die Kolinearität beider Plasmide zum Genom konnte innerhalb der erwarteten Grenzen belegt werden (siehe Abb. 12).



**Abbildung 12: Southern-Analyse von Plasmid pPaCox17g-1 bzw. pPaCox17g-2 und genomischer DNA von *P. anserina*.** DNA von pPaCox17g-1 bzw. pPaCox17g-2 und Stamm *s* wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, auf einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Als Längenstandard enthalten die Spuren 3 und 6 DIG-markierte DNA des Phagen  $\lambda$  (mit *Hind*III geschnitten). Entsprechende Fragmentlängen sind zwischen den beiden Fotografien angegeben. Das rechte Foto zeigt eine Southern-Analyse, bei der pPaCox17g-1 und Gesamt-DNA aus *P. anserina* mit *Bgl*III (Spuren 7 und 8) bzw. mit *Spe*I und *Xho*I (Spuren 9 und 10) geschnitten wurden. Das Plasmid pPaCox17g-1 ist in diesem Bereich zum Genom kolinear. Dabei ist die *Xho*I-Stelle am 3'-Ende, des in pPaCox17g-1 inserierten Fragments aus *P. anserina*, lokalisiert. Die *Spe*I-Stelle ist 312 Bp stromaufwärts des *PaCox17*-ORF lokalisiert. Weitere 222 Bp stromaufwärts befindet sich in pPaCox17g-1 eine *Cla*I-Stelle. Anhand der Restriktion von pPaCox17g-1 und Gesamt-DNA aus *P. anserina* mit *Cla*I und *Kpn*I (Spuren 1 und 2) wurde erkannt, daß sich die *Cla*I-Stelle von pPaCox17g-1 im Genom nicht an derselben Position befindet. Die DNA-Sequenz von pPaCox17g-1 stromaufwärts von *Spe*I ist zum Genom nicht kolinear. *Kpn*I befindet sich dabei zwischen *Spe*I und *Xho*I (siehe Abb. 4).

Das in pPaCox17g-2 klonierte, stromabwärts des *PaCox17*-Leserahmens gelegene Subfragment aus *P. anserina* (3,1 kBp) ist in seiner gesamten Länge zum Genom kolinear. Dies belegt die gezeigte Restriktionsanalyse (Spuren 4 und 5). Da das 3,2 kBp lange genomische Subfragment durch Ligation mit glatten Enden in pUC18 ligiert wurde, gingen die begrenzenden Schnittstellen *Pvu*I und *Nde*I verloren. In pPaCox17g-2 befindet sich allerdings die Schnittstelle *Pst*I direkt neben der eliminierten *Pvu*I-Stelle des genomischen Fragments, ebenso befindet sich *Eco*RI direkt neben der eliminierten *Nde*I-Stelle. Dementsprechend wurde pPaCox17g-2 mit *Pst*I und *Eco*RI geschnitten (Spur 5), während die genomische DNA mit *Pvu*I und *Nde*I geschnitten wurde (Spur 4). Die beiden auf diese Art geschnittenen Fragmente hybridisierten auf derselben Höhe, damit ist ihre Kolinearität belegt (vergl. Abb. 13).

Die Southern-Analysen belegen, daß DNA-Sequenzen 0,3 kBp stromaufwärts und 4,7 kBp stromabwärts des ORF von *PaCox17* in pPaCox17g-1 zum Genom von *P. anserina* kolinear sind (s. Abb. 12 und 13.B). Am 5'-Ende ist allerdings offensichtlich ein aus einem nicht direkt benachbarten Bereich des Gens *PaCox17* lokalisiertes Fragment ligiert worden. Plasmid pPaCox17g-2 enthält 3,1 kBp zum Genom kolineare DNA: etwa 2,5 kBp 5'-Bereich, den *PaCox17*-ORF und 0,2 kBp 3'-Bereich. Die Plasmide pPaCox17g-1 und pPaCox17g-2 enthalten damit die 3'-Flanke bzw. die 5'-Flanke von *PaCox17* in einer für homologe Rekombination ausreichenden Länge (s. Abb. 13). Damit standen die zur Konstruktion des Gentauch-Plasmids benötigten genomischen Sequenzen zur Verfügung.



**Abbildung 13: Vergleich des *PaCox17*-Locus mit klonierten Subfragmenten.** Unter (A) ist der *PaCox17*-Locus von *P. anserina* dargestellt. Wichtige Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Der schwarze Balken darüber zeigt den sequenzierten Bereich. Der kleine, graue Kasten symbolisiert den *PaCox17*-Leserahmen. (B) und (C) zeigen die in den Plasmiden pPaCox17g-1 und pPaCox17g-2 enthaltenen genomischen Subfragmente. Rechtecke stellen zum Genom homologe Sequenzen dar. Kleine, graue Kästen symbolisieren wiederum den *PaCox17*-Leserahmen. In Klammern gesetzte Schnittstellen wurden bei der Integration des Subfragments in das Plasmid eliminiert. pPaCox17g-1 enthält ein 5,4 kBp langes, zum *PaCox17*-Locus kolineares genomisches Fragment (B). Bei pPaCox17g-2 ist das gesamte Teilfragment des *PaCox17*-Locus (3,1 kBp) zum Genom kolinear (C).

### 3.1.2 Analyse des genomischen Locus und der cDNA von *PaCox17*

Zur Analyse des Gens *PaCox17* wurden die Plasmide pPaCox17g-1 und pPaCox17g-2 (s. Abb. 7 und 11) mit der cDNA von *PaCox17* verglichen, die im Rahmen der Diplomarbeit von O. Stephan (1999) sequenziert wurde. An genomischer Sequenz wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 3411 Bp des *PaCox17*-Locus sequenziert (Auftragsdienst, siehe Methoden). Bezüglich des 372 Bp langen ORF von *PaCox17* wurde die Sequenz von -1150 bis +2261 analysiert (Genbank „accession number“ AJ578463). Die *PaCox17*-cDNA wurde von -13 bis +521 sequenziert (Genbank „accession number“ AJ578462).

Der Vergleich der genomischen Sequenz und der cDNA führte zur Identifizierung zweier Introns. Das erste Intron umfasst 58 Bp (+35 bis +92), das zweite Intron beinhaltet 71 Bp (Position +160 bis +231), beide Introns fehlen in der cDNA (siehe Abb. 14). Die 5'-Spleiß-Stellen der Introns GTATGT (Intron 1) bzw. GTCCGT (Intron 2) ähneln der bekannten Konsensus-Sequenz GTANGT filamentöser Pilze. Auch die beiden 3'-Spleiß-Stellen ATAG stimmen mit dem Konsensus (A/C)(C/T)AG überein (Ballance, 1986). 122 Bp unterhalb des ORF von *PaCox17* (Position +495) ist eine mögliche Polyadenylierungs-Stelle in einer AT-reichen Region lokalisiert, ihre Sequenz AATAGA ähnelt der Konsensus-Sequenz AATAAA filamentöser Pilze (Ballance, 1986). Durch die Analyse der 5'-Region von *PaCox17* wurden mehrere mögliche Promotor-Elemente bzw. Protein-Bindestellen identifiziert. Neben einer CCAAT-Sequenz (-113) und einer CAAT-Sequenz (-145) (van Heeswijck und Hynes, 1991) wurden mögliche Bindestellen für regulatorische Proteine lokalisiert: GRISEA (-98), NRF-2 (-51 und -182), MIG1 (-214) und BRL A (-258, -404, -950 und -1001) (Adams *et al.*, 1990; Borghouts *et al.*, 2002A; Chang und Timberlake, 1993; Lundin *et al.*, 1994; Virbasius und Scarpulla, 1991; siehe Abb. 14 und Tabelle 13).

-1150 caatgccacc ggtccccacg ccctgaagtt  
-1120 gtccactttt acaaagcgct tgaacaacc cgagaaagtc cgtttcataa ccaaaaccaa gccccgaatc  
-1050 cgaagcatcc ccaaccttac cgccgggtg tttatcaacat acttcttttc **ccctctcatc** tcccgcctcc  
BRL A

-980 aagcggcctt acactcgtcc tcgtcacgaa **caaggggggat** attattcaac ccttaccttt tgtcgcctca  
BRL A

-910 cctcaagacg ttggcgttga ttatccacgc ttctggacct agtacgctgt cgttgccgca gatgacgggg  
-840 gagttttgga gggtgtgtt gaatacagat gtgaggcac aggcggtggg ggatttgacg ttgacggggg  
-770 cgggtcgtgt tgggtttatg gcgttgctgg atgtgaatga ggatcggatg agggaggtgt gcagggagat  
-700 ggggagggag gtggtggagg cgcaggattg ggttgggggg gtgtttcgag gtttgagggg gggggatgaa  
-630 gggggggagg aggagaggt gaggatgtg gctgcggggg tgctggtag gttggggag gcggtggaga  
-560 ggtggagggt gggtttggtg ggggatatga ttgggtttta gggcggtgat gcgatgggag gattttctg  
-490 ggggatgaca ttgatcaggt gagttagga ggggaaaca ggtggttga aagatggat tgggatgtc  
-420 ggggagttta cttgtg**aaag** ggggatgggt gtggtgttag taaagtggga gggaatctgt aactctggaa  
BRL A

-350 accatagctg tttactggga tatatatgtc tcggtcaact agtggaaatt gaagttagcc aagtcagtgt  
-280 gctgtacctc agatgttgac **ccaaggggt** atcacgtggc ccctcctcca cccctgcccc ccagct**cccc**  
BRL A

-210 **acaaaaaatg** ctgagagatc tgacgccatt **cgctcttggc** atgcgttttc gcggcggctc agcgg**CAATg**  
MIG1 NRF-2 CAAT

-140 cttgggggaa aaccgttcta gaaatcg**CCA** **Attg**acaaat **caacttgctc** attcagttta ctgatagctc  
HAP2/3/4 GR1SEA

-70 ccgacttctt tcaccttttt **tcctttcccc** caactcaaac aaagcacttg tcgtcaagaa aaaagtcaaa  
NRF-2

+1 **ATGTCCTCCG CCCAAGCTAC CGCCAGCTCA ATCGgtatgt** tccccgtccc ctctcgttgt ctcatggatg  
M S S A Q A T A S S I

+71 gcgtgattaa caccctcat **agCCTCCAGC GCCCCGGTTG CGCCGGTGAT CACCCAGTCA GCTGCTGCTG**  
A S S A P V A P V I T Q S A A A

+141 **CTGCTGCTGA CAAGCCCAAG gtccgt**caca cgtttaactg ttgaacgatt gagctagggg gggggggggg  
A A A D K P K

+211 gttaacaaaa agaaata**ata** **gCCCTGCTGC GTGTGCAAAG ACGAAAAGGC CAAGCGCGAC GAGTGCATGC**  
P C C V C K D E K A K R D E C M

+281 **TCTTCTCCAA GGCTGCCGAC CCACAAAAG ACTGCTTGTC GACCATTGAT CAGTATAGGA GTTGTATGGC**  
L F S K A A D P Q K D C L S T I D Q Y R S C M

+351 **TGGGTTTGA TTCAAGGTTT AGgagcagga ggaagggaga gqatggggaa gtgtataata tggttacgat**  
A G F G F K V \*

+421 atgggattga aatggatgga ctgggggaat gaatgaatac cagagggcgtt ctaaattgag gtttaaaagat  
**ggggaataga gaaagtgatt tttttgtcct gatttgggtg tgtggtcttg ggagtgggtt gttgtatggg**  
+491 atgaacaaa agatgcatat ggattggcta actgtaccgt tctctgcctg gtctctgcct tccattacct  
+561 cctccaacct tgcattgccc ttcctcacga gtaacaaatg aagacaattt gtttgacaac tggtttctct  
+631 tcttccccctc aaagtctctc aggcgggttt ccatactgtc atccaaacac ctgcccggagga tgcacataca  
+701 cccaaacagg cggctgacag gctctgtgat tccccgccg acatcactct tctgcctcg ctgacggatg  
+771 gcttcggtga gtcggtagat caccocaaaa tctctcttgg acggctgaaa atcgtccatg agtgcctccg  
+841 tgccattgtc aaagagcctt cttatagtct cgctgaacag tccagattg tgctccgcga tttgcatctc  
+911 gtcaccgagt tgttgcatgc cttctttgta ttctgccatg ccaccgagga ggactcccat gccattgctg  
+981 agatttctca tctcgtgtt gatttggctg gtgtcagcca ggtgggtgtt ggcttctctg attgttctgg  
+1051 tcagacgggt cagctgctcg ttgagatgct cggttaggcg gcggttcttt ttgatggctt tctttgaggg  
+1121 atttggtgcg gcgttgaat ttggcgtccc tggagtttgg ttgggtcttg aagtgtacag tggtaacaga  
+1191 aaccggcagc ttacctctg gacaagcccc ttgtcgtatc ttggtgactg ggcgaacagg ggttgacaga  
+1261 cggccggggt tcttttactc tgagatttcg agttctctc tctctcgcca ttatcgccat gaccttata  
+1331 cgggtgacggg ttgtgtgtgg tatgtttgac ttgtctggga aaagtgaag aaattgaaa gacctcccc  
+1401 gccagcaaaag ccaggccctt tgggtttggg ggcgcgcca ctacctgatt gaagatggtt gaggaaggt  
+1471 ttggttaaggt gtatctcaca tcagccaaag aagcctacct agctacctag ataaggggtc tcatagagtt  
+1541 ctgtgtagac catccaaggt tctagctaca tgccacatcg tggacaagca tgaggaagcc tatacaaga  
+1611 gaacaggat caagagcga cgatgatag ccacaagcca tgatgactct ctcataatat gggctaaatt  
+1681 cgtacttgta tcgtaggtag tcatttaaaa caaagaagtt gcccgaggaa ggcacgatga catcgagaac  
+1751 cgtgatgttg caaccctga cgttgaggc aggaacctg cagaccggac cactcatcc aagatggcag  
+1821 ccttggcatc catcgaatct gggcgggtg gggcgtcaga atcattttgc accagttccc cgccaaaaa  
+1891 aagttccaca caagcaactc caagaaacac caggtaacct gaagacttg tgatcgtcag cttccctaa  
+1961 ccccgcgcc ctcaatatct cacgctcggc tgcgcccggc aacttctggg caaaatgggt ctgcgggtg  
+2031 caaagaagta agacgcgtt tgtgtgtaat gagtctgga accaacagaa actgacaaaa gcccgcgaca  
+2101 gcaaacggag acttcggcaa ccgaatccga attacaacc agatgggatg cccaccacc ccaaatcttt  
+2171 ttggcccaaa aaaatgcttg c  
+2241

**Abbildung 14: Sequenz des PaCox17-Locus und des kodierten Proteins.** Kodierende Sequenz ist in Groß-Buchstaben dargestellt, PaCox17 kodiert das 80 Aminosäuren lange PaCOX17. Zwei Introns unterbrechen den Leserahmen. Die Sequenz der PaCox17-cDNA ist unterstrichen. Die Aminosäure-Sequenz von PaCOX17 ist unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. Spleiß-Stellen, Polyadenylierungs-Stellen und mögliche Promotor-Bindestellen sind fett gedruckt, darunter ist der Name des entsprechenden Binde-Proteins angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

**Tabelle 13: Mögliche Promotor-Bindestellen und Bindeproteine des PaCox17-Promotors.**

Position	Sequenz (5' → 3')	Protein-Bindefaktor	Referenz
-51	TTCCT	NRF-2	Virbasius und Scarpulla, 1991
-98	ACTTGCTCA	GRISEA	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
-113	CCAAT	HAP2, HAP3, HAP4	van Heeswijck und Hynes, 1991
-145	CAAT	CAAT-Bindeprotein	van Heeswijck und Hynes, 1991
-182	TTCCG	NRF-2	Virbasius und Scarpulla, 1991
-214	CCCCACAAAAAAT	MIG1	Lundin <i>et al.</i> , 1994
-258	CAAGGGG	BRL A	*
-404	AAAGGGG	BRL A	*
-950	CAAGGGG	BRL A	*
-1001	CCCCTCT	BRL A	*

\* Adams *et al.*, 1990; Chang und Timberlake, 1993

*PaCox17* kodiert in *P. anserina* ein 80 Aminosäuren langes Protein. Zu PaCOX17 homologe Proteine wurden in einer Reihe von Spezies identifiziert (siehe Abb. 15). Die Länge der COX17-Homologe liegt zwischen 62 (*Sus scrofa*) und 100 (*Aspergillus nidulans*) Aminosäuren (siehe Tab. 14).

**Tabelle 14: COX17-Homologe diverser Spezies.**

Spezies	Länge in Aminosäuren	Identische Aminosäuren	Prozentuale Übereinstimmung	„Accession“-Nummer
<i>Podospora anserina</i>	80 AS	80	100 %	CAE17997
<i>Neurospora crassa</i>	78 AS	52	65 %	XP_331729
<i>Gibberella zeae</i>	76 AS	52	64 %	XP_380732
<i>Magnaporthe grisea</i>	66 AS	47	58 %	EAA55474
<i>Aspergillus nidulans</i>	100 AS	43	40 %	XP_409000
<i>Eremothecium gossypii</i>	64 AS	31	38 %	NP_982381
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69 AS	31	36 %	NP_013092
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	70 AS	28	34 %	CAB75401
<i>Arabidopsis thaliana</i> II	72 AS	27	32 %	AAK73497
<i>Oryza sativa</i> I	79 AS	27	31 %	BAD19672
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	81 AS	25	29 %	AAF82382
<i>Canis familiaris</i>	63 AS	23	28 %	AAT37154
<i>Rattus norvegicus</i>	63 AS	22	27 %	NP_445992
<i>Mus musculus</i>	63 AS	22	27 %	BAB32486
<i>Arabidopsis thaliana</i> I	74 AS	22	26 %	AAK73496
<i>Homo sapiens</i>	63 AS	21	25 %	AAH10933
<i>Sus scrofa</i>	62 AS	21	25 %	P81045
<i>Plasmodium yoelii yoelii</i>	66 AS	20	24 %	EAA15594

Durch den Vergleich der COX17-Homologe von 18 Spezies konnten 12 in allen Spezies konservierte Aminosäuren identifiziert werden. Darunter sind vier in *S. cerevisiae* essenzielle Cystein-Reste (Heaton *et al.*, 2000) enthalten (siehe Abb. 15).

<i>P. anserina</i>	1	-----mssaq--atass--lassapvapvitqsaaaaa---d
<i>N. crassa</i>	1	-----masqs--fslta-lpsaaapaqiatpssdapa-----
<i>G. zeae</i>	1	-----mdaaq--ttlsspsaaanva---ststtat---n
<i>M. grisea</i>	1	-----m-pattap-----agūanaada---n
<i>A. nidulans</i>	1	mswlfgsssgkpcisdipalpsvnaqlan--gltsg-saektpti-pvate---apa---e
<i>E. gossypii</i>	1	-----m-pesss-v-----pgvsq---gsst---d
<i>S. cerevisiae</i>	1	-----mtetd--kkqe-----qenhaece---d
<i>S. pombe</i>	1	-----mssstepstatk-vsepapi-----ase---e
<i>A. thaliana 2</i>	1	-----msglq--aqdsa-csldkpskdivv-----ate---t
<i>O. sativa I</i>	1	-----mgs---tehp-lpaqspactvseggsaapapatds
<i>C. reinhardtii</i>	1	-----mg-as--gskpe-gagppalp--tjsspappgv---p
<i>C. familiaris</i>	1	-----mpg-laaasp-apsdsqe-----k
<i>R. norvegicus</i>	1	-----mpg-laaaspapp-----eage---k
<i>M. musculus</i>	1	-----mpg-laaaspapp-----eage---k
<i>A. thaliana 1</i>	1	-----mtdq-paanglippptsepskaaaas---a
<i>H. sapiens</i>	1	-----mpg-lvdsnpapp-----esqe---k
<i>S. scrofa</i>	1	-----pg-laaipapp-----esqe---k
<i>P. yoelii y.</i>	1	-----mglgltkplnltteesktca---k

		###	## #	#	#	
<i>P. anserina</i>	32	----kp-kp--ccvckdekakrdecmlfskaadpdkdclstidgyrscmagfgfkv----				
<i>N. crassa</i>	30	----kp-kp--ccvckdekakrddcmlfsksddpgkdcvstidgyracmagfgfkv----				
<i>G. zeae</i>	28	----kp-kp--ccvckdekakrdecmlfsnakdpaadcksmidgyrscmagfgfgv----				
<i>M. grisea</i>	18	----kp-kp--ccvckdekaardecmfnsakdpaedcktkiegyksmagfgfkv----				
<i>A. nidulans</i>	52	----kp-kp--ccvcktektardcmlfsksddptgecksmiegykacmagygfkv----				
<i>E. gossypii</i>	18	----kp-kp--ccvckpekeardscllfn-gvdavk-cgelvqkykdcmkgygfev----				
<i>S. cerevisiae</i>	19	----kp-kp--ccvckpekeerdctcllfn-gqdsek-ckefilekykckmkygfevpsan				
<i>S. pombe</i>	24	----kp-kp--ccacpettkgardacml--qssngpiecaklieahkkcmagygyev----				
<i>A. thaliana 2</i>	26	----kp-kkriccaccpdtkklrdeciv---ehgesactkwieahilclrsegfkv----				
<i>O. sativa I</i>	33	----kp-kkkiccaccpdtkklrdeciv---ehgesactkwieahkrclraegfnv----				
<i>C. reinhardtii</i>	19	igpdgkp-kki-ccscpdtkklrdtci--aergeehaycgalieahkaclrvegfkv----				
<i>C. familiaris</i>	18	----kplkp--ccacpettkkardacii---ekgeehcghlieahkecmralgfkv----				
<i>R. norvegicus</i>	18	----kplkp--ccacpettkkardacii---ekgeehcghlieahkecmralgfkv----				
<i>M. musculus</i>	18	----kplkp--ccacpettkkardacii---ekgeehcghlieahkecmralgfkv----				
<i>A. thaliana 1</i>	26	----et-kp-kkriccaccpdtkklrdeciv---ehgesactkwieahkielraegfnv----				
<i>H. sapiens</i>	18	----kplkp--ccacpettkkardacii---ekgeehcghlieahkecmralgfkv----				
<i>S. scrofa</i>	17	----kplkp--ccacpettkkardacii---ekgeehcghlieahkecmralgfkv----				
<i>P. yoelii y.</i>	21	----kk-ki--ccvcldtkklrdecivnl---geeqckkyindhngclrnegfdik---				

Abbildung 15: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von PaCOX17 mit COX17-Homologen anderer Spezies (siehe Tab. 14). Identische Aminosäuren sind invertiert dargestellt. Aminosäuren, die durch ein „#“ markiert wurden, sind in Hefe für die Restauration einer *Cox17*-Nullmutante kritisch (Punter und Glerum, 2003). Vier essenzielle Cystein-Reste sind durch „\*“ kenntlich gemacht (Heaton *et al.*, 2000). Weitere Erklärungen siehe Text.

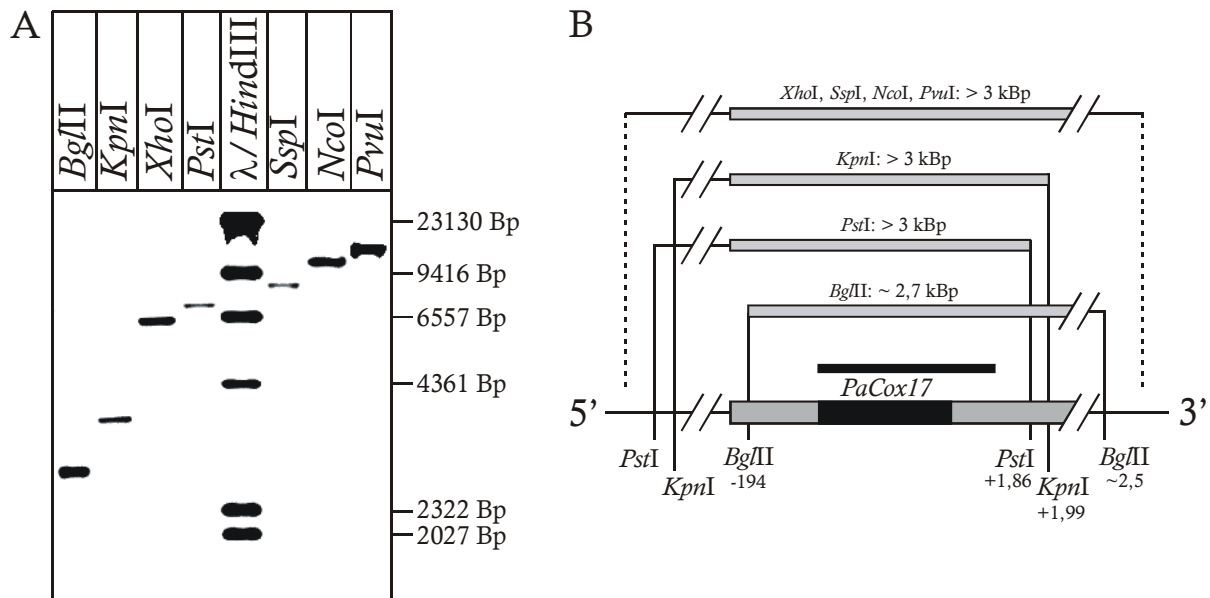
### **Cox17 ist im Genom von *P. anserina* in einer Kopie enthalten**

Da Gene von COX17-Homologen im Genom unterschiedlicher Spezies in einer Kopie [z.B.: Hefe (Glerum *et al.*, 1996) und Maus (Takahashi *et al.*, 2001)] bzw. in zwei Kopien [z.B.: *A. thaliana* (Wintz und Vulpe, 2002) und Mensch (Punter *et al.*, 2000)] gefunden wurden, war es von Interesse, die Kopienzahl des Gens *PaCox17* in *P. anserina* zu untersuchen. Dazu wurden ausgehend von der Sequenz von *PaCox17* eine Reihe von Restriktionen geplant, die den ORF von *PaCox17* innerhalb eines Fragments aus der genomischen DNA schneiden. Genomische DNA wurde mit *Bgl*III, *Kpn*I, *Xho*I, *Pst*I, *Ssp*I, *Nco*I bzw. *Pvu*I geschnitten und im Rahmen

einer Southern-Analyse mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Dabei wurden nicht-stringente Hybridisierungs- und Wasch-Bedingungen gewählt, um auch Fragmente mit nur geringer Homologie zu *PaCox17* zu detektieren (siehe Methoden).

Innerhalb des 3411 Bp langen sequenzierten *PaCox17*-Locus schneiden *Bgl*III (5' vom ORF), *Kpn*I (3' vom ORF) und *Pst*I (3' vom ORF) je nur einmal, es wurde je ein Signal erwartet. *Xho*I, *Ssp*I, *Nco*I und *Pvu*I schneiden den *PaCox17*-Locus nicht zwischen -1150 und +2261 (3411 Bp bekannte Sequenz) und damit auch nicht innerhalb der Sequenz der Sonde. Für die daraus resultierenden hybridisierenden Fragmente wird eine Länge von mehr als 3,4 kBp erwartet (siehe Abb. 16).

Würde das Genom von *P. anserina* weitere Kopie(en) von *PaCox17* enthalten, würde pro Spur wahrscheinlich mehr als ein Signal erwarten werden. Dies war nicht der Fall. Die erhaltenen hybridisierenden Fragmente zeigten die erwartete Länge (siehe Abb. 16). Das Gen *PaCox17* ist nach diesen Befunden im Genom von *P. anserina* in einer Kopie enthalten.



**Abbildung 16: Southern-Analyse genomischer DNA mit Sonde *PaCox17*-ORF.** Genomische DNA des Stammes *s* wurde mit *Bgl*III, *Kpn*I, *Xho*I, *Pst*I, *Ssp*I, *Nco*I bzw. *Pvu*I geschnitten, durch Elektrophorese aufgetrennt, auf Nylonmembran transferiert und mit einer *PaCox17*-ORF-Sonde (schwarzer Balken über *PaCox17*) hybridisiert (siehe Methoden). Teil A zeigt die zugehörige Fotografie. Die Schnittstellen wurden so gewählt, daß sie innerhalb des sequenzierten Bereichs des *PaCox17*-Locus maximal einmal vorkommen, allerdings nicht im Bereich der hybridisierenden Sonde. Es wurden nicht-stringente Hybridisierungs- und Wasch-Bedingungen gewählt, um auch Fragmente mit nur geringer Homologie zu *PaCox17* zu detektieren (siehe Methoden). Teil B zeigt den *PaCox17*-Locus (von 5' bis 3'; Linie symbolisiert DNA; dicker grauer Balken: sequenzierte DNA; dicker schwarzer Balken: *PaCox17*-ORF). Verwendete Restriktionsenzyme und zugehörige erwartete Fragment-Längen sind oberhalb des *PaCox17*-Locus angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.



## 3.2 Konstruktion des *PaCox17*-Gentauschplasmids

### 3.2.1 Prinzipielle Strategie

Ziel dieser Arbeit war die Isolation und Charakterisierung einer *PaCox17*-Nullmutante. Zu diesem Zweck sollte ein Gentausch-Plasmid konstruiert werden, das nach Transformation in *P. anserina* den homologen Gentausch von *PaCox17* vermittelt. Die endogene Kopie von *PaCox17* sollte durch homologe Rekombination zu beiden Seiten des Leserahmens durch die plasmidale Bleocin-Resistenz-Kassette (BRK) ersetzt werden (siehe Abb. 17). Entsprechende Transformanten können durch Selektion auf Medium mit Bleocin selektioniert werden.

Bleocin ist ein Peptid-Antibiotikum, welches die DNA direkt angreift. Bleocin schneidet die DNA-Helix und induziert auf diese Weise Doppel-Strang-Brüche.

Erfahrungsgemäß wird in *P. anserina* nur ein sehr geringer Prozentsatz aller transformierten DNA-Fragmente homolog integriert (Dufour *et al.*, 2000).

Bei der Isolation der *PaCox5::ble*-Mutante wurde lediglich 1/100 aller transformierten, zum Genom homologen DNA-Fragmente homolog integriert (Dufour *et al.*, 2000).

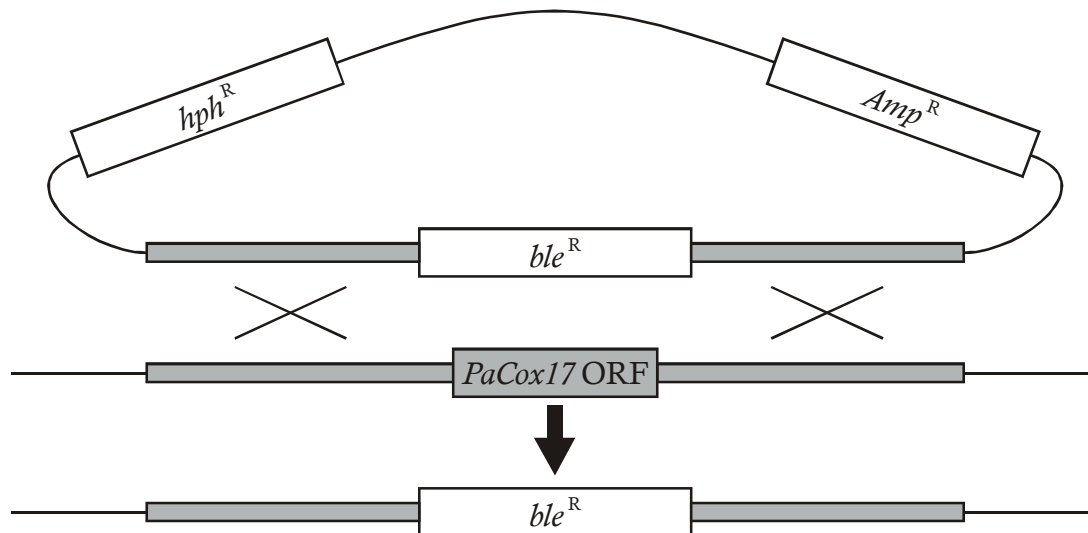
Um *PaCox17*-Mutanten von Transformanten mit ektopisch integriertem Gentausch-Plasmid unterscheiden zu können, wurde eine zweite Stufe der Selektion erdacht, die auf folgenden Voraussetzungen basiert:

- Bei erfolgreichem Austausch des *PaCox17*-ORF durch die BRK würde lediglich die BRK ins Genom integriert werden.
- Das Rückgrat des Gentausch-Plasmids würde nach einigen Zellteilungen verloren gehen, da es in *P. anserina* nicht autonom repliziert würde.

Als zweite Stufe der Selektion sollte eine Hygromycin B-Resistenz-Kassette (HRK) in den bakteriellen Anteil des Gentausch-Plasmids integriert werden (siehe Abb. 17).

Hygromycin B ist ein Antibiotikum, welches die 30S Untereinheit der Ribosomen bindet und so die Translation von mRNA zu Protein unterdrückt.

Bei Austausch des genomischen *PaCox17*-Leserahmens durch die BRK des transformierten Gentausch-Plasmids verbleibt die HRK im bakteriellen Teil des Gentausch-Plasmids. Da dieses in *P. anserina* nicht frei repliziert und deshalb schnell verloren geht, sollten Transformanten, die durch „Doppel-Crossover“ entstanden sind, Bleocin-resistent und Hygromycin B-sensitiv sein, während die häufiger zu erwartenden, durch „Einzel-Crossover“ entstandenen Transformanten resistent gegen beide Antibiotika sein sollten (siehe Abb. 17).



**Abbildung 17: Schematische Darstellung des homologen Gentauches.** Zwei „Crossover“ ersetzen die genomische Kopie des *PaCox17*-ORF durch die Bleocin-Resistenz-Kassette (*ble<sup>R</sup>*) des Gentauch-Plasmids. Dabei verbleibt die Hygromycin B-Resistenz-Kassette (*hph<sup>R</sup>*) im bakteriellen Rückgrat des Plasmids. „Crossover“ sind durch diagonale Kreuze symbolisiert. Die Ampicillin-Resistenz-Kassette (*Amp<sup>R</sup>*) des Gentauch-Plasmids ist für die Selektion und Klonierung des Plasmids in *E. coli* nötig, für den homologen Gentauch ist sie nicht relevant.

In unteren Teil der Abbildung ist die resultierende genomische Situation der *PaCox17*-Nullmutante dargestellt. Der Leserahmen von *PaCox17* ist durch die Bleocin-Resistenz-Kassette (*ble<sup>R</sup>*) des Gentauch-Plasmids ersetzt.

Das gewünschte Gentauch-Plasmid wurde in einer Reihe von Schritten nach der folgenden Strategie konstruiert:

1. Ersatz des ORF von *PaCox17* in pPaCox17g-1 durch die Bleocin-Resistenz-Kassette. Nach dem Tausch wird die BRK – wie zuvor der ORF von *PaCox17* – von 0,2 kBp 5'- und 4,7 kBp 3'-Bereich flankiert.
2. Integration der zweiten Resistenz-Kassette (Hygromycin B) in das bakterielle Rückgrat von pPaCox17g-1. Die HRK befindet sich außerhalb der *PaCox17*-Flanken, verbleibt bei Austausch des *PaCox17*-Leserahmens durch „Doppel-Crossover“ im Plasmid und geht bei Regeneration von transformierten Sphäroplasten zu Myzelien verloren (fehlende freie Replikation des Plasmids in *P. anserina*).
3. Integration der 2,4 kBp langen 5'-Flanke von *PaCox17* aus Plasmid pPaCox17g-2 in das Gentauch-Plasmid.

### 3.2.2 Deletion des *PaCox17*-Leserahmens

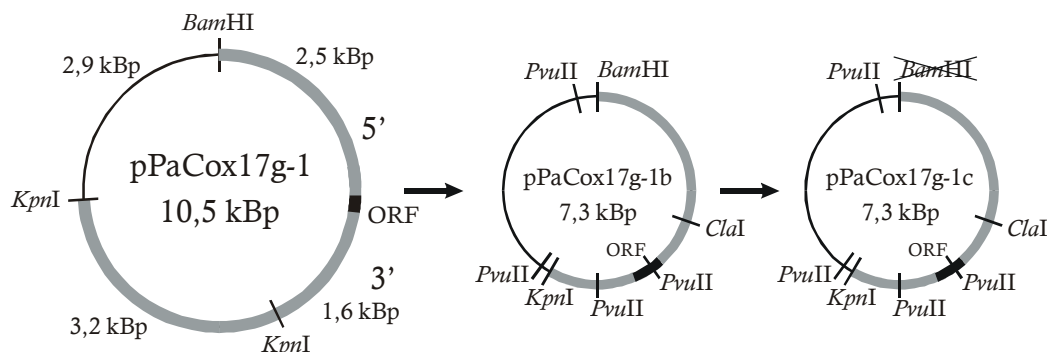
Vor der Durchführung der beschriebenen Klonierungs-Strategie musste das relativ große (10,5 kBp) Ausgangsplasmid pPaCox17g-1 zunächst verkürzt werden, um so den Einbau der zwei Resistenz-Kassetten zu ermöglichen. Die Verkleinerung erfolgte durch Entfernung eines 3,2 kBp langen Fragments, das lediglich den fernen 3'-Bereich von *PaCox17* enthielt. Dazu wurde pPaCox17g-1 mit dem Restriktionsenzym *KpnI* geschnitten, religiert und in *E. coli* transformiert. Die plasmidale DNA vermutlich positiver Transformanten wurde isoliert und

mittels zweier Testrestriktion (*ClaI* und *KpnI* bzw. *PvuII*) mit anschließender Gel-Elektrophorese überprüft (siehe Methoden, siehe Abb. 18).

Bei der Restriktion positiver Plasmid-Klone mit *ClaI* (Position -535) und *KpnI* (Position +1993) werden Fragmente der Länge 2,5 kBp und 4,8 kBp erwartet. Bei der Restriktion mit *PvuII* zeichnen sich positive Plasmid-Klone durch Fragmente von 2,5 kBp (pBSSK-Rückgrat), 2,9 kBp (*PaCox17*-5'-Flanke), 1,0 kBp (Teil ORF und Teil 3'-Flanke *PaCox17*) und 1,0 kBp (Teil *PaCox17*-3'-Flanke) aus. Mehrere positive Klone wurde identifiziert.

Im resultierenden 7,3 kBp langen Plasmid (pPaCox17g-1b) folgt dem Leserahmen von *PaCox17* eine 1,6 kBp lange 3'-Sequenz. Für die weiteren Klonierungs-Schritte war es nötig, die *BamHI*-Schnittstelle aus pPaCox17g-1b zu entfernen. Dazu wurde das Plasmid mit *BamHI* linearisiert, anschließend wurden die versetzt geschnittenen Enden mittels Klenow-Polymerase aufgefüllt und religiert. Das Ligat wurde in *E. coli* transformiert (siehe Methoden). Das resultierende Plasmid pPaCox17g-1c wurde durch Restriktion mit *BamHI* und *ClaI* bzw. *BamHI* und *PvuII* verifiziert (siehe Abb. 18).

Bei der Restriktion positiver Plasmid-Klone mit *ClaI* (Position -535) und *BamHI* (ehemals an Position +2,5 im pBSSK-Rückgrat) wird – bei erfolgreicher Deletion der *BamHI*-Schnittstelle – lediglich ein Fragment von 7,3 kBp erwartet, da *ClaI* pPaCox17g-1c linearisiert. Bei der vergleichenden Restriktion von pPaCox17g-1c mit *PvuII* bzw. *PvuII* und *BamHI* wurden identische Fragmentmuster erwartet (siehe zuvor). Lediglich die Negativ-Kontrolle pPaCox17g-1b wies anstatt eines 2,9 kBp Fragments zwei neue Fragment-Spezies von 0,25 kBp und 2,6 kBp auf. Plasmid pPaCox17g-1c wurde mehrfach identifiziert und verifiziert.



**Abbildung 18: Konstruktion der Plasmide pPaCox17g-1b und pPaCox17g-1c.** Plasmid pPaCox17g-1 wurde mit *KpnI* geschnitten und anschließend religiert, dadurch wurde das 3,2 kBp *KpnI*-Fragment aus dem Plasmid entfernt. Das resultierende Plasmid pPaCox17g-1b wurde mit *BamHI* linearisiert, die versetzten Enden der *BamHI*-Schnittstelle wurden mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend religiert. Das Plasmid ohne *BamHI*-Stelle wurde pPaCox17g-1c benannt und verifiziert. Dünner schwarzer Kreisbogen: pBSSK-Rückgrat; dicker schwarzer Bogen: *PaCox17*-ORF; dicke graue Bögen: 5'- bzw. 3'-Flanke von *PaCox17*. Für Konstruktion und Verifizierung der Plasmide relevante Schnittstellen sind angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

Im nächsten Schritt sollte der ORF von *PaCox17* deletiert werden, dazu mussten zuerst passende Schnittstellen eingeführt werden. Dies geschah mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die verwendeten Oligonukleotide weisen in ihrem 5' Bereich Fehlpaarungen auf, die zur Einführung von Schnittstellen geeignet sind. Dabei enthält das Oligonukleotid CB eine *BamHI*-Stelle und Oligonukleotid CN eine *NheI*-Stelle. Beide Oligonukleotide sind so angeordnet, daß sie in 5' → 3' Richtung vom *PaCox17*-ORF weg, in Richtung der Flanken amplifizieren (siehe Abb. 19).

Das Oligonukleotid CN bindet (in 5' → 3' Richtung) bezüglich des *PaCox17*-ORF von Position –156 bis –133 (inklusive), CB bindet von Position +409 bis +429 (inklusive). Eine PCR mit den Oligonukleotiden CB und CN würde also das gesamte Plasmid pPaCox17g-1c, mit Ausnahme des ORF von *PaCox17*, amplifizieren. Aufgrund der hohen Größe eines derartigen Amplifikats (etwa 7 kBp Plasmid-Rückgrat) schien es sinnvoller nur die beiden Flanken von *PaCox17* zu amplifizieren. Die Länge dieser beiden Amplifikate liegt unter 3 kBp und ist somit unproblematisch.

**BamHI**

CB: 5' TATGGaTcC GATATGGGAT TG 3'

5' TTTCGCGGCG GCTCAGCGGC AATGCTTGGG GGAAA /.../ TA ATATGGTTaC GATATGGGAT TGAAATGGAT  
 3' AAAGCGCCCG CGAGTCGCCG TTACGAAcCC CTTT /.../ AT TATACCAATG CTATACCCTA ACTTTACCTA

CN: 3' GC CGAGTCGCCG TTCGATCgC CC 5'

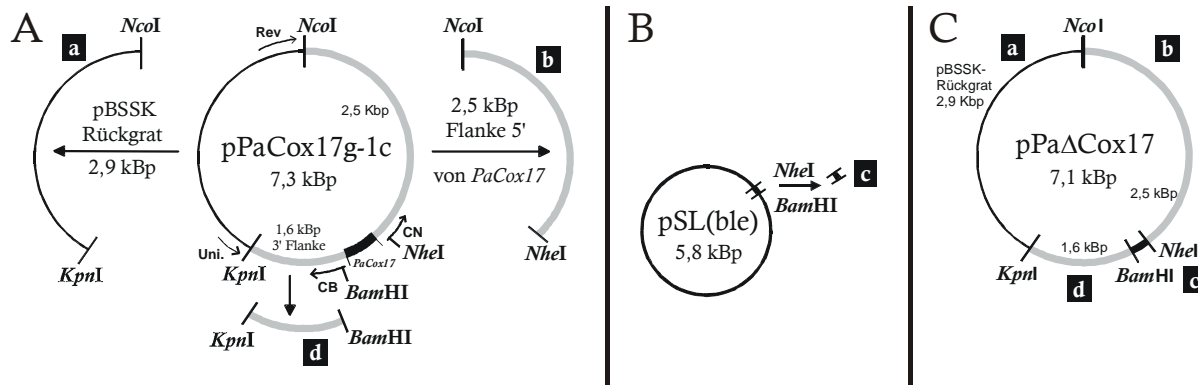
**NheI**

**Abbildung 19: Lokalisation der Oligonukleotide CB und CN.** Die Oligonukleotide CB und CN führen in pPaCox17g-1c eine *Bam*HI-Stelle und eine *Nhe*I-Stelle an je einem Ende des *PaCox17*-ORF ein. Eingeführte Schnittstellen sind unterstrichen. In Kleinbuchstaben dargestellte Basen unterscheiden sich in Oligonukleotiden und genomischer Sequenz.

Durch zwei PCRs sollten die Randbereiche (5'- und 3'-Flanke) von *PaCox17* amplifiziert, und anschließend mittels einer Vier-Fragment-Ligation ins ursprüngliche Plasmid-Rückgrat zurück kloniert werden. Im resultierenden Plasmid pPaΔCox17 sollte der *PaCox17*-ORF durch ein kurzes Verbindungsstück (Linker) ersetzt werden.

Der 5'-Bereich von *PaCox17* wurde mit den Oligonukleotiden „Reverse“ und CN amplifiziert, dabei führt CN eine *Nhe*I-Schnittstelle ein. Der 3'-Bereich wurde mit der Oligonukleotid-Kombination „Universal“ (M 13) und CB amplifiziert, welches eine *Bam*HI-Schnittstelle einführte (siehe Abb. 19, 20). Die amplifizierten Bereiche wurden mit den sie begrenzenden Restriktionsenzymen geschnitten, um sie mit dem ehemaligen Rückgrat – Teil des Plasmids pPaCox17g-1c – und einem kurzen Linker ligieren zu können (siehe Abb. 20). Der 104 Bp lange Linker wurde durch Restriktion des Plasmids pSL(ble) mit *Bam*HI und *Nhe*I erzeugt (siehe Methoden). pPaΔCox17 wurde aus vier Fragmenten zusammengesetzt:

1. Der 5'-Bereich von *PaCox17* in Plasmid pPaCox17g-1c wurde durch PCR amplifiziert (Oligonukleotide „Reverse“ und CN) und anschließend mit *Nco*I und *Nhe*I geschnitten (Abb. 20, Fragment **b**).
2. An die *Nco*I-Stelle des PCR Produktes der 5'-Flanke wurde das durch Restriktion mit *Nco*I und *Kpn*I erhaltene Rückgrat des Plasmids pPaCox17g-1c ligiert (Abb. 20, Fragment **a**).
3. An das *Kpn*I-Ende des pPaCox17g-1c-Rückgrats wurde die 3'-Flanke von *PaCox17* kloniert. Diese wurde durch PCR (Oligonukleotide „Universal“ und CB) von Plasmid pPaCox17g-1c amplifiziert und anschließend mit *Kpn*I und *Bam*HI geschnitten (Abb. 20, Fragment **d**).
4. Ein durch *Nhe*I und *Bam*HI aus pSL(ble) geschnittener Linker schließt das so konstruierte Plasmid (Abb. 20, Fragment **c**).



**Abbildung 20: Deletion des Leserrahmens von *PaCox17*.** Ausgehend von Plasmid pPaCox17g-1c (A) wurden drei Teilfragmente isoliert. Diese drei Teilfragmente **a**, **b** und **d** wurden mit einem kurzen Verbindungsstück [Teilfragment **c** aus Plasmid pSL(ble)] ligiert (B), um pPaΔCox17 zu konstruieren. Fragment **a** wurde mit *NcoI* und *KpnI* aus pPaCox17g-1c geschnitten. Die Fragmente **b** und **d** wurden mittels PCR von pPaCox17g-1c amplifiziert. Dabei wurde in Fragment **b** durch das PCR-Oligonukleotid CN eine *NheI*-Stelle generiert, in Fragment **d** wurde durch Oligonukleotid CB eine *BamHI*-Stelle eingeführt. Nach PCR Amplifikation wurde Fragment **b** mit *NcoI* und *NheI* geschnitten, Fragment **d** wurde mit *KpnI* und *BamHI* geschnitten. Fragment **c** wurde mit *NheI* und *BamHI* aus pSL(ble) geschnitten, es dient als kurzes Verbindungsstück. Da Fragmente **a**, **b**, **c** und **d** kompatible Ende besitzen, konnte eine Vier-Fragment-Ligation durchgeführt werden, deren Produkt als pPaΔCox17 bezeichnet wird. Bei der Konstruktion von pPaΔCox17 verwendete Schnittstellen sind eingezeichnet.

Zur Konstruktion von pPaΔCox17 wurde die beschriebene Strategie verfolgt. Das Ligat der Vier-Fragment-Ligation wurde in *E. coli* transformiert. Positive Klone wurden durch folgende Restriktions-Analysen bestimmt (siehe Abb. 21):

- Bei der Restriktion von pPaΔCox17 mit *NcoI* und *NheI* werden Fragmente der Länge 2,5 kBp und 4,6 kBp erwartet (Abb. 21B, Spuren 1 und 10). 2,5 kBp-Fragmente entsprechen Fragment **b** der Vier-Fragment-Ligation (siehe Abb. 20). Ein Aliquot des PCR-Produktes **b** wurde als Kontrolle eingesetzt (Abb. 21B, Spur 2).

Um zu zeigen, daß *NcoI* und *NheI* in pPaΔCox17 jeweils nur einmal schneiden wurde pPaΔCox17 zuerst mit *NcoI* geschnitten. Das linearisierte Plasmid zeigte Fragmente von 7,1 kBp Länge (Abb. 21B, Spur 9). Die Restriktion von pPaΔCox17 mit *NcoI* und *NheI* lieferte Fragmente der Länge 2,5 kBp und 4,6 kBp, deren Summe ergibt 7,1 kBp. Daraus kann der Schluss gezogen werden, daß *NheI* in pPaΔCox17 einmal schneidet.

- Die Restriktion von pPaΔCox17 mit *KpnI* und *BamHI* liefert Fragmente der Länge 0,1 kBp, 1,6 kBp und 5,4 kBp erwarten (Abb. 21B, Spur 3). 1,6 kBp Fragmente entsprechen Fragment **d** der Vier-Fragment-Ligation. Ein Aliquot des PCR-Produktes **d** wurde als Kontrolle eingesetzt (Abb. 21B, Spur 2).

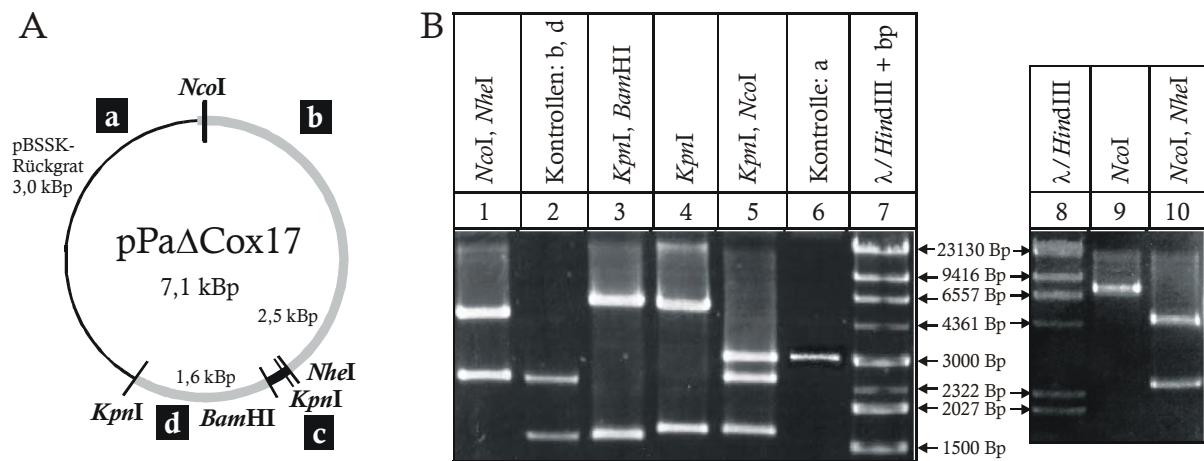
Fragmente von 0,1 kBp Länge sind zu kurz um im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar zu werden. Diese Fragmente gehen auf ein 86 Bp Subfragment (von *KpnI* und *BamHI* geschnitten) des *NheI*, *BamHI*-Linkers (Fragment **c** der Vier-Fragment-Ligation, siehe zuvor) zurück. Zur Kontrolle wurde pPaΔCox17 mit *KpnI* geschnitten (Abb. 21B, Spur 4). Anstelle der 1,6 kBp langen *KpnI*, *BamHI*-Fragmente (**d**) wurden 1,7 kBp lange *KpnI*-Fragmente erwartet (**d** und Teil von **c**; vergleiche Spuren 3 und 4, Abb. 21B). Fragmente mit den erwarteten Längen wurden erhalten, in pPaΔCox17 wurde der ORF von *PaCox17* durch einen 0,1 kBp Linker ersetzt.

- Wird pPaΔCox17 mit *KpnI* und *NcoI* geschnitten, werden drei unterschiedliche Fragment-Spezies erwartet (Abb. 21B, Spur 5). Fragmente von 1,7 kBp entsprechen der 3'-Flanke von *PaCox17* (in Abb. 20, 21: PCR-Fragment **d** und 86 Bp **c**).

Fragmente von 2,5 kBp Länge entsprechen der 5'-Flanke von *PaCox17* (PCR-Fragment **b** und 18 Bp Fragment **c**). Die etwa 3,0 kBp lange Fragment-Spezies stammt vom Rückgrat des Plasmids pPaΔCox17 (Fragment **a** der Vier-Fragment-Ligation) und etwa 0,1 kBp der 5'-Flanke von *PaCox17*. Als Kontrolle wurde Fragment **a** genutzt (Abb. 21B, Spur 6).

Die *NcoI*-Stelle der Plasmide pPaCox17g-1c und pPaΔCox17 liegt etwa 0,1 kBp innerhalb des oberen Endes der 5'-Flanke von *PaCox17*. Dementsprechend hat das Fragment **a** (Abb. 21A) eine Länge von 3,0 kBp und nicht 2,9 kBp, wie aufgrund der Länge des pBSSK-Vektors vermuten werden könnte.

Bei allen durchgeführten Testrestriktionen wurden die erwarteten Fragmente erhalten. Plasmid pPaΔCox17) konnten verifiziert werden.



**Abbildung 21: Restriktions-Analyse des Plasmids pPaΔCox17.** Das durch Vier-Fragment-Ligation ligierte Plasmid pPaΔCox17 wurde mehreren Testrestriktionen unterzogen, um die Integrität der vier Teilfragmente **a**, **b**, **c** und **d** (siehe Text) zu prüfen. Zum Nachweis von Fragment **a** wurde pPaΔCox17 mit *KpnI* und *NcoI* geschnitten (Spur 5). Dieses etwa 3,0 kBp lange Fragment setzt sich aus dem Rückgrat des Plasmids pPaΔCox17 und etwa 0,1 kBp der 5'-Flanke von *PaCox17* zusammen. Als Kontrolle diente ein Aliquot des für die Ligation von pPaΔCox17 eingesetzten Fragments **a** (Spur 6). Fragment **b** wurde durch die Restriktion von pPaΔCox17 mit *NcoI* und *NheI* nachgewiesen (Spuren 1 und 10). 2,5 kBp Fragmente entsprechen Fragment **b** der Vier-Fragment-Ligation. Ein Aliquot des PCR-Produktes **b** wurde als Kontrolle eingesetzt (Spur 2). Der Nachweis von Fragment **c** wurde indirekt geführt. Ein 86 Bp Subfragment von Fragment **c** lässt sich durch *KpnI* und *BamHI* ausschneiden. Werden Restriktionen des Plasmids pPaΔCox17 mit *KpnI* / *BamHI* bzw. *KpnI* verglichen, schneidet *BamHI* am Rand des 1,7 kBp *KpnI*-Fragments, das dadurch auf das 1,6 kBp lange Fragment **d** verkürzt wird (Spuren 3, 4). Fragment **d** wurde durch die Restriktion von pPaΔCox17 mit *KpnI* und *BamHI* nachgewiesen (Spur 3). Dem 1,6 kBp Fragment **d** dient ein Aliquot des PCR-Produktes **d** von Plasmid pPaCox17g-1c als Kontrolle (Spur 2).

### 3.2.3 Integration der Bleocin-Resistenzkassette

In pPaΔCox17 sollte der 104 Bp lange *NheI*, *BamHI*-Linkers durch die BRK ersetzt werden. Das resultierende Plasmid pPaCox17::ble wurde durch folgende Schritte konstruiert:

- pPaΔCox17 wurde mit *BamHI* und *NheI* geschnitten, dadurch wurde der 104 Bp Linker entfernt.
- Die BRK wurde mit *BglII* und *HindIII* aus dem Plasmid pUT703 geschnitten.

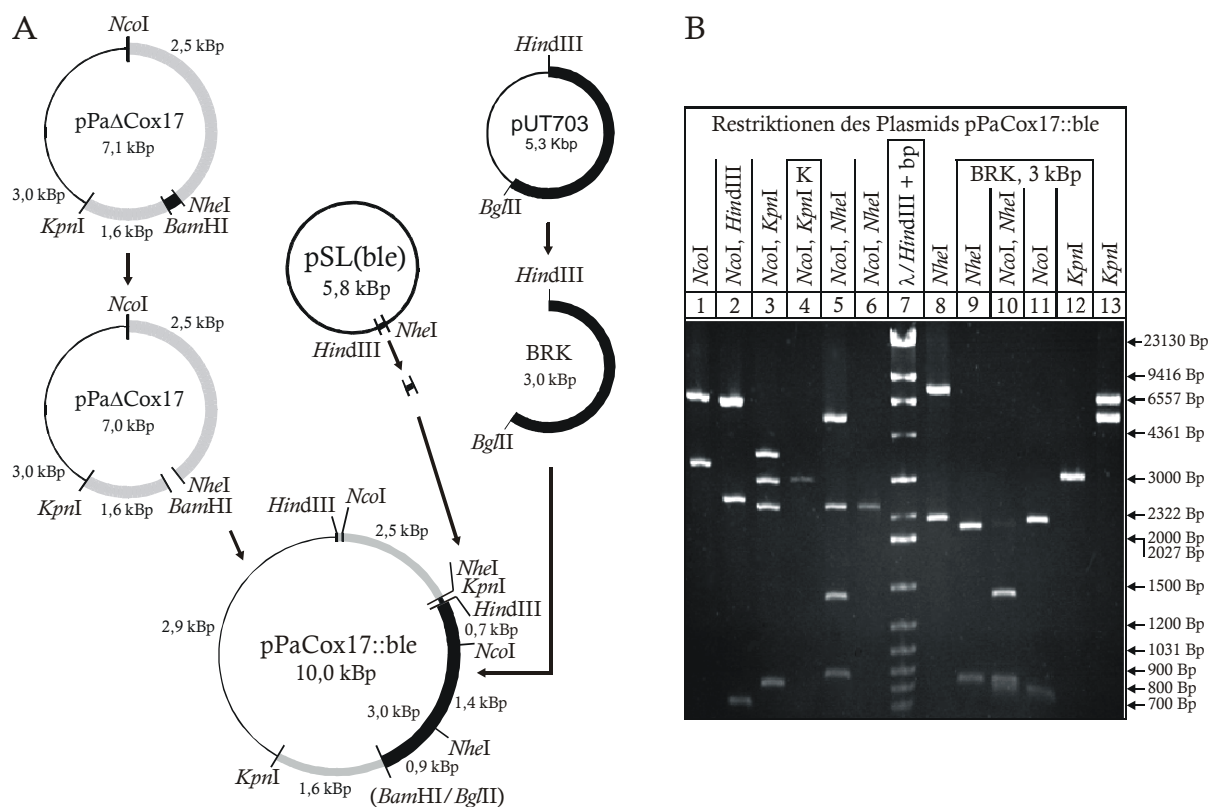
Die BRK des Plasmids pUT703 besitzt neben dem *ble*-ORF einen eigenen Promotor und Terminator. Wird die BRK mit *BglII* und *HindIII* aus pUT703 geschnitten, beträgt ihre Länge 3 kBp (Calmels *et al.*, 1991).

- Aus Plasmid pSL(ble) wurde mit *NheI* und *HindIII* ein 131 Bp langer Linker geschnitten.
- In einer Drei-Fragment-Ligation wurde die BRK (*BglIII* und *HindIII* geschnitten) in pPaΔCox17 (*BamHI* und *NheI* geschnitten) eingesetzt. Dabei wurde das *BamHI*-Ende von pPaΔCox17 mit dem *BglIII*-Ende der BRK ligiert. Das *NheI*-Ende von pPaΔCox17 und das *HindIII*-Ende der BRK wurden mittels des *NheI*, *HindIII*-Linkers verbunden.

Die BRK befindet sich in pPaCox17::ble zwischen 2,5 kBp 5'-Bereich und 1,6 kBp 3'-Bereich von *PaCox17*. Plasmid pPaCox17::ble wurde durch Testrestriktionen verifiziert (siehe Abb. 22). Als Kontrollen wurden das Plasmid pPaCox17g-1c und die 3 kBp lange, mit *BamHI*- und *HindIII*-geschnittene, BRK verwendet. Die Spurangaben im folgenden Absatz beziehen sich auf Abb. 22, wenn nicht anders angegeben:

- pPaCox17::ble wurde mit *NcoI* geschnitten (Spur 1), das je einmal im pPaΔCox17-Rückgrat (vergl. Abb. 21) und der BRK (Spur 11) schneidet. Erwartete Fragmente haben eine Länge von 6,9 kBp und 3,3 kBp. Wird pPaCox17::ble zusätzlich mit *HindIII* geschnitten (zwei Schnittstellen), werden vier Fragment-Spezies erhalten (Spur 2): 6,9 kBp; 2,6 kBp; 0,7 kBp und 0,1 kBp.
- Die Restriktion von pPaCox17::ble mit *NcoI* und *KpnI* (jeweils zwei Stellen; vergl. Spuren 1, 13) produziert Fragmente mit vier unterschiedlichen Längen (Spur 3): 3,9 kBp; 3,0 kBp; 2,5 kBp und 0,9 kBp. Das mit *NcoI* und *KpnI* aus pPaCox17g-1c geschnittene 3,0 kBp Fragment wurde als Kontrolle in Spur 4 aufgetragen.
- Bei der Restriktion von pPaCox17::ble mit *NcoI* und *NheI* (jeweils zwei Stellen; vergl. Spuren 1, 8) werden vier Fragment-Spezies erwartet (Spur 5): 5,5 kBp; 2,5 kBp; 1,4 kBp und 0,9 kBp. Als Kontrolle zu den Fragmenten von 2,5 kBp Länge wurde in Spur 6 Fragment **b** aufgetragen.
- In den Spuren 9-12 wurde die zur Konstruktion von pPaCox17::ble verwendete 3 kBp lange BRK mit mehrere Enzymen geschnitten, um ihre Integrität zu prüfen.





**Abbildung 22: Konstruktion und Verifizierung des Plasmids pPaCox17::ble.** (A) Zur Konstruktion des Plasmids pPaCox17::ble wurde pPaΔCox17 mit *BamHI* und *NheI* geschnitten, dieser Schritt entfernte den *BamHI*, *NheI*-Linker. Zwischen die *BamHI*- und *NheI*-Enden von pPaΔCox17 wurde anschließend die, mit *BglII* und *HindIII* aus pUT703 geschnittene, BRK ligiert. Das *BamHI*-Ende von pPaΔCox17 und das *BglII*-Ende der BRK sind kompatibel. Zwischen das *NheI*-Ende von pPaΔCox17 und das *HindIII*-Ende der BRK wurde ein kurzer *NheI*, *HindIII*-Linker ligiert. (B) Zur Verifizierung von pPaCox17::ble wurde das Plasmid einer Reihe von Restriktionen unterzogen (Spuren 1-3, 5, 6, 8 und 13). Als Kontrollen diente das mit *NcoI* und *KpnI* aus pPaCox17g-1c geschnittene pBSSK-Rückgrat (Spur 4) und die 3 kBp lange BRK (Spuren 9-12). Als Längenstandard diente ein Gemisch aus  $\lambda$ -DNA (*HindIII* geschnitten) und dem „bp-Marker“ (Spur 7). Die Fragmente wurden entsprechend ihrer Länge von oben nach unten aufgelistet: 23130 Bp, 9416 Bp, 6557 Bp, 4361 Bp, 3000 Bp, 2322 Bp, 2000 Bp, 2027 Bp, 1500 Bp, 1200 Bp, 1031 Bp, 900 Bp, 800 Bp und 700 Bp. Weitere Erklärungen siehe Text.

Bei den in Abb. 22 gezeigten Restriktionen wurden jeweils die erwarteten Fragmentlängen erhalten, Plasmid pPaCox17::ble konnte verifiziert werden.

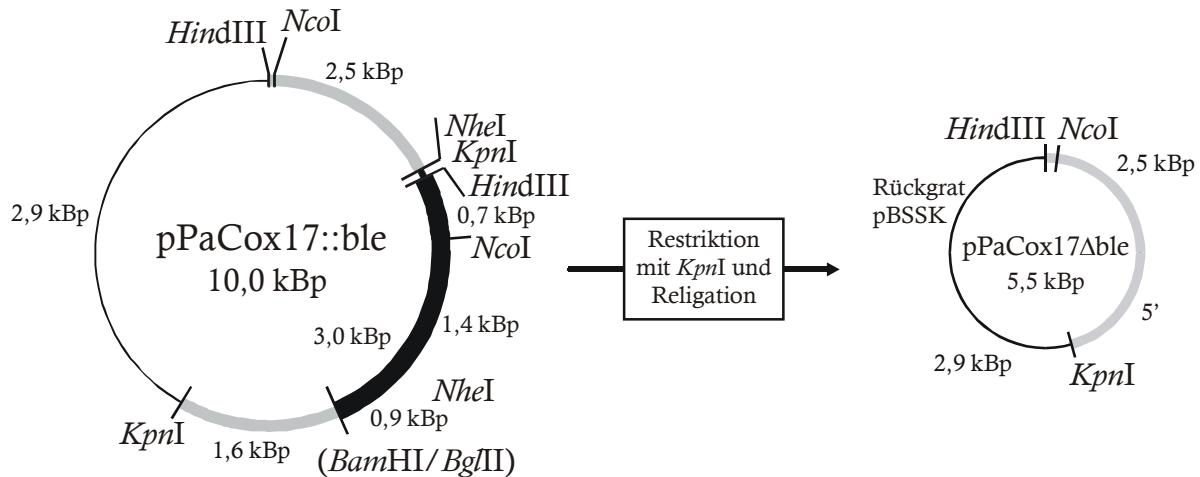
### 3.2.4 Integration der Hygromycin B-Resistenzkassette

Um die Hygromycin B-Resistenz-Kassette (HRK) in den bakteriellen Teil von pPaCox17::ble integrieren zu können, musste in Ermangelung geeigneter Schnittstellen zuerst ein 4,6 kBp langes, von zwei *KpnI*-Stellen begrenztes Fragment entfernt werden. Dieses Fragment sollte nach der Integration der HRK an seine ursprüngliche Stelle, in der selben Orientierung reintegriert werden.

Plasmid pPaCox17::ble wurde mit *KpnI* geschnitten und religiert. Das religierte Plasmid pPaCox17Δble umfasst 5,5 kBp. Es enthält jeweils eine *HindIII*- und eine *NcoI*-Schnittstelle.



pPaCox17::ble enthält mehrere solcher Stellen (siehe Abb. 23). Der pPaCox17 $\Delta$ ble-Klon, der zur weiteren Klonierung ausgewählt wurde, konnte durch mehrere Restriktions-Analysen bestätigt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 23: Konstruktion des Plasmids pPaCox17 $\Delta$ ble.** Zur Konstruktion von pPaCox17 $\Delta$ ble wurde Plasmid pPaCox17::ble mit *KpnI* geschnitten und religiert. Das resultierende Plasmid pPaCox17 $\Delta$ ble besteht aus pBSSK-Rückgrat (dünner schwarzer Bogen) und der 5'-Flanke von *PaCox17* (dicker grauer Bogen). Weitere Erklärungen siehe Text.

Nach der Deletion des *KpnI*-Fragments wurde in den bakteriellen Teil des Plasmids pPaCox17 $\Delta$ ble die 4 kBp lange HRK des Plasmids pAN7-1 integriert:

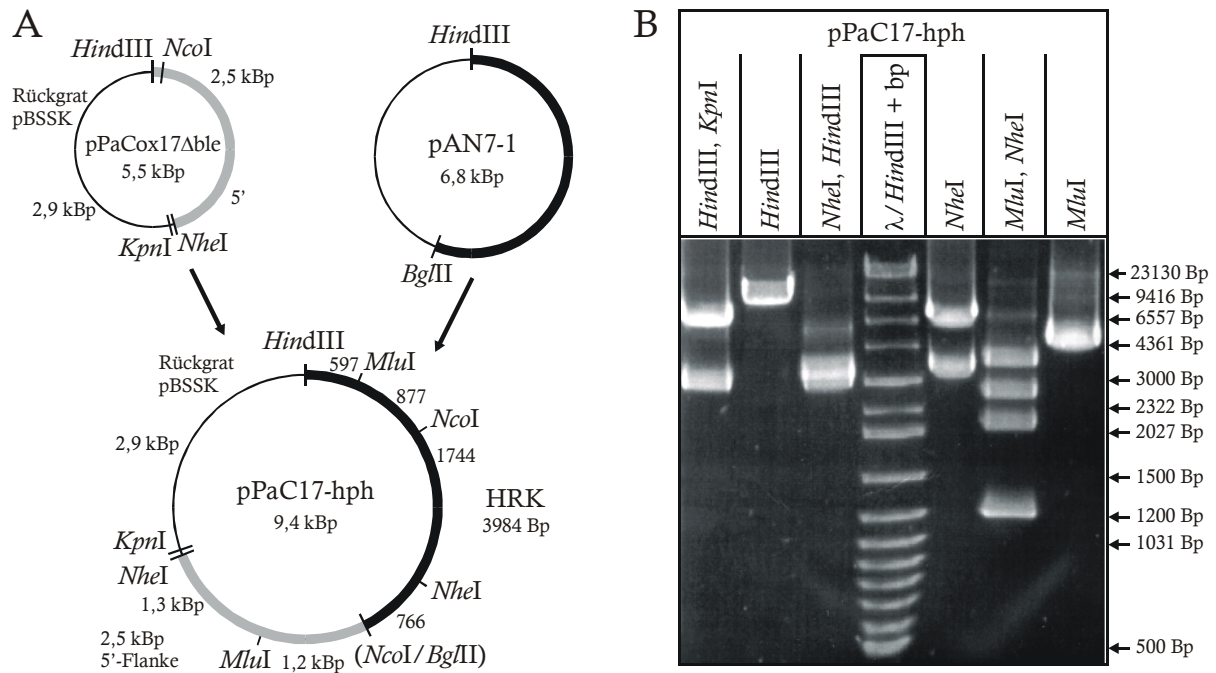
- Plasmid pPaCox17 $\Delta$ ble wurde mit *NcoI* geschnitten. Die 5'-Überhänge beider Enden wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde das linearisierte Plasmid mit *HindIII* geschnitten.  
Durch die Restriktion des Plasmids pPaCox17 $\Delta$ ble mit *NcoI* und *HindIII* werden etwa 0,1 kBp vom 5'-Ende der *PaCox17*-5'-Flanke geschnitten. Das angrenzende pBSSK-Rückgrat wird nicht verändert (siehe Abb. 24).
- Zur Isolation der HRK wurde Plasmid pAN7-1 mit *BglII* geschnitten, die 5'-Überhänge der DNA-Enden wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde mit *HindIII* geschnitten. Die HRK wurde mittels Elektrophorese separiert, aus dem Gel geschnitten und mit dem „Nucleospin“-Kit eluiert (siehe Methoden).
- Das geschnittene pPaCox17 $\Delta$ ble wurde mit der 3984 Bp langen HRK ligiert. Das Ligat wurde in *E. coli* transformiert.

Das resultierende Plasmid pPaC17-hph wurde durch eine Restriktions-Analyse verifiziert (siehe Abb. 24):

- Wird pPaC17-hph mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten, werden Fragmente der Länge 2,9 kBp und 6,5 kBp erwartet. *HindIII* linearisiert das 9,4 kBp lange pPaC17-hph.
- Bei der Restriktion von pPaC17-hph mit *NheI* und *HindIII* werden Fragmente der Länge 3,3 kBp; 3,2 kBp und 2,9 kBp gebildet. Diese drei Banden erscheinen auf dem

Gel als eine einzige prominente Bande. *NheI* allein schneidet pPaC17-hph in Fragmente von 6,1 kBp und 3,3 kBp Länge.

- Plasmid pPaC17-hph hat zwei *MluI*-Stellen, die es in Bereiche von 4,8 kBp und 4,6 kBp teilen. Die Restriktion mit *MluI* und *NheI* (beide schneiden pPaC17-hph zweimal) sollte Fragmente in vier unterschiedlichen Längen produzieren: 3,5 kBp; 2,6 kBp; 2,0 kBp und 1,3 kBp.



**Abbildung 24: Konstruktion des Plasmids pPaC17-hph.** Plasmid pPaC17-hph wurde aus Plasmid pPaCox17Δble und der HRK des Plasmids pAN7-1 zusammengesetzt. Dazu wurde pPaCox17Δble mit *NcoI* geschnitten, die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend mit *HindIII* geschnitten. Plasmid pAN7-1 wurde mit *BglII* geschnitten, mit Klenow-Polymerase geglättet und mit *HindIII* nachgeschnitten. Anschließend wurden jeweils die beiden *HindIII*-Enden bzw. die beiden aufgefüllten Enden von Plasmid pPaC17-hph und der HRK aneinander ligiert.

### 3.2.5 Austausch der *PaCox17* 5'-Flanke

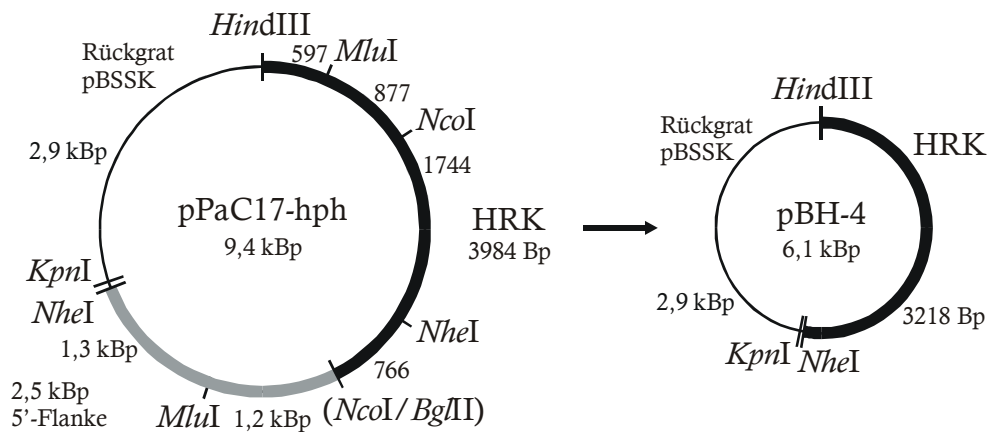
Da die *PaCox17*-5'-Flanke in Plasmid pPaC17-hph zum Genom nicht kolineare Sequenzen enthält (siehe 3.1.1), sollte sie durch die zum Genom kolineare *PaCox17*-5'-Flanke des Plasmids pPaCox17g-2 ersetzt werden. Zuerst musste die bisherige 5'-Flanke aus pPaC17-hph deletiert werden. Da die 5'-Flanke nicht durch zwei Schnittstellen begrenzt ist (siehe Abb. 24), wurde sie als Teil eines größeren Fragments entfernt. Dazu wurde pPaC17-hph mit *NheI* geschnitten und anschließend religiert (siehe Abb. 25). Das deletierte *NheI*-Fragment enthält die nicht kolineare 5'-Flanke und 766 Bp nicht essenzielle Sequenz der HRK.

Die Restriktion von pPaC17-hph mit *NheI* mit anschließender Religation führt zu einer zur erwünschten Deletion der zum Genom nicht kolinearen 5'-Flanke des Gens *PaCox17*. Zum anderen werden auch 766 Bp der HRK deletiert. Diese Sequenzen sind dennoch nicht essenziell: Sie enthalten lediglich den stromaufwärts gelegenen Teil des *gpd*-Promotors des *hph*-Gens der HRK. Der verbleibende Teil des Promotors ist mit 1,4 kBp lang genug, um funktionell zu bleiben. Die Funktionalität eines weniger als 1,4 kBp langen *gpd*-Promotors wurde zuvor in *P. anserina* durch die Expressionsanalyse des Plasmids pRP51-5 gezeigt (Ridder und Osiewacz, 1992).

Die Deletion des 3,3 kBp langen *NheI*-Fragments aus pPaC17-hph führte zu Plasmid pBH-4, das durch zwei Restriktionen verifiziert wurde:

- Die Linearisierung von pBH-4 mit *NheI* läßt Fragmente von 6,1 kBp erwarten.
- Bei der Restriktion von pBH-4 mit *HindIII* und *KpnI* werden Fragmente von 2,9 kBp und 3,2 kBp Länge erwartet.

Plasmid pBH-4 konnte durch beide Restriktions-Analysen belegt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 25: Konstruktion des Plasmids pBH-4.** Plasmid pPaC17-hph (links) wurde mit *NheI* geschnitten und anschließend religiert. Das 3,3 kBp lange *NheI*-Fragment, auf dem sich in pPaC17-hph die 5'-Flanke (dicker, grauer Bogen) und ein Teil der HRK (dicker, schwarzer Bogen) befanden, wird dadurch deletiert. Das resultierende Plasmid pBH-4 (rechts) besteht aus 2,9 kBp pBSSK-Rückgrat und 3,2 kBp HRK (dicker, schwarzer Bogen). Zwischen *NheI* und *KpnI* befindet sich ein kurzer DNA-„Linker“. Weiterer Erklärungen siehe Text.

Nach der Deletion der zum Genom nicht kolinearen *PaCox17*-5'-Flanke, sollte in pBH-4 die *PaCox17*-5'-Flanke aus Plasmid pPaCox17g-2 integriert werden. Dazu boten sich die benachbarten Schnittstellen *KpnI* und *NheI* an. Da die in pPaCox17g-2 enthaltene 5'-Flanke des Gens *PaCox17* an ihren Enden keine kompatiblen Schnittstellen enthält, musste pPaCox17g-2 in mehreren Schritten angepasst werden.

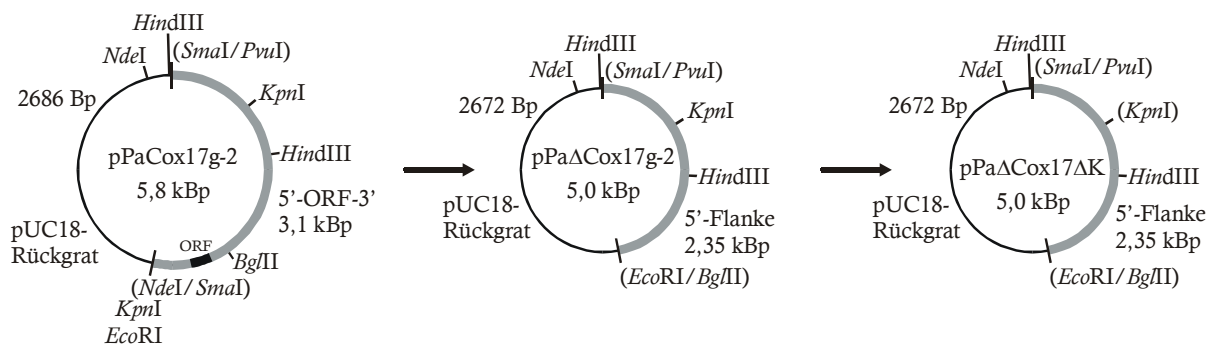
Das in pPaCox17g-2 klonierte genomische Fragment enthält neben 2,5 kBp 5'-Bereich auch den ORF von *PaCox17* (s. Abb. 11). Um den ORF von *PaCox17* zu entfernen, wurde pPaCox17g-2 mit *EcoRI* und *BglII* geschnitten, die Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und anschließend religiert. *EcoRI* schneidet in pPaCox17g-2 nahe des 3'-Endes des genomischen *PaCox17*-Fragments, also unterhalb des ORF von *PaCox17*. *BglII* schneidet 195 Bp oberhalb des ORF von *PaCox17* (siehe Abb. 26). Das resultierende Plasmid pPa $\Delta$ Cox17g-2 enthält etwa 2,35 kBp 5'-Bereich von *PaCox17* (-2550 bis -195; siehe Abb. 13C). Plasmid pPa $\Delta$ Cox17g-2 wurde per Restriktionsanalyse mit *KpnI* und *PvuII* überprüft (siehe Abb. 26), und durch das Fehlen einer charakteristischen 2,3 kBp Bande bestätigt.

Die in pPaCox17g-2 und pPa $\Delta$ Cox17g-2 enthaltenen Teilfragmente des *PaCox17*-Lokus befinden sich in der *SmaI*-Stelle des Vektorrückgrats (pUC18). Diese *SmaI*-Stelle wird von den Bindestellen der PCR-Oligonukleotide „Universal“ und „Reverse“ flankiert. Dementsprechend war es möglich, mittels einer entsprechenden PCR die Länge der im Plasmid-Rückgrat enthaltenen Fragmente zu überprüfen. Dieses Experiment wurde erfolgreich durchgeführt (nicht gezeigt).

Die in pPaΔCox17g-2 ligierte 5'-Flanke von *PaCox17* enthält bei -1,7 kBp eine *KpnI*-Stelle, die spätere Klonierungen gestört hätte. pPaΔCox17g-2 wurde mit *KpnI* linearisiert, die überhängenden Enden wurden mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend ligiert (siehe Methoden).

Dadurch gingen neben der *KpnI*-Stelle auch 4 Bp Sequenz verloren. Da diese 4 Bp etwa 1,7 kBp oberhalb des *PaCox17*-ORF lokalisiert sind, kann nahezu ausgeschlossen werden, daß ihre Deletion die homologe Rekombination, die für den erfolgreichen Gentausch nötig ist, negativ beeinflusst.

Das pPaΔCox17g-2-Derivat, dessen *KpnI*-Stelle entfernt wurde, bekam die Bezeichnung pPaΔCox17ΔK. Die Verifizierung erfolgte durch eine Restriktionsanalyse mit *KpnI* und *NdeI* (nicht gezeigt). Das Plasmid pPaΔCox17ΔK entspricht pPaΔCox17g-2, mit dem Unterschied, daß es keine *KpnI*-Stelle besitzt (siehe Abb. 26).

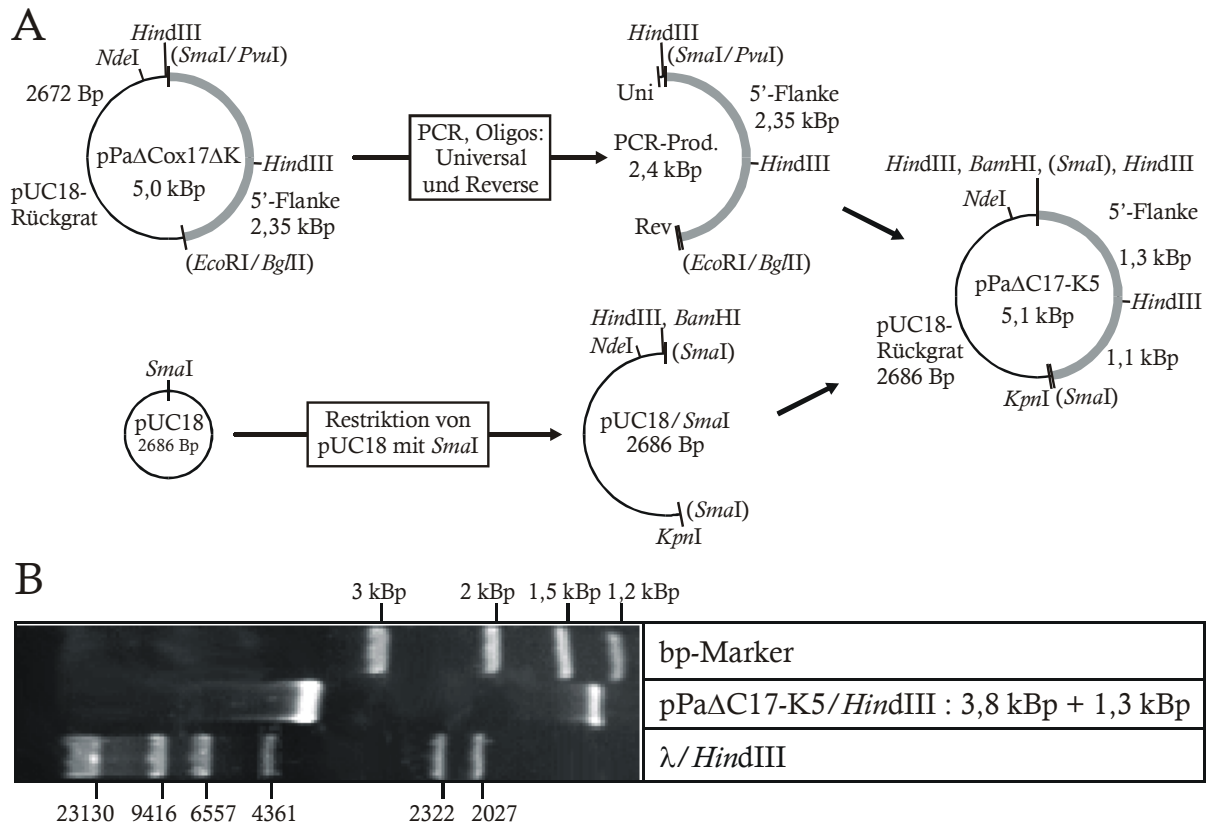


**Abbildung 26: Konstruktion der Plasmide pPaΔCox17g-2 und pPaΔCox17ΔK.** Plasmid pPaCox17g-2 wurde mit *EcoRI* und *BglII* geschnitten, das Plasmid-Rückgrat wurde anschließend religiert. Das so konstruierte Plasmid pPaΔCox17g-2 wurde mit *KpnI* linearisiert, die überhängenden Enden wurden mit Klenow-Polymerase abgebaut und religiert. Dies führte zur Eliminierung der *KpnI*-Stelle im resultierenden Plasmid pPaΔCox17ΔK.

In pPaΔCox17gΔK befindet sich die 2,35 kBp lange 5'-Flanke von *PaCox17* innerhalb der multiplen Klonierungs-Stelle (MCS) des Vektors pUC18. Es stehen dennoch weder eine *KpnI* noch eine *NheI*-Stelle zur Verfügung, um die 5'-Flanke in pBH-4 zu integrieren. Um die 5'-Flanke mit geeigneten Schnittstellen zu versehen, wurde folgende Strategie angewandt:

- Die *PaCox17*-5'-Flanke des Plasmids pPaΔCox17ΔK wurde mittels PCR amplifiziert. Es wurden die Oligonukleotide „Universal“ (M 13) und „Reverse“ verwendet, die die MCS von pPaΔCox17ΔK – und damit auch die enthaltene *PaCox17*-5'-Flanke – begrenzen.
- Das PCR-Amplifikat wurde in die *SmaI*-Stelle des Plasmids pUC18 subkloniert.
- Die Orientierung wurde mittels Restriktionsanalyse mit *HindIII* überprüft. Plasmide, deren PCR-Fragment in gewünschter Orientierung vorlag, zeichneten sich durch 1,3 kBp lange Fragmente aus. Wäre das PCR-Fragment in falscher Orientierung integriert worden, wären 1,0 kBp lange Fragmente ersichtlich (siehe. Abb. 27).

Durch diese Klonierung wurde das stromabwärts gelegene Ende des *PaCox17*-5'-Fragments der *KpnI*-Stelle des pUC18-Plasmid-Rückgrats benachbart. Dieses Plasmid wurde pPaΔC17-K5 benannt (siehe Abb. 27).



**Abbildung 27: Konstruktion und Verifizierung des Plasmids pPaΔC17-K5.** (A) Das Plasmid pPaΔC17-K5 wurde im wesentlichen aus der 5'-Flanke des Gens *PaCox17* und dem Plasmid pUC18 zusammengesetzt. Die 5'-Flanke stammt aus dem Plasmid pPaΔCox17ΔK, sie wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden „Universal“ (Uni) und „Reverse“ (Rev) amplifiziert, die mit wenigen Basenpaaren Abstand zur 5'-Flanke an das Plasmid binden. Das Amplifikat wurde in das, zuvor mit *SmaI* geschnittene, Plasmide pUC18 integriert. (B) Die Integrations-Richtung des PCR-Amplifikats in pUC18 wurde durch eine Restriktion mit *HindIII* belegt. Weitere Erklärungen siehe Text.

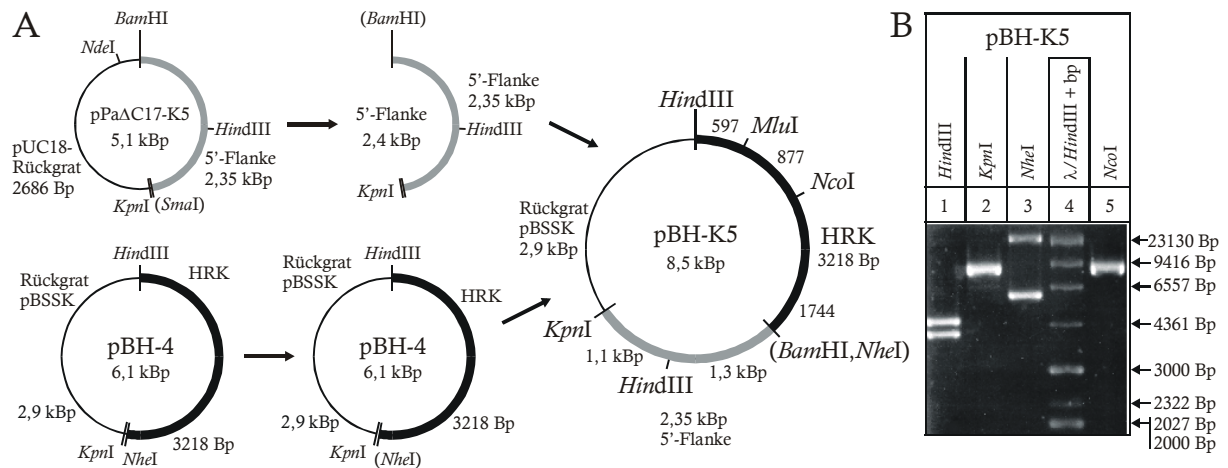
Die in pPaΔC17-K5 enthaltene *PaCox17*-5'-Flanke wurde in das zukünftige Gentausch-Plasmid integriert: Dazu wurde pPaΔC17-K5 mit *BamHI* geschnitten, die DNA-Enden mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend mit *KpnI* geschnitten. Um die 5'-Flanke in pBH-4 integrieren zu können, wurde pBH-4 mit *NheI* geschnitten, mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend mit *KpnI* geschnitten. Das so geschnittene Plasmid pBH-4 und die aus pPaΔC17-K5 geschnittene 5'-Flanke wurden ligiert, wobei die *KpnI*-Stelle erhalten wurde. Das so konstruierte Plasmid wurde als pBH-K5 bezeichnet (siehe Abb. 28A).

Plasmid pBH-K5 wurde durch mehrere Restriktionen überprüft (siehe Abb. 28B):

- Die Restriktionsenzyme *KpnI* und *NcoI* linearisieren pBH-K5 erwartungsgemäß zu Fragmenten von 8,5 kBp.

- Die Restriktion mit *Hind*III erzeugt Fragmente von 3,9 kBp und 4,5 kBp Länge, dies belegt sowohl die Integration als auch die korrekte Integrations-Richtung der *PaCox17*-5'-Flanke aus pPaΔC17-K5.
- Als Negativ-Kontrolle wurde pBH-K5 mit *Nhe*I inkubiert, was zu keiner Restriktion des Plasmids führte. Die *Nhe*I-Stelle wurde durch die Behandlung mit Klenow-Polymerase und die anschließende Ligation an die ebenfalls mit Klenow-Polymerase geglättete *Bam*HI-Stelle aus pBH-K5 entfernt. Die in Abb. 28B, Spur 3 sichtbaren Banden gehen nicht auf Fragmente der Restriktion mit *Nhe*I zurück, denn pBH-K5 enthält keine *Nhe*I-Schnittstelle (Negativ-Kontrolle), es handelt sich um das ungeschnittene Plasmid.

Da das Plasmid ungeschnitten ist, und vermutlich zum Teil in der superspiralisierten Form bzw. in der „genickten“-Form (Einzelstrangbruch) vorliegt, kann von der Position der Banden nicht auf die Länge des Plasmids geschlossen werden.



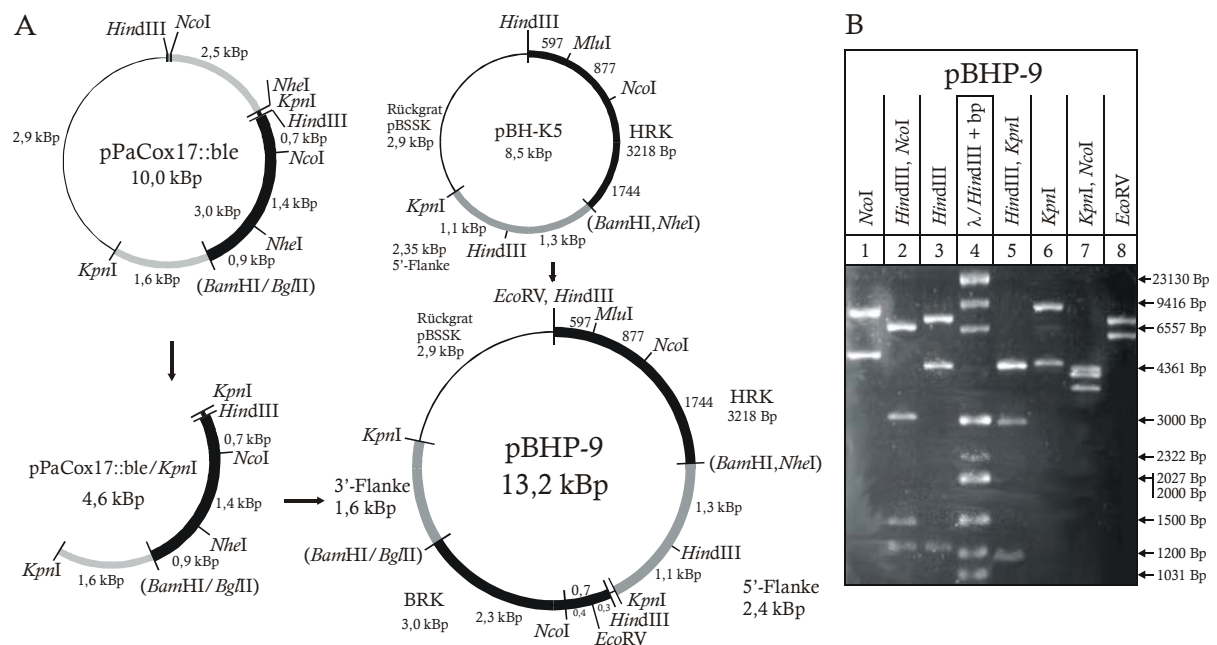
**Abbildung 28: Konstruktion und Restriktions-Analyse des Plasmids pBH-K5.** (A) Das Plasmid pBH-K5 wurde aus der 5'-Flanke des Gens *PaCox17* (aus Plasmid pPaΔC17-K5) und pBH-4 zusammengesetzt. Die 5'-Flanke stammt aus Plasmid pPaΔC17-K5, das zuerst mit *Bam*HI geschnitten, mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend mit *Kpn*I nachgeschnitten wurde. Plasmid pBH-4 wurde mit *Nhe*I geschnitten, mit Klenow-Polymerase geglättet und anschließend mit *Kpn*I nachgeschnitten. In das so vorbereitete pBH-4 wurde die aus pPaΔC17-K5 geschnittene 5'-Flanke integriert. (B) Das resultierende Plasmid pBH-K5 wurde durch mehrere Restriktionen belegt. *Hind*III teilt pPaΔC17-K5 in Fragmente von 3,9 kBp und 4,5 kBp (Spur 1). Die Restriktion mit *Kpn*I (Spur 2) und *Nco*I (Spur 5) linearisiert pBH-K5 erwartungsgemäß. Lediglich die Restriktion mit *Nhe*I führt zu keiner Spaltung des Plasmids (Spur 3), da die *Nhe*I-Stelle bei der Konstruktion von pBH-K5 zerstört wurde. In Spur 4 ist der Längen-Standard aufgetragen, ein Gemisch aus *Hind*III geschnittener DNA des Phagen λ und bp-„Marker“. Weitere Erklärungen siehe Text.

Zur Fertigstellung des Gentauch-Plasmids wurde im letzten Schritt ein 4,6 kBp langes *Kpn*I-Fragment in die *Kpn*I-Stelle von pBH-K5 integriert, bei dem es sich um das selbe Fragment handelt, das zuvor aus pPaCox17::ble geschnitten wurde (siehe 3.2.4). Eine entsprechende Ligation wurde durchgeführt, das Ligat in *E. coli* transformiert und Transformanten mittels einer *Kpn*I-Restriktion überprüft. Das resultierende Plasmid wurde pBHP-9 benannt. Es entspricht pBH-K5, mit dem Unterschied, daß es zwischen pBSSK-Rückgrat und *PaCox17*-5'-Flanke die BRK und den 3'-Bereich von *PaCox17* enthält. Das Gentauchplasmid pBHP-9



eignet sich prinzipiell zum homologen Gentausch von *PaCox17*. Es wurde ausführlich durch mehrere Restriktions-Analysen überprüft (siehe Abb. 29B). Im folgenden Absatz beziehen sich alle Spurnummern auf Abbildung 29B. Im einzelnen wurden folgende Restriktionen durchgeführt:

- Die Restriktion des Plasmids pBHP-9 mit *NcoI* sollte laut Plasmid-Karte (s. Abb. 29A) Fragmente der Länge 4,9 kBp und 8,3 kBp produzieren (s. Abb. 29B, Spur 1).
  - Wird pBHP-9 mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NcoI* geschnitten (Spur 2), werden Fragmente von 0,7 kBp; 1,2 kBp; 1,5 kBp; 3,0 kBp und 6,8 kBp erwartet.
  - Die Restriktion mit *HindIII* (Spur 3) erzeugt 1,2 kBp; 4,5 kBp und 7,5 kBp Fragmente.
  - Wird pBHP-9 mit *KpnI* und *HindIII* geschnitten (Spur 5), werden Fragmente von 0,1 kBp; 1,1 kBp; 2,9 kBp; 4,5 kBp und 4,6 kBp Länge erwartet.
- Die Fragmente der Länge 4,5 kBp und 4,6 kBp sind im Gel als eine prominente Bande erkennbar.
- Bei der Restriktion von pBHP-9 mit *KpnI* (Spur 6) werden Fragmente der Länge 4,7 kBp und 8,5 kBp erwartet.
  - Wird Plasmid pBHP-9 mit *KpnI* und *NcoI* (Spur 7) geschnitten, werden 0,8 kBp; 3,9 kBp; 4,1 kBp und 4,4 kBp lange Fragmente erwartet.
  - Schließlich wurde Plasmid pBHP-9 mit *EcoRV* geschnitten. *EcoRV* teilt pBHP-9 in Fragmente von 6,0 kBp und 7,2 kBp Länge.



**Abbildung 29: Konstruktion und Verifizierung des Gentauch-Plasmids pBHP-9.** (A) Das Plasmid pBHP-9 wurde aus dem mit *KpnI* linearisierten Plasmid pBH-K5 und dem 4,6 kBp langen *KpnI*-Fragment des Plasmids pPaCox17::ble zusammengesetzt. Dabei enthielt pBH-K5 das bakterielle Rückgrat des Plasmids (pBSSK), die HRK und die *PaCox17*-5'-Flanke. Und das 4,6 kBp lange, mit *KpnI* aus pPaCox17::ble geschnittene Fragment enthielt die BRK und die *PaCox17*-3'-Flanke. Das resultierende Plasmid pBHP-9 wurde anschließend mittels mehrerer Restriktions-Analysen verifiziert (B). Dabei wurden sowohl Integration, als auch Integrations-Richtung des *KpnI*-Fragments geprüft. Weitere Erklärungen siehe Text.

Bei allen durchgeführten Restriktionen des Plasmids pBHP-9 wurden lediglich Fragmente der erwarteten Länge erhalten (siehe Abb. 29). Das Gentauch-Plasmid pBHP-9 konnte verifiziert werden.

### **3.3 Isolation der *P. anserina* PaCox17::ble-Mutante**

#### **3.3.1 Transformation von *P. anserina* mit Plasmid pBHP-9**

Nach seiner Konstruktion und Verifizierung wurde des Gentauch-Plasmid pBHP-9 in mehreren unabhängigen Transformationen in Sphäroplasten des Wild-Stammes *s* (Paarungstyp minus) eingebracht. Bei erfolgreicher Rekombination (zwei „Crossing-over“) sollte pBHP-9 die genomische Kopie des *PaCox17*-ORF durch die BRK ersetzen – und so *PaCox17* in *P. anserina* ausschalten.

Der homologe Gentauch bedarf Rekombination sowohl in der genomischen und der plasmidalen 5'-Flanke als auch in der 3'-Flanke. Dadurch wird der chromosomale ORF von *PaCox17* durch die plasmidale BRK ausgetauscht (siehe Abschnitt 3.2.1, Abb. 17).

Neben der Möglichkeit des homologen Gentauches, kann pBHP-9 auch ektopisch (ein „Crossing-over“) integriert werden. Dies ist relativ häufig der Fall, da homologe Rekombination in *P. anserina* ein seltenes Ereignis ist (Dufour *et. al.*, 2000). Ektopische Integration und Rekombination über zwei „Crossing-over“ können durch geeignete Selektionsverfahren diskriminiert werden.

#### **3.3.2 Selektion möglicher PaCox17::ble-Mutanten**

Insgesamt wurden 649 Bleocin-resistente [Bleocin: 6 µg/ml] Primärtransformanten erhalten. Klone, deren *PaCox17*-ORF durch die BRK ersetzt wurde, waren von Interesse. Da die HRK des Plasmids pBHP-9 in entsprechenden Stämmen in pBHP-9 verbleibt, wurde in einem zweiten Schritt auf Hygromycin B-Sensitivität (100µg/ml) selektiert: 93 (14,3%) der Transformanten erwiesen sich als sensitiv und stellten damit potenzielle *PaCox17*-Austauschmutanten dar (vergl. Abb. 17).

Alle 93 Hygromycin B-sensitiven Primärtransformanten wurden durch Southern-Analysen auf den gewünschten Austausch von *PaCox17* durch die BRK untersucht. Dabei ist zu beachten, daß zur Transformation von *P. anserina* sogenannte Sphäroplasten verwendet werden. Dies sind einzelne Zellen, bei denen die Zellwand weitgehend abgebaut ist. Sie können einen, zwei oder mehrere Zellkerne enthalten. Dementsprechend können auch die untersuchten Primärtransformanten homokaryotischer (ein Typ von Zellkernen; nur Kerne mit deletiertem *PaCox17*-ORF) oder dikaryotischer (zwei Typen von Zellkernen; Kerne mit Wildtyp *PaCox17* und Kerne mit deletiertem *PaCox17*-ORF) Natur sein. Diese Situationen



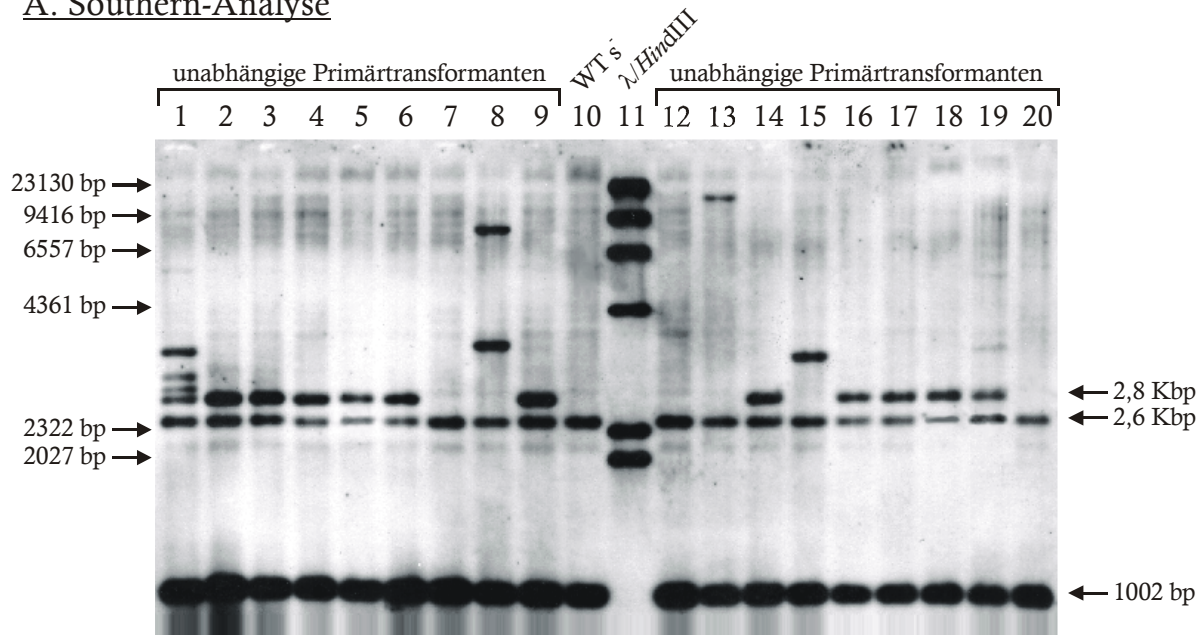
lassen sich durch Southern-Analysen diskriminieren. Gesamt-DNA der Transformanten wurde mit *PvuII* geschnitten und mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert (siehe Methoden).

Folgende Situationen lassen sich unterscheiden:

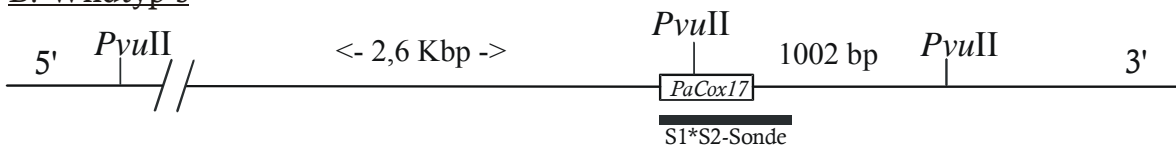
- Beim Wildtyp (Stamm s<sup>-</sup>) erfolgt Hybridisierung der *PaCox17*-ORF-Sonde mit Fragmenten der Länge 1002 Bp und 2,6 kBp (s. Abb. 30, Spur 10).
- Einkernige Sphäroplasten, deren *PaCox17* durch die BRK des Plasmids pBHP-9 ersetzt wurde, sollten zu homokaryotischen Transformanten führen, die anstatt der 1002 Bp und 2,6 kBp langen Fragmente des Wildtyps lediglich hybridisierende Fragmente der Länge 2,8 kBp aufweisen.
- Zwei- bzw. mehrkernige Sphäroplasten, in denen nur in einem Kern ein Gentauch stattgefunden hat, sollten zu dikaryotischen Transformanten führen, die sich durch 1002 Bp, 2,6 kBp und 2,8 kBp lange, hybridisierende Fragmente auszeichnen (s. Abb. 30, Spuren 1-6, 9, 14, 16-19).
- Transformanten, die pBHP-9 heterolog ins Genom integriert haben, weisen neben den Wildtyp-Fragmenten noch weitere nicht näher definierbare hybridisierende Fragmente auf. Die Länge dieser hybridisierenden Fragmente hängt vom Ort der Integration des Plasmids pBHP-9 ab (s. Abb. 30, Spur 1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere derartige Southern-Analysen durchgeführt. Ein ausgewähltes Experiment soll dies exemplarisch verdeutlichen (siehe Abb. 30).

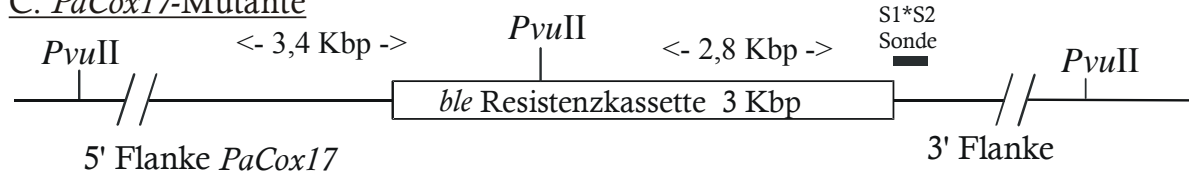
## A. Southern-Analyse



## B. Wildtyp *s*<sup>-</sup>



## C. *PaCox17*-Mutante



**Abbildung 30: Southern-Analyse einiger mit pBHP-9 transformierter Klone.** (A) zeigt die Fotografie einer Southern-Analyse. Neben Wildtyp *s*<sup>-</sup> (Spur 10) wurden 18 mit pBHP-9 transformierte *P. anserina* Klone analysiert (Spuren 1-9, 12-20). Ihre *PvuII*-geschnittene DNA wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Es wurde mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert (dicke, schwarze Balken in B, C). Als Längenstandard wurde mit *HindIII* geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  benutzt (Spur 11). Seine Fragmentlängen sind links neben der Fotografie angegeben. Die relevanten Fragmentlängen der analysierten Klone sind rechts des Fotos angegeben. Transformanten, die pBHP-9 möglicherweise durch „Doppel-Crossover“ integriert haben und damit die gewünschten Transformanten darstellen würden, weisen ein Signal bei 2,8 kBp auf (Spuren 2-6, 9, 14, 16-19; vergleiche C). Der Wildtyp *s*<sup>-</sup> bzw. Transformanten mit Wildtypkernen zeigen Signale bei 1002 Bp und 2,6 kBp (*s*<sup>-</sup>: Spur 10). Die Schemata in (B) und (C) geben Aufschluss über Signale (hybridisierende Fragmente), die *s*<sup>-</sup>-DNA (B) bzw. eine putative *PaCox17*-Nullmutante (C) aufweisen. Fragmente, die in (B) oberhalb und (C) unterhalb der Sonde dargestellt sind, lieferten ein Signal auf dem Röntgenfilm (A). Weitere Erklärungen siehe Text.

Bei allen 93 untersuchten Transformanten waren Fragmente der Länge 1002 Bp und 2,6 kBp nachweisbar. Damit handelte es sich bei diesen Stämmen nicht um homokaryotische *PaCox17*-Mutanten. Ihre Isolation ist offensichtlich nicht trivial.

Möglicherweise ist der Verlust eines funktionsfähigen *PaCox17*-Gens ein letales Ereignis. Dagegen sprechen die Befunde einer französischen Arbeitsgruppe, der die Selektion einer Mutante, in der das kernkodierte Gen für die 5. Untereinheit der COX deletiert ist, gelang. Die Selektion der homokaryotischen Deletions-Mutante war hier nur über eine heterokaryotische Primärtransformante nach Kreuzung und Isolation von monokaryotischen Sporen möglich. Diese Mutante ist lebensfähig und generiert ATP über den alternativen Respirationsweg (Dufour *et al.*, 2000). Nach dem gleichen Prinzip könnte auch die Isolation einer homokaryotischen *PaCox17*-Deletionsmutante möglich sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß PaCOX17 weitere, unbekannte Funktionen essenzieller Natur ausübt.

Eine mögliche dikaryotische Transformante, in der nur in einem Kern *PaCox17* ersetzt wurde, sollte neben den 1002 Bp und 2,6 kBp langen, Wildtyp-spezifischen Fragmenten auch hybridisierende Fragmente der Länge 2,8 kBp aufweisen: Beispiele sind in Abb. 30 in den Spuren 2-6, 9, 14, 16-19 gezeigt. Hierbei könnte es sich also um Transformanten handeln, die neben Wildtyp-Kernen auch Kerne mit ausgetauschtem *PaCox17* enthalten. Allerdings könnten auch Transformanten, die pBHP-9 heterolog integriert haben, ein 2,8 kBp langes hybridisierendes Fragment aufweisen. Eine mögliche dikaryotische *PaCox17*-Mutante lässt sich durch Hybridisierung mit der verwendeten *PaCox17*-ORF-Sonde nicht eindeutig belegen. Zu ihrem Nachweis wurde deshalb eine weitere Sonde verwendet: Sonde *PaCox17*-5' umfasst einen Teil der 5'-Flanke von *PaCox17*. (siehe Abb. 31B).

Zur Herstellung dieser Sonde wurde ein 1 kBp langes Fragment aus pPaCox17g-2 geschnitten. Dieses Fragment liegt zwischen den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Hind*III und *Bgl*III (s. Abb. 11 und 13C). Es erstreckt sich bezüglich des *PaCox17*-ORF von -1,2 kBp bis -195 Bp.

Die *PaCox17*-5'-Sonde erlaubt es, putative heterokaryotische *PaCox17*-Mutanten von Transformanten zu unterscheiden, die pBHP-9 heterolog integriert haben. Vor der Hybridisierung wurden die Membranen nicht gewaschen, um die Signale der ersten Hybridisierung zu erhalten (siehe Methoden). Die 1002 Bp, die 2,6 kBp und die 2,8 kBp Signale sind auf die Hybridisierung mit der *PaCox17*-ORF-Sonde zurückzuführen. Folgende Signale wurden erwartet:

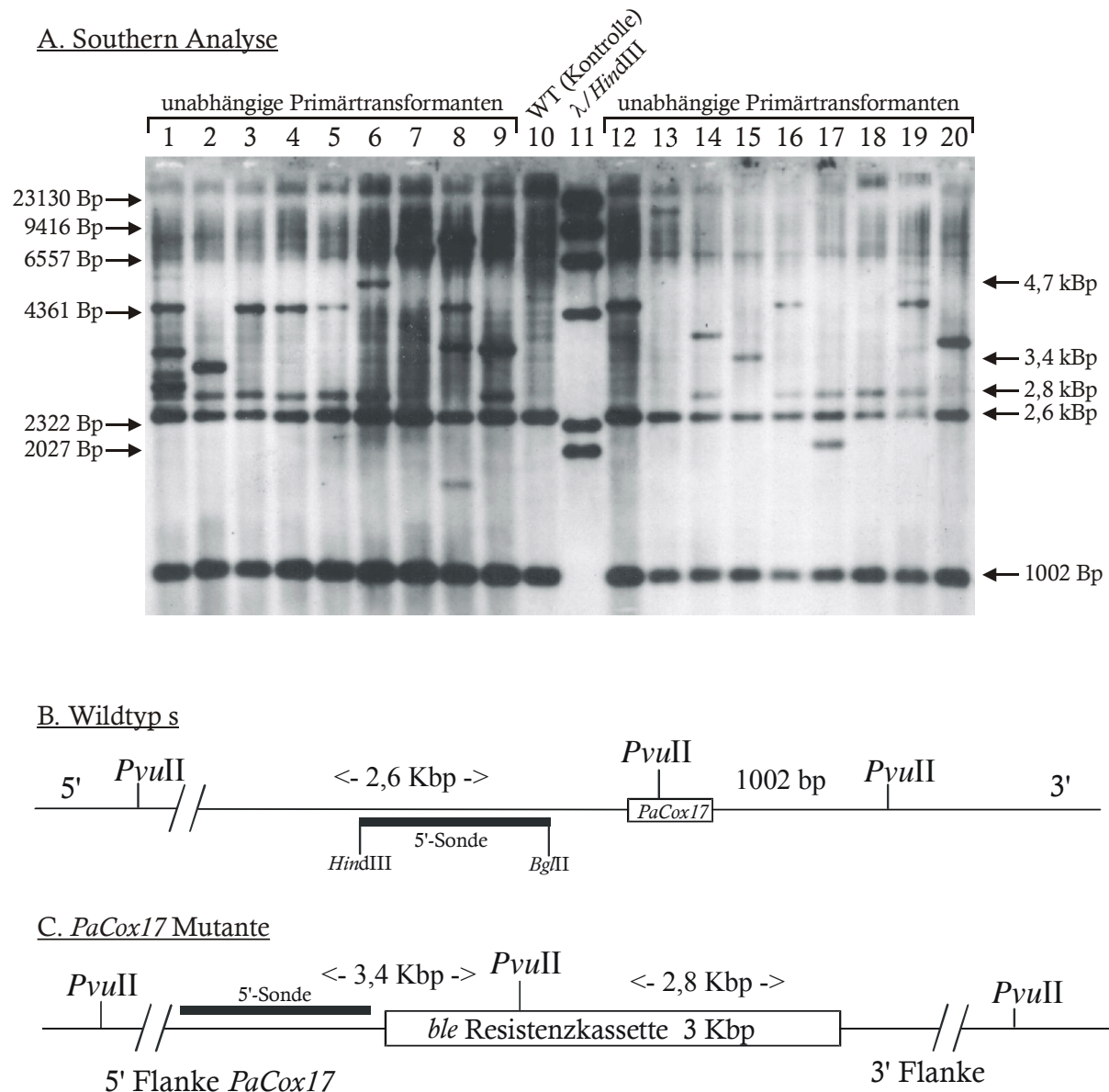
- Wild-Stamm *s* weist hybridisierende Fragmente der Länge 1002 Bp und 2,6 kBp auf (s. Abb. 31B). Die *PaCox17*-5'-Sonde hybridisiert mit Fragmenten der Länge 2,6 kBp.
- Eine homokaryotische Transformante, deren *PaCox17* durch die BRK ersetzt wurde, sollte neben dem alten Signal bei 2,8 kBp (1. Hybridisierung, *PaCox17*-ORF-Sonde), ein zusätzliches Signal bei 3,4 kBp aufweisen (s. Abb. 31C).
- Eine dikaryotische Transformante, die Kerne mit mutiertem *PaCox17* enthält, sollte neben Signalen der vorhergehenden Hybridisierung (1002 Bp, 2,6 kBp und 2,8 kBp) zusätzlich ein Signal bei 3,4 kBp zeigen (s. Abb. 31C).

Aufgrund dieser Unterschiede ist es möglich, dikaryotische Transformanten zu erkennen, die Kerne mit *PaCox17*-Mutation tragen. Trotzdem lässt sich nicht ausschließen, daß eine Transformante, die pBHP-9 heterolog integriert hat, auch zufälligerweise (je nach Integrationsort) ein Signal bei 3,4 kBp aufweist.

Wird ein Plasmid heterolog in das Genom integriert, kann es entweder komplett (eine oder mehrere Kopien) aufgenommen werden, oder es werden nur Bruchstücke eingebaut. Der Ort der Integration ist rein zufällig, da bei der Integration keinerlei oder nur sehr kurze homologe Sequenzen involviert sind. Da es möglich ist, das beliebige Bruchstücke des Plasmids in eine beliebige Stelle des Genoms integriert werden, ist es auch vorstellbar, daß Restriktions-Schnittstellen in beliebigem Abstand zueinander zusammengefügt werden. Bei einer Southern-Analyse, bei der eine Sonde gegen das transformierte Plasmid verwendet wird, können bei heterologer Plasmid-Integration prinzipiell Fragmente beliebiger Länge hybridisieren. Dies ist auch bei Gentauch-Plasmid pBHP-9 der Fall: Die Sonde gegen den 5'-Bereich von *PaCox17* hybridisiert mit dem endogenen und dem 5'-Bereich von *PaCox17*, der durch Transformation eingeführt wurde. Wird ein Bruchstück

von pBHP-9 so ins Genom integriert, daß es in einem bestimmten Abstand zu einer *PvuII*-Stelle platziert wird, können hybridisierende Fragmente der Länge 3,4 kBp entstehen. Die Wahrscheinlichkeit für solch ein Ereignis ist dennoch relativ gering.

Die Unterscheidung von heterologer Integration und Gentauch durch homologes „Doppel-Crossover“ muss für die vorselektionierten Transformanten geklärt werden. Die Fotografie einer Membran, die mit der *PaCox17*-5'-Sonde hybridisiert wurde, verdeutlicht dies (siehe Abb. 31). Die Abbildungen 30 und 31 zeigen Fotos derselben Membran.



**Abbildung 31: Southern-Analyse von Klonen, die mit pBHP-9 transformiert wurden.** (A) zeigt die Fotografie einer Southern-Analyse. Die verwendete Membran wurde im vorhergehenden Experiment mit Sonde *PaCox17*-ORF hybridisiert, entsprechende Signale bleiben erhalten (siehe Abb. 30). Anschließend wurde die Membran mit der *PaCox17*-5'-Sonde hybridisiert (dicke, schwarze Balken in B, C). Neben dem Wildtyp *s*<sup>-</sup> (Spur 10) wurden 18 mit pBHP-9 transformierte *P. anserina*-Klone analysiert (Spuren 1-9, 12-20). Als Längenstandard diente mit *HindIII*-geschnittene  $\lambda$ -DNA. Entsprechende Fragmentlängen sind links neben dem Foto angegeben. Relevante Fragmentlängen der geschnittenen DNA sind rechts angegeben. DNA von Transformanten, die pBHP-9 möglicherweise homolog integriert haben, weisen ein Signal bei 3,4 kBp auf (z.B. Spur 2). Auch bei Transformanten, die pBHP-9 heterolog integriert haben, könnte allerdings zufälligerweise ein solches 3,4 kBp Signal auftreten (z.B. Spur 15). Die Signale bei 1002 Bp und 2,8 kBp sind auf die Hybridisierung mit der *PaCox17*-ORF-Sonde zurückzuführen (vergl. Abb. 30). (B) und (C) geben Aufschluss über Signale (hybridisierende Fragmente), die Wildtyp (B) bzw. eine putative *PaCox17*-Nullmutante (C) aufweisen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Dikaryotische Transformanten mit Austausch des *PaCox17*-ORFs waren durch ein 3,4 kBp langes Fragment gekennzeichnet, welches mit der *PaCox17*-5'-Sonde hybridisierte (s. Abb. 30C). Die in Abb. 31 dargestellte Southern-Analyse zeigte ein solches Signal nur in den Spuren 2 (Transformante T73) und 15. Da Spur 15 dennoch kein 2,8 kBp Signal bei Hybridisierung mit der *PaCox17*-ORF-Sonde zeigte (siehe Abb. 30), schied die entsprechende Transformante aus. Neben Transformante T73 wurden insgesamt sechs weitere Transformanten isoliert, die Signale bei 2,8 kBp und 3,4 kBp zeigen: T28, T39, T49, T53, T63, T73 und T80 (siehe Tab. 15).

**Tabelle 15: Übersicht der mit pBHP-9 transformierten Klone.** Von 649 Bleocin-resistenten Primärtransformanten waren 93 gegenüber Hygromycin B sensitiv. Die DNA dieser Transformanten wurde Southern-Analysen unterzogen (ausgewählte Beispiele: s. Abb. 30 und 31). Sieben Klone wiesen hybridisierende Fragmente der Länge 2,8 kBp und 3,4 kBp auf, und qualifizieren sich dadurch als putative dikaryotische *PaCox17*-Mutante.

<b>Resistent gegen Bleocin</b>	<b>Sensitiv gegen Hygromycin B</b>	<b>3,4 kBp Signal</b>	<i>Anzahl Transformanten</i>
Ja	?	?	649
Ja	Ja	?	93
Ja	Ja	Ja	7

### **Isolation homokaryotischer *PaCox17::ble*-Stämme**

Diese sieben Transformanten wurden mit dem *P. anserina* Stamm s<sup>+</sup>-690765 gekreuzt. Die aus diesen Kreuzungen resultierenden einkernigen Sporen wurden durch Bleocin selektioniert, da *PaCox17*-Mutanten anstelle des *PaCox17*-ORF die BRK enthalten. Bei den resultierenden Sekundär-Transformanten handelte es sich um Myzelien mit nur einem Kerntyp (Homokaryen), die eine Identifizierung der gewünschten *PaCox17*-Nullmutante eindeutig zulassen sollten.

Werden die beiden Paarungstypen (+ und -) von *P. anserina* gekreuzt, werden Asci mit den Ascosporen als Meioseprodukte gebildet. Jeder Ascus beinhaltet normalerweise vier zweikernige Sporen. In seltenen Fällen entstehen auch Asci, die mehr als vier Sporen enthalten. In diesen Fällen, ersetzen jeweils zwei kleinere, einkernige Sporen eine große, zweikernige Spore. Ein Ascus enthält damit vier bis acht Sporen. Einkernige Sporen lassen sich vor allem aufgrund ihrer Größe von zweikernigen Sporen unterscheiden. Sie sind für die Isolation der gesuchten monokaryotischen Deletions-Mutante geeignet, da sie nur einen Kern enthalten. Das Myzel, das von einer derartigen Spore gebildet wird, ist homokaryotisch. Auf diese Weise genetisch „gereinigte“ Transformanten werden als Sekundär-Transformanten bezeichnet.

Die geschilderten Kreuzungen führten nicht zur Isolation einer homokaryotischen *PaCox17*-Mutante. So wurden beispielsweise aus der Kreuzung von T28 und s<sup>+</sup>-690765 22 monokaryotische Sporen isoliert und gekeimt. Das auswachsende Myzel aller Stämme war Bleocin-sensitiv. Parallel durchgeführte Southern-Analysen zeigten, daß es sich bei allen untersuchten Klonen um Wild-Stämme handelte. Die sechs weiteren putativen heterokaryotischen *PaCox17*-Mutanten (T39, T49, T53, T63, T73 und T80) wurden ebenso

wie T28 mit s<sup>+</sup>-690765 gekreuzt. Aus derartigen Kreuzungen stammende monokaryotische Sporen erzeugten homokaryotisches Myzel, daß bei den durchgeführten Southern-Analysen Banden sowohl des Wild-Typs als auch von putativen *PaCox17*-Mutanten aufwies. Da homokaryotische Nachkommen einer Kreuzung eines Heterokaryons (enthält Wild-Typ- und *PaCox17*-Mutanten-Kerne) und des Wild-Stammes nur entweder Wildstämme oder aber Mutanten-Stämme sein können, konnten alle putativen, heterokaryotischen *PaCox17*-Mutanten bis auf T28 ausgeschlossen werden.

Da die Kreuzung von T28 mit s<sup>+</sup>-690765 nicht zur Isolation einer homokaryotischen *PaCox17*-Mutante führte sollte eine andere Strategie beschrrieben werden: Unter der Prämisse, daß T28 sowohl Kerne des Wild-Stammes (Bleocin-sensitiv) als auch Kerne mit Mutation in *PaCox17* (Bleocin-resistent, da *PaCox17*-ORF durch BRK ersetzt) enthält, ließen sich Zellen isolieren, in denen lediglich Kerne mit Mutation in *PaCox17* vorliegen. Um eine Vielzahl einzelner Zellen zu untersuchen, wurde das Myzel des Stammes T28 mit dem Zellwand-abbauenden Enzymgemisch Glucanex behandelt. Die erhaltenen Sphäroplasten wurden auf Medium mit Bleocin selektioniert (siehe Methoden).

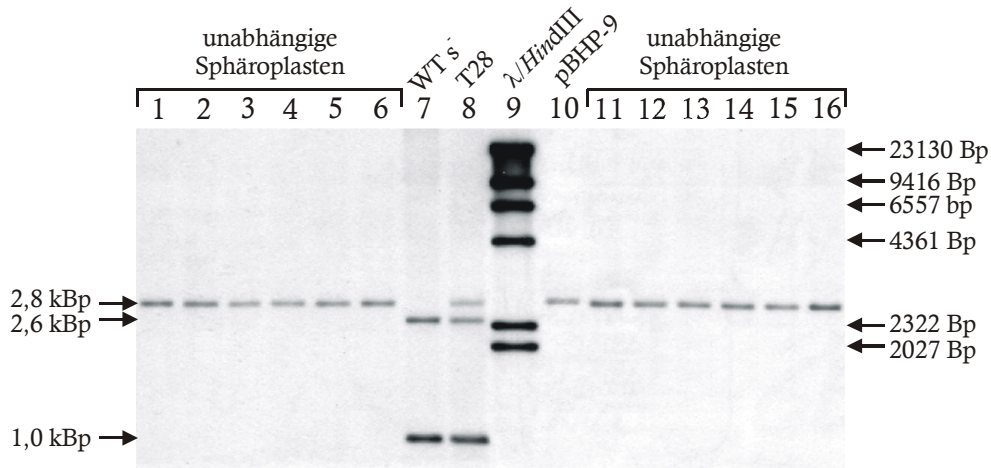
Die hier angewandte Methode des Zellwand-Abbaus zum Zweck der Isolation einzelner Sphäroplasten entspricht der Sphäroplasten-Gewinnung der Transformation von *P. anserina*. Die Selektion mittels Bleocin erfolgt ebenfalls mit stabilisiertem Transformationsmedium (siehe Methoden).

Aus einer Vielzahl Bleocin-resistenter Kolonien wurden 12 willkürlich ausgewählt und durch eine Southern-Analyse untersucht (siehe Abb. 32). Die Restriktion der DNA wurde mit *PvuII* durchgeführt, die Hybridisierung erfolgte mit der *PaCox17*-ORF-Sonde (siehe Methoden). Folgende Situationen werden unterschieden:

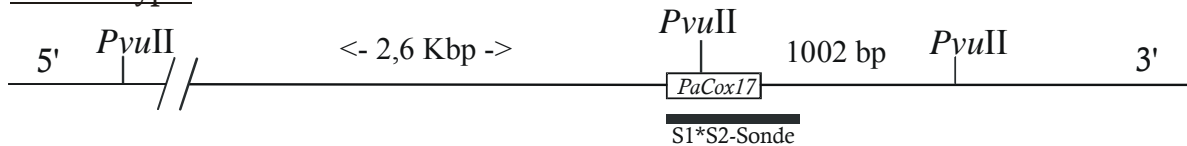
- Bei Wild-Stämmen erfolgt Hybridisierung der *PaCox17*-ORF-Sonde mit Fragmenten der Länge 1002 Bp und 2,6 kBp.
- Einkernige Sphäroplasten, deren *PaCox17* durch die BRK ersetzt wurde, zeigen lediglich hybridisierende Fragmente der Länge 2,8 kBp.

Alle untersuchten Stämme wurden durch das Fehlen von 1002 Bp und 2,6 kBp langen Fragmenten und durch den Nachweis der 2,8 kBp langen, hybridisierenden Fragmente als homokaryotische *PaCox17*-Nullmutanten identifiziert (siehe Abb. 32).

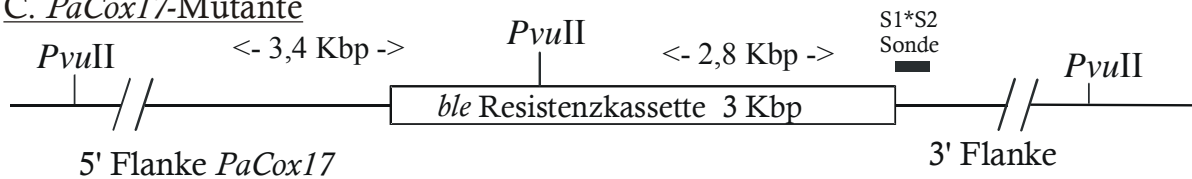
## A. Southern-Analyse



## B. Wildtyp s



## C. PaCox17-Mutante



**Abbildung 32: Southern-Analyse einiger Sphäroplasten von T28.** (A) zeigt die Fotografie einer Southern-Analyse mit *PvuII*. Es wurden 12 Klone analysiert, die auf Sphäroplasten von T28 zurückgehen (von links: *PaCox17::ble*-P1...-P12, Spuren 1-6, 11-16). Ihre *PvuII*-geschnittene DNA wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit der *PaCox17*-ORF-Sonde (Position in B und C durch dicken, schwarzen Balken angegeben). Längensstandard war mit *HindIII* geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  (Spur 9). Seine Fragmentlängen sind rechts neben der Fotografie angegeben. Die relevanten Fragmentlängen der analysierten DNA-Proben sind links angegeben. *PaCox17*-Mutanten (Spuren 1-6, 11-16) und die Positiv-Kontrolle (Plasmid pBHP-9, Spur 10) weisen ein Signal bei 2,8 kBp auf (vergleiche C). Der Wildtyp *s* (Spur 7) zeigt Signale bei 1,0 kBp und 2,6 kBp. Der heterokaryotische Stamm T28 weist die Charakteristika von Wild-Stamm *s* und *PaCox17*-Mutante auf (Spur 8). Die Schemata in (B) und (C) geben Aufschluss über Signale (hybridisierende Fragmente), die Wild-Stamm *s* (B) bzw. die *PaCox17*-Nullmutante (C) zeigen. Fragmente, die in (B) oberhalb und (C) unterhalb der Sonde dargestellt sind, liefern ein Signal auf dem belichteten Film (A). Weitere Erklärungen siehe Text.

### 3.4 Charakterisierung der PaCox17::ble-Mutante

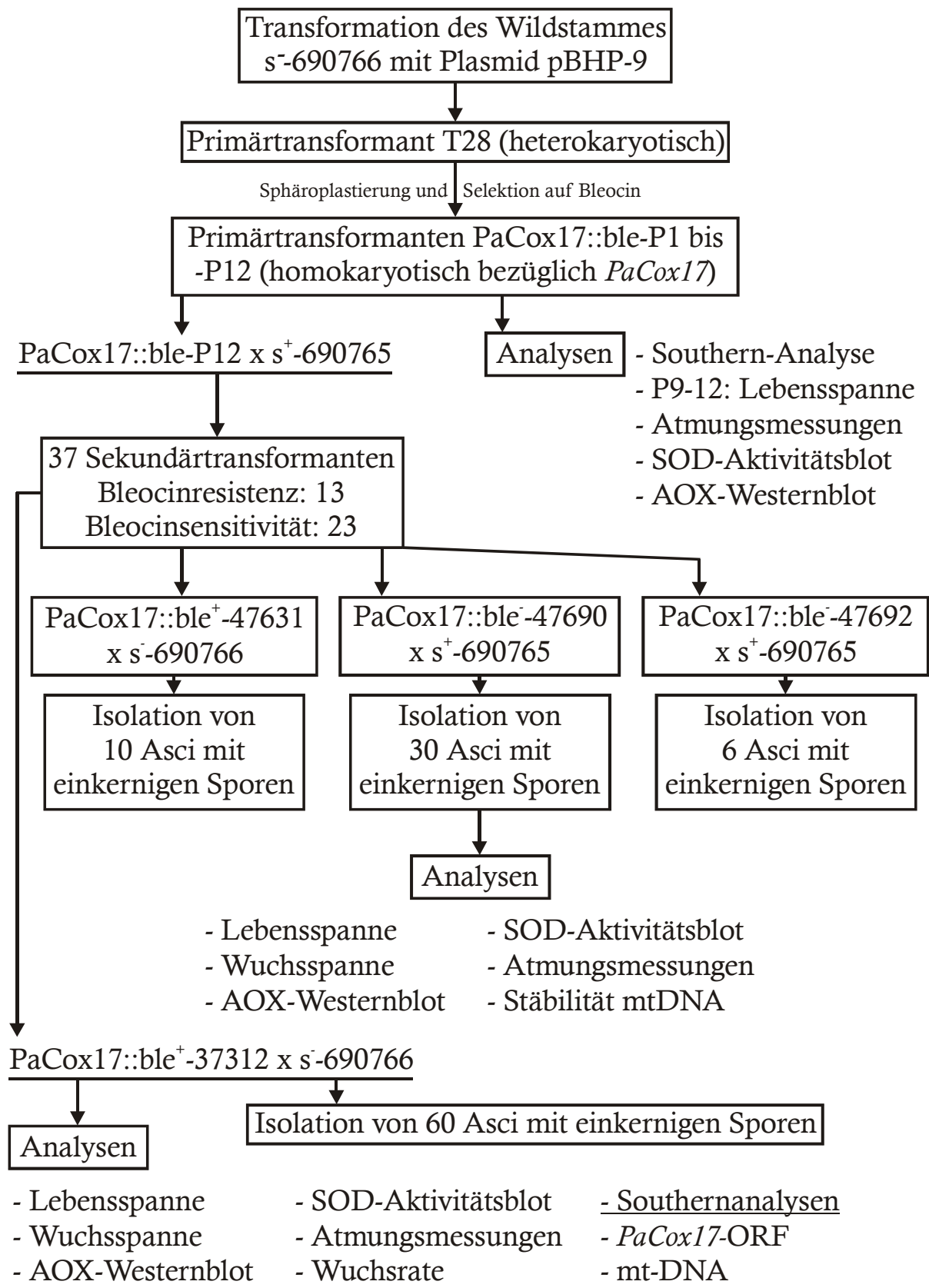
Um die Mutante PaCox17::ble ausführlich zu analysieren, wurden eine Reihe von PaCox17::ble-Stämmen generiert. Ein Stammbaum aller im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen Stämme ist in Abbildung 33 dargestellt (siehe Methoden).

- Der ursprünglich isolierte heterokaryotische Stamm T28 (enthält Wild-Typ- und Mutanten-Kerne) wurde sphäroplastierte (siehe Methoden). Die resultierenden Sphäroplasten wurden auf Bleocin selektioniert und analysiert: Die Primärtransformanten PaCox17::ble-P1..P12 bilden die Ausgangsbasis aller weiteren Analysen.
- Der Stamm PaCox17::ble-P12 wurde mit dem Wild-Stamm  $s^+$ -690765 gekreuzt. Aus dieser Kreuzung stammen die Stämme PaCox17::ble-37312<sup>+</sup>, 47631<sup>+</sup>, 47690<sup>-</sup> und 47692<sup>-</sup>.
- Die Stämme PaCox17::ble-37312<sup>+</sup>, 47631<sup>+</sup>, 47690<sup>-</sup> und 47692<sup>-</sup> wurden mit Wild-Stamm  $s$ -690765<sup>+</sup> bzw. 690766<sup>-</sup> gekreuzt.

Die Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble-37312<sup>+</sup> x  $s^-$ -690766 wurden zur Bestimmung der Lebensspanne angezogen.

Der Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 wurde freundlicherweise von A. Werner zur Verfügung gestellt, er stammt aus der Kreuzung von PaCox17::ble-P12<sup>-</sup> x  $s^+$ -690765.





**Abbildung 33: Stammbaum der Mutante PaCox17::ble.** Nach der Transformation des Wild-Stammes s<sup>-</sup>690766 mit Plasmid pBHP-9 wurde die heterokaryotische Primärtransformante T28 isoliert und sphäroplastiert. Die resultierende Primärtransformante PaCox17::ble-P12 wurde mit Wild-Stamm s<sup>+</sup>690766 gekreuzt. Die daraus resultierenden Nachkommen PaCox17::ble- 37312<sup>+</sup>, 47631<sup>+</sup>, 47690<sup>-</sup> und 47692<sup>-</sup> wurden ihrerseits mit Wild-Stamm s<sup>-</sup>690766<sup>+</sup> oder 690766<sup>-</sup> gekreuzt. Die Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>690766 wurden zur Bestimmung der Lebensspanne verwendet. Weitere Erklärungen siehe Text.

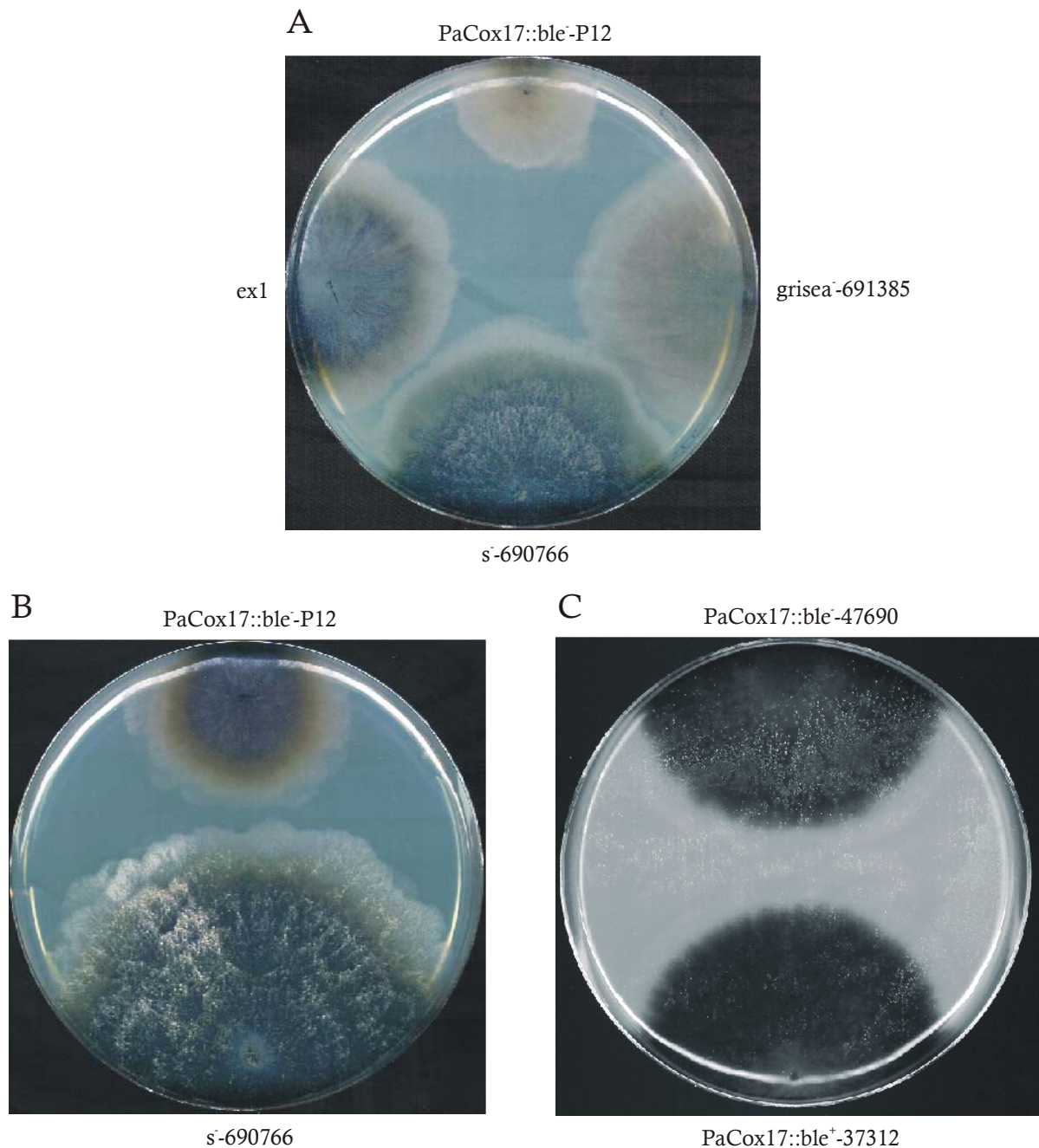
### 3.4.1 Der Phänotyp der PaCox17::ble-Mutante ist gegenüber dem Wild-Stamm verändert

Phänotypisch unterscheiden sich Stämme mit *PaCox17*-Nullmutation deutlich von ihrem Ursprungs-Stamm *s*. PaCox17::ble-Stämme wachsen mit  $3,9 \pm 0,15$  mm/Tag deutlich langsamer als Wild-Stamm *s* mit  $6,5 \pm 0,52$  mm/Tag, ihre Wachstumsrate liegt dementsprechend bei etwa 60% des Wild-Stammes *s* (siehe Abb. 34, vergleiche Tab. 23).

Die Wachstumsrate wurde aus dem Vergleich von 20 Wild-Stämmen *s* und 60 PaCox17::ble-Stämmen ermittelt (siehe Tab. 23). Alle Messungen wurden auf BMM durchgeführt, es wurde jeweils Maismehl aus einer Charge verwendet (siehe Material).

PaCox17::ble-Stämme bilden sehr wenig Luftmyzel. Auf älteren Kulturen sind in einigen Fällen Luft-Hyphen zu erkennen, wohingegen Myzel im Alter von 1-2 Wochen normalerweise kein Luftmyzel ausbildet. Die Pigmentierung der Mutante PaCox17::ble ist im Vergleich zum Wildtyp verzögert (siehe Abb. 34A). Nach Einsetzen der Bildung dunkelbrauner Pigmente (vermutlich u.a. Melanin) sind PaCox17::ble-Stämme dunkler als Wild-Stämme. Dieser Effekt ist zum Teil auf das Fehlen von Luftmyzel zurückzuführen (siehe Abb. 34B, C).

PaCox17::ble-Stämme unterschiedlichen Paarungstyps zeigen phänotypisch keine Unterschiede. Exemplarisch wurden die Stämme PaCox17::ble<sup>-</sup>-47690 (Paarungstyp „minus“) und PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 (Paarungstyp „plus“) verglichen (siehe Abb. 34C).

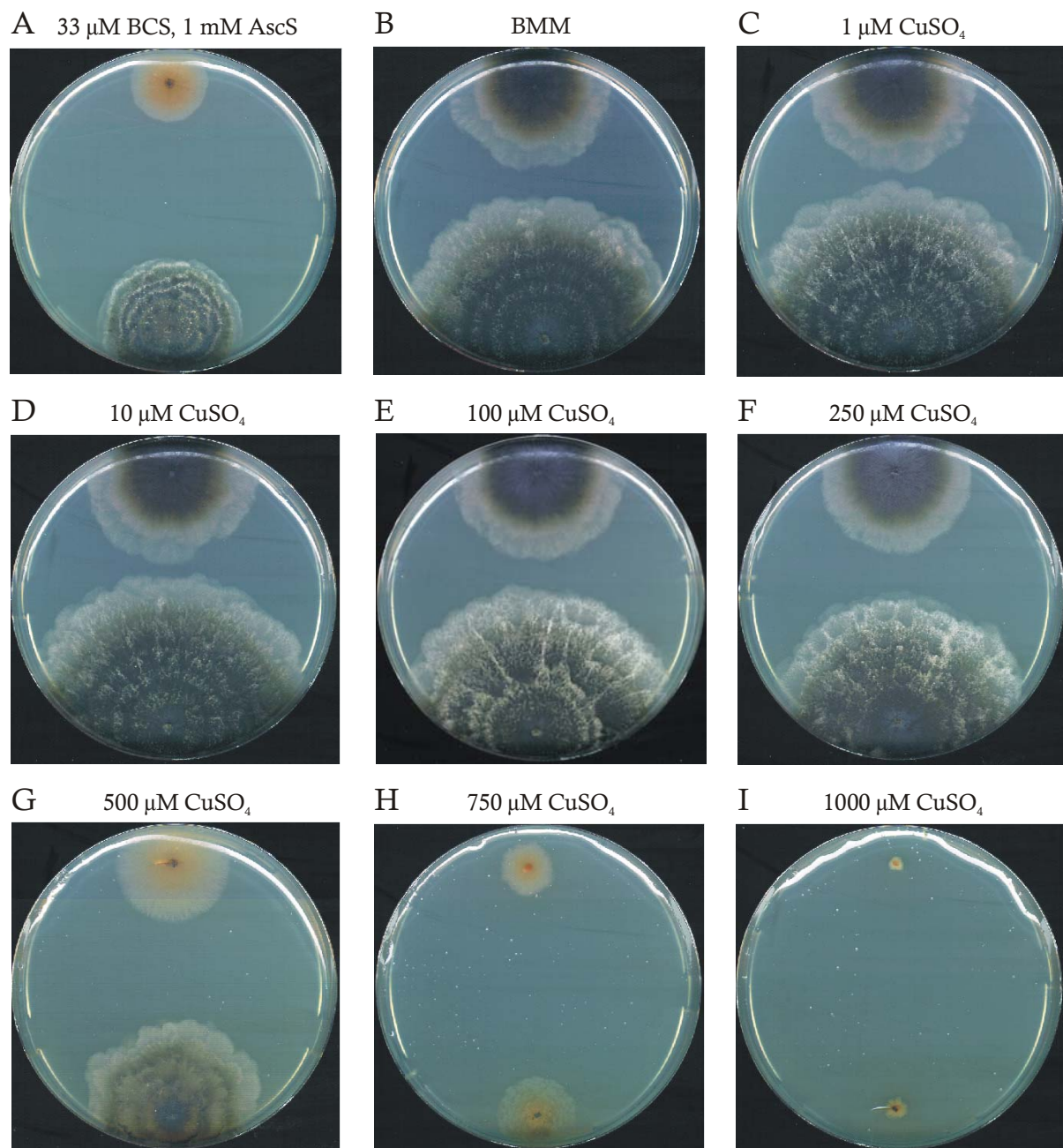


**Abbildung 34: Phänotyp der Mutante PaCox17::ble im Vergleich zum Wild-Stamm, Mutante grisea und Mutante ex1.** (A) PaCox17::ble-Stämme (oben) zeigen ein im Vergleich zum Wild-Stamm s (unten) deutlich verlangsamtes Wachstum. Die Pigmentierung ist anfangs verzögert. Mutanten grisea (rechts) und ex1 (links) lassen sich deutlich unterscheiden. Diese vier Stämme sind 5 Tage auf BMM gewachsen. (B) Nach 8 Tagen Wachstum auf BMM zeigen PaCox17::ble-Stämme (oben) deutliche Pigmentbildung, bilden aber im Gegensatz zum Wild-Stamm (unten) kein Luftmyzel aus. (C) Zwei PaCox17::ble-Stämme verschiedenen Paarungstyp im Vergleich (12 Tage auf BMM gewachsen): Zwischen Paarungstyp „minus“ (PaCox17::ble<sup>-</sup>-47690) und „plus“ (PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312) ist phänotypisch kein Unterschied zu erkennen.

### Reversion der Mutante PaCox17::ble durch Inkubation auf Medium mit Kupfer-Ionen

In *S. cerevisiae* werden *Cox17*-Nullmutanten durch 0,1% (16 mM) Cu<sup>2+</sup> im Medium phänotypisch zum Wildtyp revertiert (Glerum *et al.*, 1996a). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auch in PaCox17::ble-Stämmen auftritt, wurde der Stamm PaCox17::ble<sup>-</sup>-P12 und der Wild-Stamm s<sup>-</sup>-690766 auf BMM mit steigenden Kupfer-Konzentrationen 10 Tage inkubiert

(siehe Tab. 16). Nach 9 Tagen wurden die Agar-Platten fotografiert (siehe Abb. 35). Dabei zeigte sich, daß die Gabe von bis zu 1000  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  keinen positiven Effekt auf die Wachstumsrate der Mutante PaCox17::ble ausübt. Mutante und Wild-Stamm  $s^-$  tolerieren Kupfer bis etwa 250  $\mu\text{M}$ , höhere Konzentrationen sind toxisch und führen mit steigender Kupfer-Konzentration zu fortschreitender Reduktion der Wachstumsrate (siehe Abb. 35B-I).



**Abbildung 35: Wachstum von Mutante PaCox17::ble und Wild-Stamm mit steigender Kupfer-Konzentration.** (A) Wachstum von Mutante PaCox17::ble-P12 und Wild-Stamm  $s^-$  auf Kupfermangel-Medium (BMM + 33  $\mu\text{M}$  BCS + 1 mM Ascorbinsäure). (B-I) Wachstum von Mutante PaCox17::ble-P12 und Wild-Stamm  $s^-$  auf Komplex-Medium (BMM) mit steigender Konzentration von  $\text{CuSO}_4$ : 0  $\mu\text{M}$  (B), 1  $\mu\text{M}$  (C), 10  $\mu\text{M}$  (D), 100  $\mu\text{M}$  (E), 250  $\mu\text{M}$  (F), 500  $\mu\text{M}$  (G), 750  $\mu\text{M}$  (H) und 1000  $\mu\text{M}$  (I). Auf jeder Agar-Platte wurde Mutante PaCox17::ble-P12 in der oberen Hälfte und Wild-Stamm  $s^-$  in der unteren Hälfte angeimpft. Alle Stämme sind 9 Tage gewachsen. Weitere Erklärungen siehe Text.

Da *P. anserina* bei einer Konzentration von 1 mM Kupfer kein Wachstum mehr zeigt, war es nicht möglich zu prüfen, ob 16 mM (0,1%) Kupfer im Medium zu einer Reversion führen, wie es für Hefe gezeigt wurde (Glerum *et al.*, 1996a).

Wurde dem Medium (durch die Gabe von 33 µM BCS, einem Kupfer(I)-Chelator) Kupfer entzogen, halbierte sich die Wachstumsrate von Mutante PaCox17::ble und Wild-Stamm s<sup>-</sup> (siehe Abb. 35A).

In dem in Abb. 35A gezeigten Experiment wurden dem Medium (BMM) neben 33 µM BCS auch 1 mM Ascorbinsäure zugegeben. Ascorbinsäure reduziert Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen, die von BCS komplexiert werden. BCS ist nicht in der Lage, zweiwertige Ionen zu komplexieren.

Bei Supplementation des Mediums mit 33 µM BCS bzw. 500 µM – 1000 µM Kupfer zeigte die Mutante PaCox17::ble stark verminderte Pigmentbildung (siehe Abb. 35), die sich allerdings nach längerem Wachstum normalisierte (nicht gezeigt).

**Tabelle 16: Wuchsstrecke und Wachstumsrate der Mutante PaCox17::ble-P12 und des Wild-Stammes s<sup>-</sup>-690766 auf BMM mit steigender Kupfer-Konzentration.** Die linke Spalte benennt jeweils den Stamm, dessen Wuchsstrecke (3 und 4 Zeile) bzw. Wachstumsrate (6 und 7 Zeile) bestimmt wurde. Die Wuchsstrecke bezieht sich auf einen Zeitraum von 10 Tagen. Die oberste Zeile definiert die Konzentration [Kupfer(II)-Sulfat im Medium] mit der die Stämme gewachsen sind. Unterstrichenen Zahlen repräsentieren Maximal-Werte.

[CuSO <sub>4</sub> ]	1 µM	10 µM	100 µM	250 µM	500 µM	750 µM	1000 µM	2000 µM
<b>Wuchsstrecke (mm):</b>								
<b>PaCox17::ble-P12</b>	34	35	37	<u>38</u>	24	8	2	0
<b>s<sup>-</sup>-690766</b>	46	<u>48</u>	<u>48</u>	42	29	9	2	0
<b>Wuchstumsrate (mm/Tag):</b>								
<b>PaCox17::ble-P12</b>	4,2	4,3	4,5	<u>4,6</u>	3,0	1,0	0,2	-
<b>s<sup>-</sup>-690766</b>	5,8	<u>6,1</u>	6,0	5,3	3,7	1,1	0,2	-

### Fertilität der Mutante PaCox17::ble

Von Kupfermangel-Mutante grisea ist bekannt, daß ihre Fertilität aufgrund des globalen Kupfermangels eingeschränkt ist (Marbach *et al.*, 1994; Osiewacz und Nuber, 1996). In Mutante PaCox17::ble ist der Kupfermangel vermutlich auf die Kupfer-Versorgung der COX beschränkt, wohingegen Mutante grisea an globalem Kupfermangel leidet. Um zu prüfen, ob die Disruption des PaCOX17-Kupfer-Transportweges Auswirkungen auf die Fertilität hat, wurden folgende initiale Kreuzungen durchgeführt:

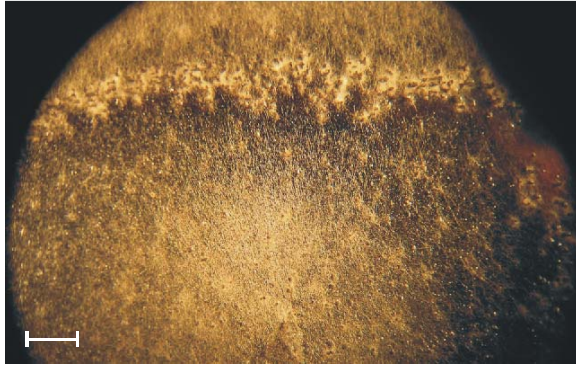
- Kreuzung der Mutante PaCox17::ble-P12<sup>-</sup> mit s<sup>+</sup>-690765.
- Kreuzung der Mutante PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 mit s<sup>-</sup>-690766.
- Kreuzung von PaCox17::ble-P12<sup>-</sup> mit PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312.

Im Rahmen dieser Experimente zeigte sich, daß homokaryotische PaCox17::ble-Stämme beider Paarungstypen mit homokaryotischen Wild-Stämmen  $s$  (des anderen Paarungstyps) fertile Perithezien ausbilden. Die Kreuzung von Mutante PaCox17::ble und Wild-Stamm  $s$  bildet Perithezien nach etwa drei Wochen aus, wohingegen bei der Kreuzung zweier homokaryotischer Wild-Stämme unterschiedlichen Paarungstyps nur etwa 2 Wochen bis zur Reifung der Perithezien vergehen. Weiterhin werden bei der Kreuzung von Mutante und Wild-Stamm nur etwa die Hälfte der Perithezien gebildet, die bei der Kreuzung der Wild-Stämme  $s^+$  und  $s^-$  erwartet werden würde (siehe Abb. 36).

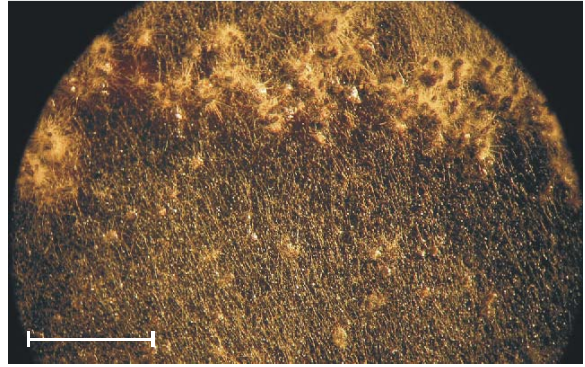
Bei der Kreuzung zweier PaCox17::ble-Stämme unterschiedlichen Paarungstyps entstehen nur sehr vereinzelt Perithezien, ihre Zahl liegt pro Platte zwischen Drei und Neun. Würden zwei Wild-Stämme auf Platte gekreuzt werden, würden etwa 250 Perithezien pro Platte erhalten werden (Lorin *et al.*, 2001). Kreuzt man Wild-Stamm  $s^+$  mit  $s^-$  auf einer BMM-Platte entstehen ca. nach 12-14 Tage reife Perithezien, wohingegen die Kreuzung zweier PaCox17::ble-Stämme erst nach 3-5 Wochen Perithezien liefert. Die Fertilität der Mutante PaCox17::ble ist demnach stark herabgesetzt, dies betrifft vor allem die Bildung weiblicher Gametangien (siehe Abb. 36).



A. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



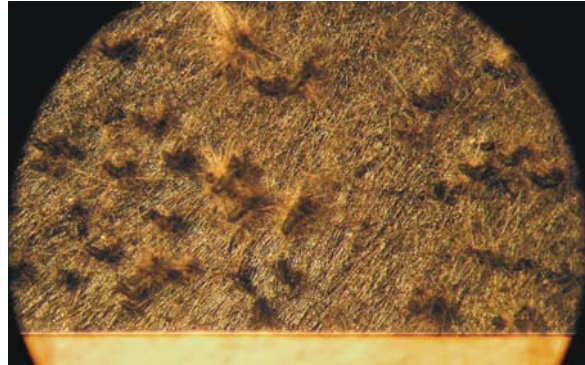
B. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



C. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



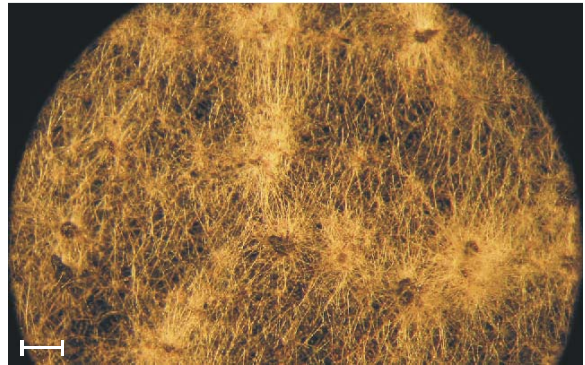
D. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



E. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



F. PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766



**Abbildung 36: Perithezien-Morphologie der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766.** Die Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 und s<sup>-</sup>-690766 wurden auf BMM-Platten zur Kreuzung angeimpft und 5 Wochen bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Die resultierenden Perithezien wurden photographiert. (A-E) Der Abstand zwischen zwei benachbarten, parallelen Mess-Linien des Mess-Streifens (im Bild unten, heller Bereich) beträgt exakt 5 mm. Bei (F) beträgt der Abstand 0,2 mm. (A) und (B) zeigen die Bildung von Perithezien, sowohl an den Stammes-Grenzen, als auch in dahinterliegenden Bereich. Die unteren zwei Drittel der Bilder A und B sind von der Mutante überwachsen, während am oberen Rand das Myzel des Wild-Stammes s zu erkennen ist. (C, D) und (E) zeigen Ausschnitte der Kreuzungs-Platten mit hoher Perithezien-Dichte, die von Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 überwachsen wurden. (F) Vergrößerung eines Ausschnitts der in E dargestellten Platte. Einzelne Perithezien sind deutlich zu erkennen. (A-F) Die hier dargestellten Ausschnitte erwecken zum Teil den Eindruck, daß die Bildung von Perithezien auf Kreuzungs-Platten gleich verteilt ist. Daß dem nicht so ist, zeigen (A) und (B). Weitere Informationen siehe Text.

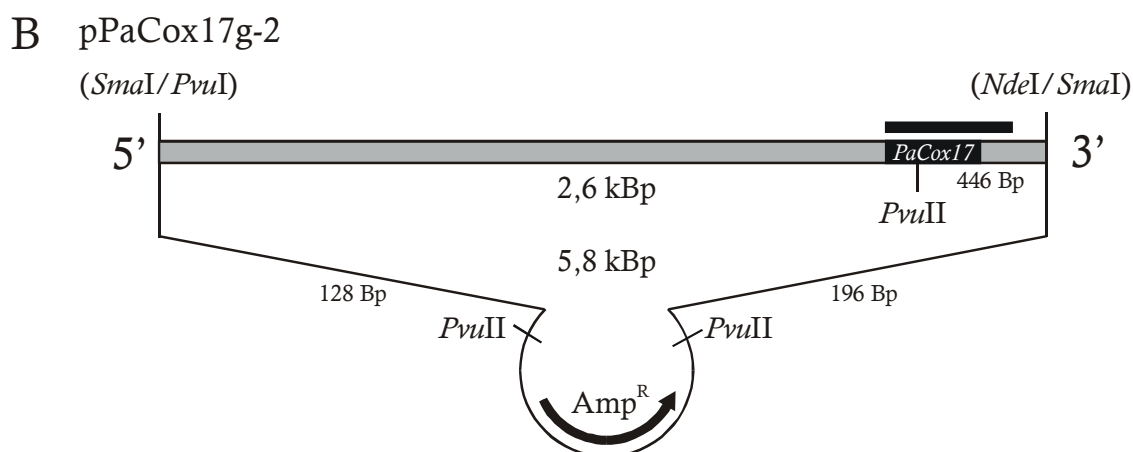
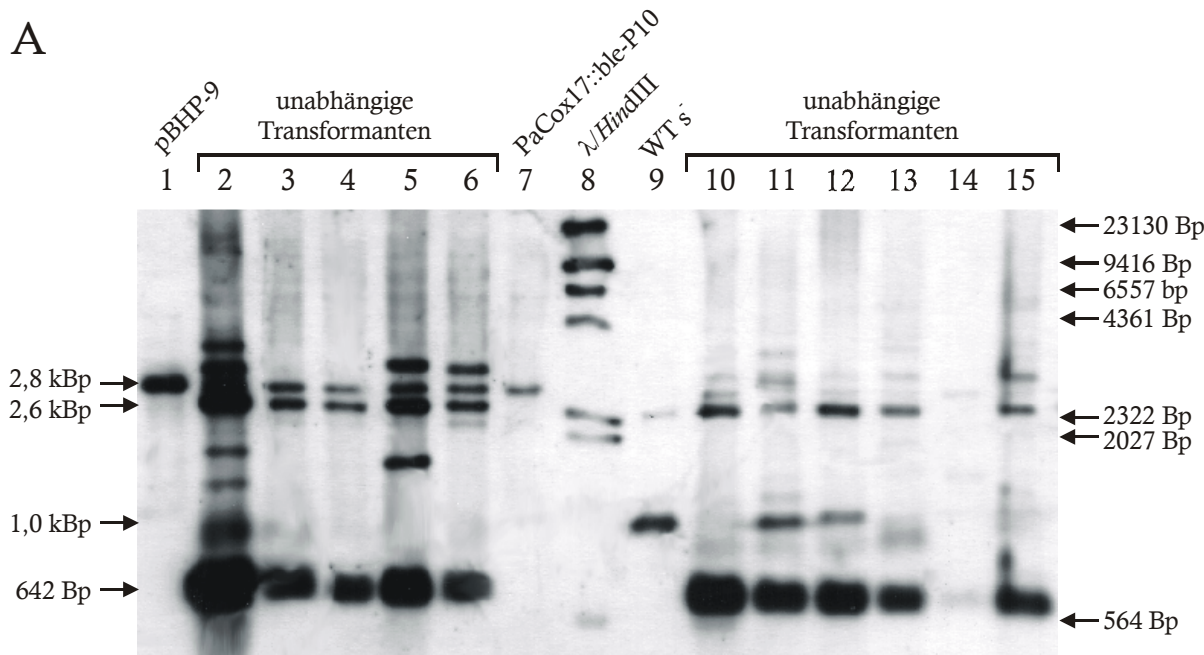
### **Komplementation der Mutante PaCox17::ble**

Neben der Analyse der PaCox17::ble-Stämme durch Southern-Analysen (siehe 3.3.2) wurde auch das ursprüngliche Gen *PaCox17* in PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10 retransformiert. Für diese Komplementation wurde Plasmid pPaCox17g-2 (siehe Abb. 11) eingesetzt, es enthält 2,5 kBp Promotor-Region, den *PaCox17*-ORF und 0,3 kBp 3'-Bereich. Neben pPaCox17g-2 wurde pAN7-1 kotransformiert, um die HRK als Selektions-Marke nutzen zu können (siehe Methoden). Resultierende pPaCox17g-2/pAN7-1-Transformanten wurden durch Hygromycin B selektioniert und durch eine Southern-Analyse mit der *PaCox17*-ORF-Sonde analysiert. Als Kontrollen wurden Plasmid pBHP-9, die *PaCox17*-Nullmutante PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10 und der Wild-Stamm s<sup>-</sup> eingesetzt. Von Transformanten, die Plasmid pPaCox17g-2 und damit *PaCox17* in ihr Genom reintegriert haben, werden hybridisierende Fragmente der Länge 642 Bp und 2,6 kBp erwartet (siehe Abb. 37B). Außerdem sollten 2,8 kBp lange Fragmente entsprechend der Situation in Mutante PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10 vorliegen (diese Fragmente gehen auf das disruptierte *PaCox17* zurück). In 10 von 11 untersuchten pPaCox17g-2/pAN7-1-Transformanten ließen sich pPaCox17g-2-typische Fragmente nachweisen (siehe Abb. 37A; Spuren 2-6, 10-13, 15), dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß die 5'-Flanke und der ORF von *PaCox17* ohne Unterbrechung in das Genom integriert wurden (vergl. Abb. 37B). Entsprechende Stämme zeigen wahrscheinlich Expression von *PaCox17*.

Der hohe Prozentsatz von Transformanten, die *PaCox17* aufgenommen haben, mag bei einer Kotransformation erstaunlich wirken. Rein statistisch würde man davon ausgehen, daß etwa 50% der Hygromycin B-resistenten Transformanten neben pAN7-1 auch pPaCox17g-2 aufgenommen haben. Wird die höhere Wachstumsrate des Wild-Stammes gegenüber der *PaCox17*-Nullmutante berücksichtigt, wird klar, daß Stämme mit intaktem *PaCox17* mit höherer Wahrscheinlichkeit selektiert werden. Siehe nachfolgende Kapitel.

In einigen in Abb. 37 untersuchten Transformanten tauchen weitere Fragmente unterschiedlicher Längen auf. Dies hängt damit zusammen, daß pPaCox17g-2 bei der Integration an verschiedenen Stellen geöffnet werden kann. So führt beispielsweise die Öffnung von pPaCox17g-2 in dessen Fragment des *PaCox17*-Lokus (grauer Balken in Abb. 37) zu Subfragmenten undefinierter Länge.

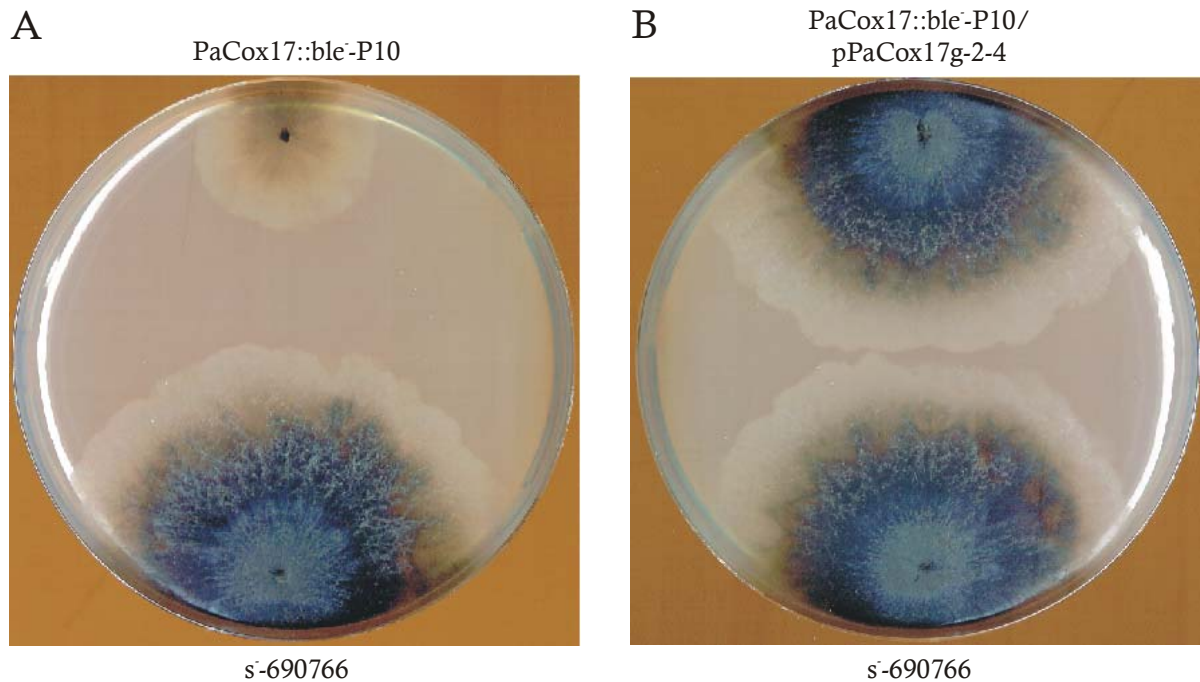




**Abbildung 37: Southern-Analyse einiger Klone des mit pPaCox17g-2 transformierten Stammes PaCox17::ble-P10.** (A) zeigt die Fotografie einer Southern-Analyse mit *PvuII*. Es wurden 11 Klone analysiert (von links: PaCox17::ble/pPaCox17g-2-3-5, 7-14, Spuren 2-6, 10-15). Ihre mit *PvuII*-geschnittene DNA wurde in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit der *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Längenstandard war mit *HindIII* geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  (Spur 8), dessen Fragmentlängen rechts angegeben sind. Die relevanten Fragmentlängen der analysierten Klone sind links angegeben. *PaCox17*-Revertanten (Spuren 2-6, 10-15) zeigen Signale bei 642 Bp und 2,6 kBp. Die Kontrolle pBHP-9 (Spur 1) weist ein Signal bei 2,8 kBp auf (vergleiche Abb. 32C). Der Wild-Stamm *s* (Spur 9) zeigt Signale bei 1,0 kBp und 2,6 kBp. Das Schema in (B) gibt Aufschluss über Signale (hybridisierende Fragmente von 642 Bp und 2,6 kBp), die das transformierte Plasmid pPaCox17g-2 aufweist. Der graue Balken symbolisiert das Fragment des *PaCox17*-Lokus (enthält den *PaCox17*-ORF mit 2,5 kBp 5'-Flanke und 0,2 kBp 3'-Flanke), der darin enthaltene schwarze Balken definiert den ORF. Der darüber liegende Balken zeigt die Position, an der die *PaCox17*-ORF-Sonde hybridisiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die komplementierten Transformanten gleichen phänotypisch (Ausbildung von Luftmyzel, Pigmentierung, Wachstumsrate etc.) dem Wild-Stamm *s* (siehe Abb. 38).

Neben der phänotypischen und genetischen Charakterisierung der Mutante PaCox17::ble wurde eine Reihe biochemischer und physiologischer Analysen durchgeführt.



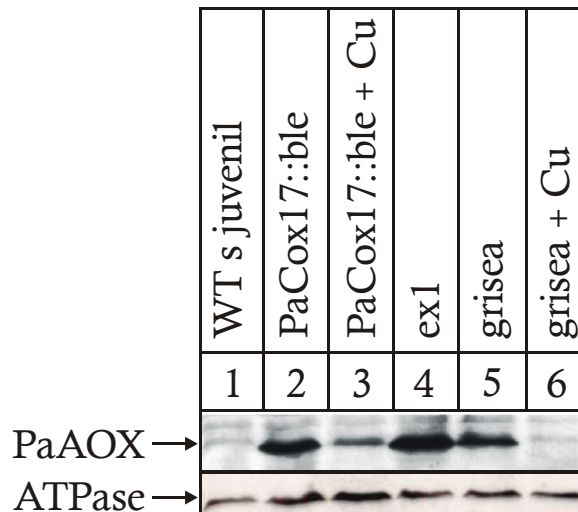
**Abbildung 38: Vergleich von Wild-Stamm  $s^-$ , Mutante  $PaCox17::ble^-P10$  und Revertante  $PaCox17::ble^-P10/pPaCox17g-2-4$ .** (A) zeigt Wild-Stamm  $s^-690766$  (unten) und Mutante  $PaCox17::ble^-P10$  (oben) im Vergleich. Die verzögerte Pigmentierung und das verlangsamte Wachstum der  $PaCox17$ -Nullmutante sind deutlich sichtbar. (B) Die mit  $PaCox17$  (Plasmid  $pPaCox17g-2$ , siehe Abb. 37B) transformierte Mutante  $PaCox17::ble^-P10$  (oben) revertiert phänotypisch zum Wild-Stamm  $s^-690766$  (unten). Die gezeigten Stämme wuchsen 6 Tage auf BMM.

### 3.4.2 Die Deletion von *PaCox17* induziert die alternative Oxidase

Ausgehend von der Annahme, daß in Mutante  $PaCox17::ble$  die Kupfer-Versorgung der COX empfindlich gestört ist, kommt es in derartigen Stämme vermutlich zur Induktion der AOX. Um dies zu prüfen, wurden Western-Analysen durchgeführt. Da die PaAOX im Proteom von Wildstämmen kein abundantes Protein darstellt (Borghouts *et al.*, 2002b), wurden Mitochondrien von den benötigten Stämmen isoliert und direkt für Western-Analysen eingesetzt (siehe Methoden).

Neben Mutante  $PaCox17::ble^+37312$  wurden Mitochondrien des Wild-Stammes  $s^-$  (juvenil, 5 Tage, Negativ-Kontrolle) und der langlebigen Mutanten *grisea* und *ex1* (Positiv-Kontrollen) untersucht. Weiterhin wurden Mitochondrien aus den Mutanten  $PaCox17::ble$  und *grisea* präpariert, die zuvor mindestens drei Tage mit  $250 \mu M CuSO_4$  im Medium kultiviert wurden. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob Kupfer die Bildung der AOX in den untersuchten Stämmen beeinflusst.

Entsprechende Western-Analysen wurden mit isolierten Mitochondrien und einem Primär-Antikörper gegen die AOX aus *Sauromatum guttatum* durchgeführt (Elthon *et al.*, 1989). Ein derartiges Experiment ist in Abb. 39 dargestellt. Als Lade-Kontrolle wurde ein Antikörper gegen die Untereinheit V der  $\beta$ -ATPase genutzt (Nelson und Schatz, 1979; siehe Methoden).



**Abbildung 39: Western-Analyse der Mutante PaCox17::ble.** Je 60  $\mu$ g Protein der Mutante PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 (9 Tage, auf BMM bzw. BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> gewachsen), der Mutante ex1, der Mutante grisea (auf BMM bzw. BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> gewachsen) und des Wild-Stammes s<sup>-</sup> (juvenil 5 Tage) wurden im Rahmen einer Western-Analyse auf Vorhandensein der AOX untersucht. Dabei wurde ein Primär-Antikörper gegen die AOX aus *S. guttatum* eingesetzt. Detektierte PaAOX (36 kDa) ist links der Fotografie durch einen Pfeil kenntlich gemacht. Als konstitutive Ladekontrolle wurde die Untereinheit V der  $\beta$ -ATPase (47,5 kDa) detektiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

In Mutante PaCox17::ble wurden erhebliche Mengen von PaAOX gebildet. Auch die Kupfermangel-Mutante grisea zeigte ein deutliches Signal, das allerdings etwas schwächer ist, als das der Mutante PaCox17::ble. Die Mutante ex1 ist auf den AOX-Atmungsweg angewiesen, sie bildete von allen untersuchten Stämmen die größte Menge PaAOX. Der juvenile Wild-Stamm s<sup>-</sup> zeigte erwartungsgemäß keine Bildung der PaAOX (siehe Abb. 39). Von Mutante grisea ist bekannt, daß sie durch hohe extrazelluläre Kupfer-Mengen revertiert wird. Die Reversion betrifft sowohl Phänotyp als auch das Zurückschalten von AOX- auf COX-Atmung (Borghouts *et al.*, 2001; Marbach *et al.*, 1994). Diese Befunde konnten bestätigt werden: Mutante grisea zeigte bei Wachstum auf Medium mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> praktisch keine Bildung von AOX (siehe Abb. 39, Spur 6). Wie zuvor gezeigt, kann Mutante PaCox17::ble durch Kupfer(II)-Ionen phänotypisch nicht revertiert werden (siehe 3.4.1). Erstaunlicherweise verursachte die hochdosierte Kupfer-Supplementation (250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) einen Rückgang der Bildung von PaAOX (siehe Abb. 39, Spur 3). Dies ist ein Hinweis darauf, daß Kupfer-Supplementation den Typ der Respiration auch in Mutante PaCox17::ble

geringfügig beeinflussen könnte. Zu welchem Grad die Gabe von Kupfer(II)-Ionen den Typ der Respiration moduliert, lässt sich durch Atmungs-Messungen bestimmen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Western-Analysen durchgeführt, die obige Befunde bestätigten (nicht gezeigt).

### **3.4.3 PaCox17::ble-Stämme zeigen SHAM-sensitive, KCN-resistente Atmung**

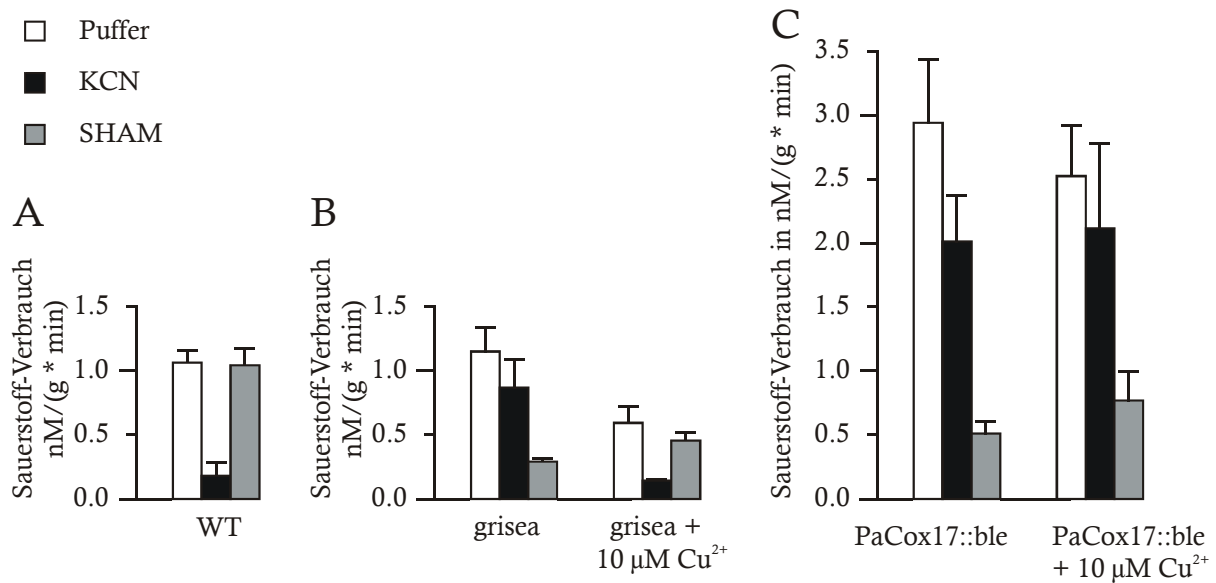
Um zu entscheiden, welchen Anteil die terminalen Oxidasen PaCOX und PaAOX an der Respiration der Mutante PaCox17::ble *in vivo* haben, wurden Sauerstoff-Verbrauchsmessungen mit lebendem Myzel durchgeführt. Dabei wird bestimmt, welche Menge Sauerstoff pro Zeiteinheit und pro Gewicht verbraucht wird.

Um Sauerstoff-Verbrauchsmessungen durchführen zu können, wird Myzel in Flüssig-Medium (CM) angezogen, anschließend ausgedrückt und in mit Sauerstoff gesättigtem Puffer überführt. Anschließend wird der Sauerstoff-Verbrauch gemessen (siehe Methoden).

Die beiden in *P. anserina* bekannten terminalen Oxidasen PaCOX und PaAOX lassen sich selektiv durch spezielle Inhibitoren hemmen. Dabei wird die PaCOX durch Kalium-Zyanid (KCN) und die PaAOX durch Salicyl-Hydroxamsäure (SHAM) gehemmt. Durch die Gabe eines derartigen Inhibitors kann – durch Messung des Rückgangs des Sauerstoff-Verbrauchs – bestimmt werden, ob und zu welchem Anteil die entsprechende terminale Oxidase an der Respiration beteiligt ist.

Der Sauerstoff-Verbrauch der Mutante PaCox17::ble<sup>-</sup>-37312 wurde nach Wachstum in Medium ohne Kupfer bzw. mit 10 µM Kupfer-Sulfat untersucht. Als Kontrollen dienten der Wild-Stamm s<sup>-</sup>-690766 (Respiration über PaCOX) und die Kupfermangel-Mutante grisea (mit und ohne Kupfer-Supplementation). Die Atmungs-Messungen erbrachten folgende Befunde (Verweise beziehen sich auf Abb. 40):

- Der Wild-Stamm s<sup>-</sup> atmet erwartungsgemäß über den PaCOX-Atmungsweg (A).
- Die Mutante grisea atmet in Komplexmedium vor allem über den PaAOX-Atmungsweg, die Atmung über PaCOX spielt keine nennenswerte Rolle (B).
- Wird grisea mit 10 µM CuSO<sub>4</sub> supplementiert, kommt es zur Reversion der Atmung: grisea atmet in diesem Fall hauptsächlich über den PaCOX-Atmungsweg (B).
- In Komplexmedium zeigt Mutante PaCox17::ble – wie grisea – ganz deutlich den PaAOX-Atmungsweg. Die PaCOX-Atmung zeichnet sich nur für einen sehr geringen Teil des Sauerstoff-Verbrauchs verantwortlich (C).
- Wird Mutante PaCox17::ble Medium mit 10 µM CuSO<sub>4</sub> angezogen, kommt es – im Gegensatz zu grisea – zu keiner Reversion der Atmung (C).



**Abbildung 40: Sauerstoff-Verbrauch von Wild-Stamm *s*' und den Mutanten PaCox17::ble und grisea.** Der Typ der Respiration wurde durch Gabe eines Respirations-Inhibitors (entweder 1 mM KCN oder 4 mM SHAM) unterschieden. Mutante PaCox17::ble wurde mit Wild-Stamm *s*' und Mutante grisea verglichen. Gemessen wurde der Sauerstoff-Verbrauch in nM pro Gramm Myzel (Trockengewicht) und Minute. Die Stämme wurden entweder in Komplexmedium (CM) oder in Komplexmedium mit 10 μM CuSO<sub>4</sub> angezogen (siehe Methoden).

Durch die Sauerstoff-Verbrauchs-Messungen wurde deutlich, daß PaCox17::ble-Stämme grundsätzlich einen höheren Sauerstoff-Verbrauch aufweisen, als Wild-Stämme oder Mutante grisea. Es läßt sich darüber spekulieren, daß die Sauerstoff-Aufnahme der Mutante PaCox17::ble aus bisher unbekanntem Gründen erhöht ist.

In Übereinstimmung mit dem Befund, wonach in den Mutanten PaCox17::ble und grisea verschiedene Schritte des Kupfer-Metabolismus beeinflusst sind, können beide Mutanten auf physiologischer Ebene deutlich voneinander unterschieden werden.

### 3.4.4 Das Aktivitätsschema der SOD ist bei PaCox17::ble-Stämmen verändert

Das wichtigste Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen *P. anserina*-Stamm zu konstruieren, dessen Kupfer-Mangel sich auf die PaCOX beschränkt – und nicht wie in Mutante grisea von globaler Natur ist. Die Disruption des PaCOX17-Weges legt die Vermutung nahe, daß Kupfer welches in Wild-Stämmen von PaCOX17 an mitochondriale Proteine weitergegeben wird, in PaCox17::ble-Stämmen zu einem Rückstau von Kupfer ins Zytoplasma führen könnte. Einerseits könnte dies zu einer Erhöhung des zytoplasmatischen Kupfer-Spiegels führen. Andererseits wäre die Autoregulation der Kupfer-Aufnahme durch den Transkriptionsfaktor GRISEA (dessen Zielgen Kupfer-Importer PaCTR3 ist) vorstellbar.

Der zytoplasmatische Kupfer-Spiegel von PaCox17::ble-Stämmen wurde indirekt, über die Aktivität der Cu/Zn-SOD (SOD1) bestimmt. Die Aktivität der in Zytoplasma und mitochondrialem Intermembran-Raum lokalisierten Cu/Zn-SOD hängt wahrscheinlich direkt von der Verfügbarkeit des Kofaktors Kupfer ab.

Das Apo-Protein der Cu/Zn-SOD steht in Hefe-Zelle stets im Überschuß zur Verfügung. Es wird angenommen, daß es überschüssiges Kupfer aus dem Zytoplasma puffert. Für die Aktivität der Cu/Zn-SOD ist also Kupfer – und nicht das Apo-Protein – die limitierende Komponente (Schmidt *et al.*, 2000; siehe Abb. 2).

Neben Mutante PaCox17::ble dient Wild-Stamm *s<sup>-</sup>* den Messungen der Cu/Zn-SOD-Aktivität als Referenz. Die Cu/Zn-SOD des Rindes wurde als Positiv-Kontrolle verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde Mutante *grisea* verwendet, die aufgrund ihres globalen Kupfer-Mangels keine Cu/Zn-SOD-Aktivität aufweist (Borghouts *et al.*, 2001).

Zur Messung der Aktivität der Cu/Zn-SOD wurde das Proteom der Mutante PaCox17::ble<sup>-</sup> 37312 (juvenil, 7 Tage; mittelalt, 36 Tage; mit oder ohne 250 µM CuSO<sub>4</sub> gewachsen), des Wild-Stammes *s<sup>-</sup>* (juvenil, 7 Tage und seneszent, 36 Tage), der Mutante *grisea* (mittelalt, mit und ohne 250 µM CuSO<sub>4</sub> gewachsen) und der Mutante *ex1* (mit und ohne 100 µM MnCl<sub>2</sub> gewachsen) nativ präpariert. Die Proteine wurden durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden die so erhaltenen Gele gefärbt. Helle Signale korrespondieren dabei mit SOD-Aktivität. Stellen ohne SOD-Aktivität wurden dunkel gefärbt (siehe Methoden). Vier derartige Gele sind in Abbildung 41 dargestellt. Die vorliegenden Befunde wurden folgendermaßen zusammengefaßt (Buchstaben beziehen sich auf Teilabbildungen A, B, C oder D der Abb. 41, Zahlen auf entsprechende Spuren):

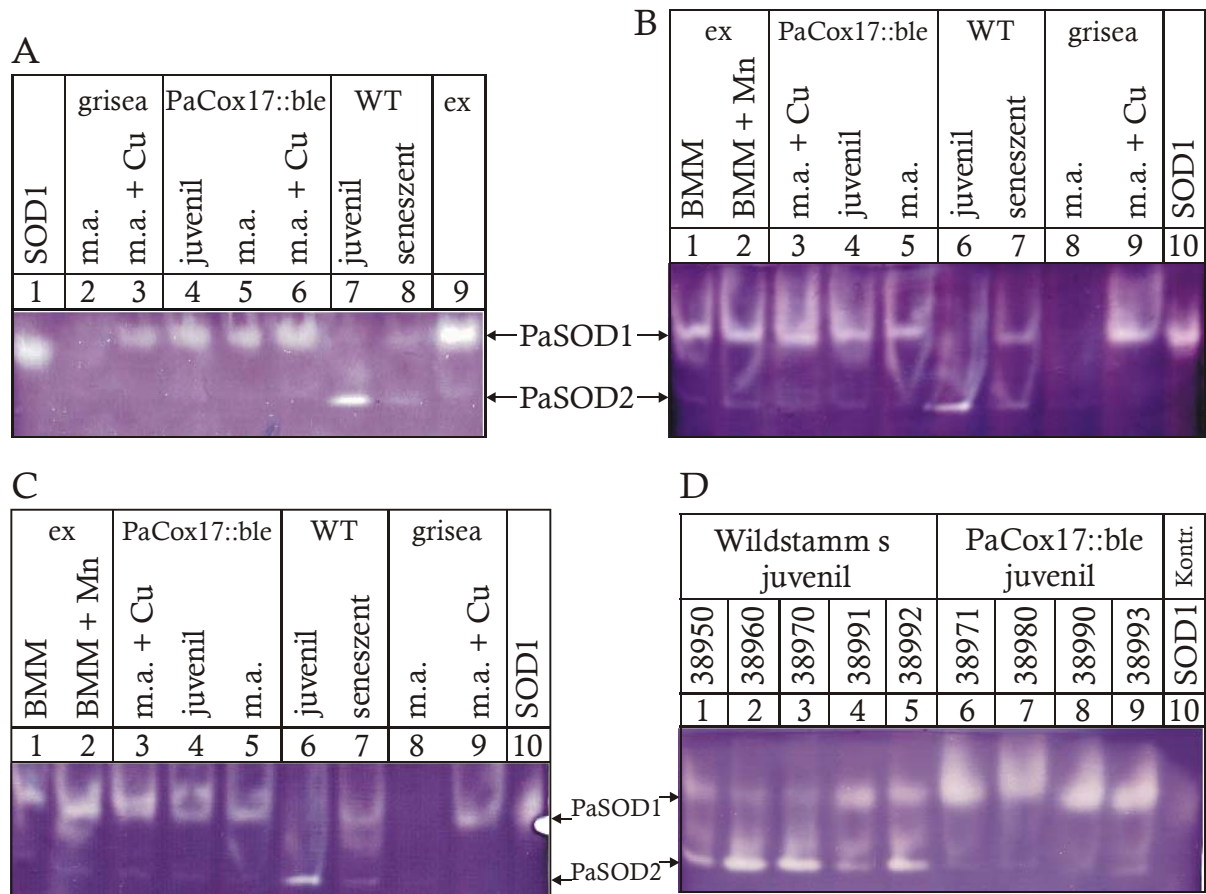
- In Wild-Stamm *s<sup>-</sup>* steigt die Aktivität der Cu/Zn-SOD während der Entwicklung an, wohingegen die Aktivität der mitochondrialen Mn-SOD stark zurück geht (Abb. 41A, Spuren 7-8; B, 6-7; C, 6-7; D, 1-5).
- Mutante *grisea* zeigt keinerlei SOD-Aktivität (Abb. 41A, Spur 2; B, 8 und C, 8). Die Supplementation mit 250 µM CuSO<sub>4</sub> induziert dennoch die Aktivität der Cu/Zn-SOD (A, 3; B, 9 und C, 9).
- Mutante *ex1* zeigt starke Cu/Zn-SOD-Aktivität (A, 9; B, 1 und C, 1). Die Supplementation mit 100 µM MnCl<sub>2</sub> erhöht die Aktivität der Mn-SOD nur gering (B, 2 und C, 2).
- Mutante PaCox17::ble zeigt stets starke Aktivität der Cu/Zn-SOD, die Aktivität der Mn-SOD ist relativ gering (A, 4-5; B, 4-5; C, 4-5 und D, 6-9). Zusätzliche Supplementation mit 250 µM CuSO<sub>4</sub> erhöht die Aktivität der Cu/Zn-SOD lediglich geringfügig (A, 6; B, 3 und C, 3).

Die Analyse der SOD-Aktivität wies klare Unterschiede zwischen Wild-Stamm s<sup>-</sup> und Mutante PaCox17::ble auf. Im Gegensatz zu juvenilen Wild-Stämmen, ist in juvenilen PaCox17::ble-Stämmen die Aktivität der Cu/Zn-SOD prominent (siehe Abb. 41D). Dieser Befund ist ein Hinweis darauf, daß Kupfer in dem Ausmaß zur Verfügung steht, das nötig ist um einen hohen Anteil der Cu/Zn-SOD mit Kupfer zu versorgen. Weiterhin zeigen PaCox17::ble-Stämme – konträr zu juvenilen Wild-Stämmen mit hoch-aktiver Mn-SOD – lediglich sehr geringe Aktivität der Mn-SOD (siehe Abb. 41D). Die Transkription von *PaSod2* wird durch den Kupfer-abhängigen Transkriptionsfaktor GRISEA reguliert (siehe 1.1.2.1; Borghouts *et al.*, 2002A, B). Die sehr niedrige Expression der Mn-SOD in PaCox17::ble-Stämmen ist ein weiterer Hinweis auf einen relativ hohen zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel.

In mittelalten PaCox17::ble-Stämmen (36 Tage) kommt es zu keiner merklichen Steigerung der Cu/Zn-SOD-Aktivität, auch das Wachstum auf Medium mit 250 µM CuSO<sub>4</sub> erhöht die Aktivität der Cu/Zn-SOD nur unwesentlich (siehe Abb. 41A-C). Diese Befunde untermauern die These, daß der Kupfer-Spiegel im Zytoplasma von PaCox17::ble-Stämmen erhöht ist.

In seneszenten Wildstämmen wird Zunahme der Cu/Zn-SOD-Aktivität, bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität der Mn-SOD beobachtet. Beide Befunde sprechen für eine deutliche Zunahme des zytoplasmatischen Kupfer-Spiegels. Über die Quelle dieses Kupfers kann an dieser Stelle nur spekuliert werden. Möglicherweise stammt es aus dem putativen mitochondrialen Kupfer-Reservoir (siehe 1.1.1.3), oder aber aus degradierten COX-Komplexen.





**Abbildung 41: Analyse der Aktivität der Cu/Zn-SOD und der Mn-SOD.** (A, B, C, D) Aus juvenilen (7 Tage) und mittelalten (m.a., 36 Tage, mit und ohne 250  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  angezogen) PaCox17::ble-Stämmen, juvenilen (7 Tage) und seneszenten (36 Tage) Wild-Stämmen s<sup>-</sup> (69766), aus Mutante grisea (mit und ohne 250  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  gewachsen) und Mutante ex1 (ex; mit und ohne 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$  angezogen) wurden native Proteine isoliert. Anschließend wurden die Proteine in nativen Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt, die Gele wurden für die SOD-Detektion gefärbt (siehe Methoden). D Vergleich von fünf juvenilen Wild-Stämmen und vier juvenilen PaCox17::ble-Stämmen. Helle Signale entsprechen aktiven SODs. Als Kontrolle wurde die SOD1 des Rindes aufgetragen (siehe Methoden).

### Die Transkription Kupfer-regulierter Gene ist in Mutante PaCox17::ble verändert.

Die Analyse der Cu/Zn-SOD-Aktivität ließ vermuten, daß Mutante PaCox17::ble einen im Vergleich zum Wild-Stamm s erhöhten zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel aufweist. Um diese Hypothese experimentell zu untermauern wurde RNA des Wild-Stammes, der Mutante PaCox17::ble und der Mutante grisea durch Northern-Analysen untersucht.

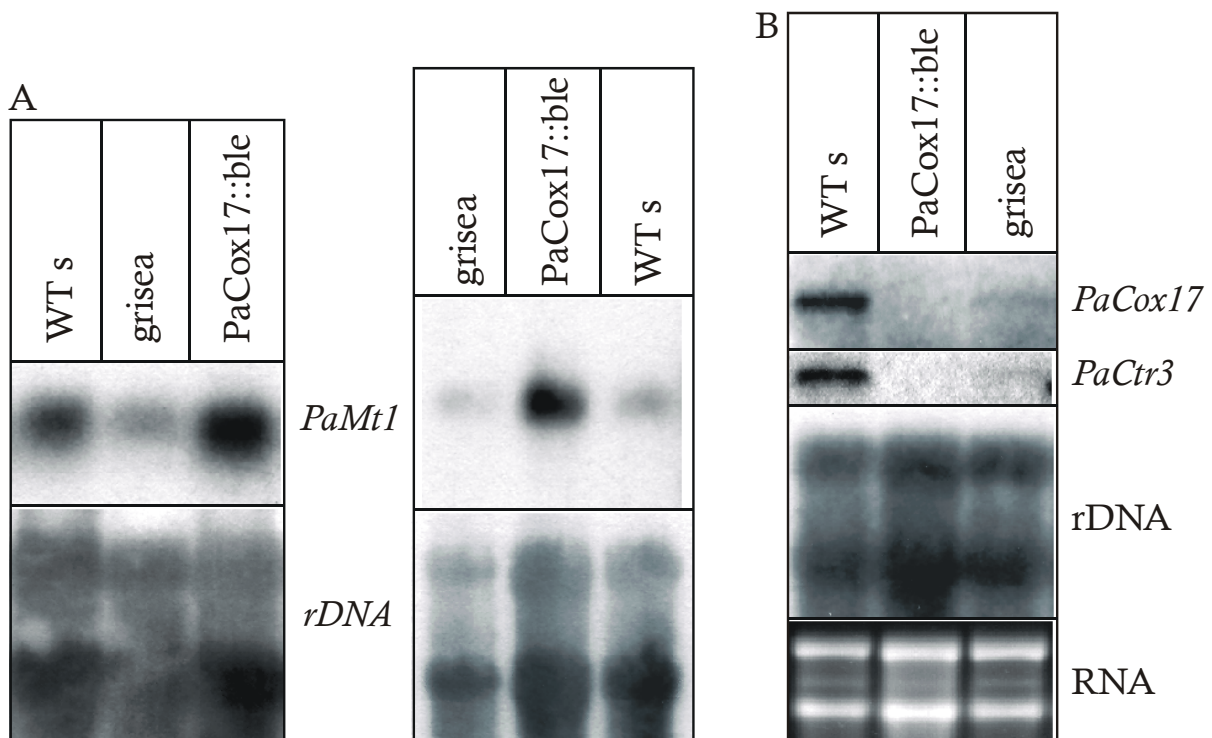
Das Gen *PaMtl* kodiert in *P. anserina* ein 26 Aminosäuren langes Metallothionein. Seine Expression wird durch hohe zytoplasmatische Kupfer-Spiegel induziert (Averbeck *et al.*, 2001). Dementsprechend würde in PaCox17::ble-Stämmen ein hohes Transkriptions-Niveau erwartet werden, wohingegen in Mutante grisea die Transkriptions-Rate abgeschwächt sein sollte. Diese Vermutungen konnten experimentell bestätigt werden (siehe Abb. 42A).

Ein weiteres Gen, welches durch die zytoplasmatische Kupfer-Konzentration reguliert wird ist *PaCtr3*. Der einzige Transkriptions-Faktor von *PaCtr3* ist GRISEA. Bei niedrigem Kupfer-Spiegel wird GRISEA aktiv und stimuliert die Expression von *PaCtr3*, welches den



hochaffinen Kupfer-Transporter PaCTR3 kodiert (Borghouts *et al.*, 2002A und 2002B, siehe Einleitung). Sollte in Mutante PaCox17::ble der zytoplasmatische Kupfer-Spiegel gegenüber dem Wild-Stamm erhöht sein, würde die Aktivität von GRISEA reduziert werden. Dadurch würde die Transkription von *PaCtr3* reduziert werden. Die Transkription von *PaCtr3* konnte in PaCox17::ble-Stämmen nicht nachgewiesen werden, sein Transkriptions-Niveau liegt unterhalb der Nachweisgrenze (siehe Abb. 42B). In Mutante grisea wurde erwartungsgemäß keine Transkription von *PaCtr3* detektiert, da der alleinige Transkriptions-Faktor von *PaCtr3* – GRISEA – der in Mutante grisea nicht funktionell gebildet werden kann.

Die Northern-Analysen mit den Sonden Kupfer-regulierter Gene – *PaMt1* und *PaCtr3* – und die SOD-Aktivitäts-Analysen geben einen Hinweis darauf, daß die Kupfer-Konzentration im Zytoplasma der Mutante PaCox17::ble deutlich höher ist, als in Wild-Stämmen. Demzufolge ließe sich postulieren, daß in PaCox17::ble-Stämmen der mitochondriale Kupfer-Spiegel vermindert sein könnte. Es war von Interesse eventuelle Auswirkungen auf die Mitochondrien, insbesondere die Stabilität der mitochondrialen DNA, zu untersuchen.



**Abbildung 42: Northern-Analyse des Wild-Stammes und der Mutanten PaCox17::ble und grisea.** Als Sonden wurde radioaktiv markierte DNA der Gene *PaMt1* (A, Plasmid pcMt1-2), *PaCox17* (B, *PaCox17*-ORF-Sonde) und *PaCtr3* (B, Plasmid pAD4-*PaCtr3*) eingesetzt. Als Ladekontrolle diente *rDNA* (Plasmid pMY60). In B wurde ein Aliquot der eingesetzten RNAs mit Ethidium-Bromid quantitativ gefärbt. Die Hybridisierung mit der *PaCox17*-ORF-Sonde diente der Verifizierung der Mutante PaCox17::ble (B).

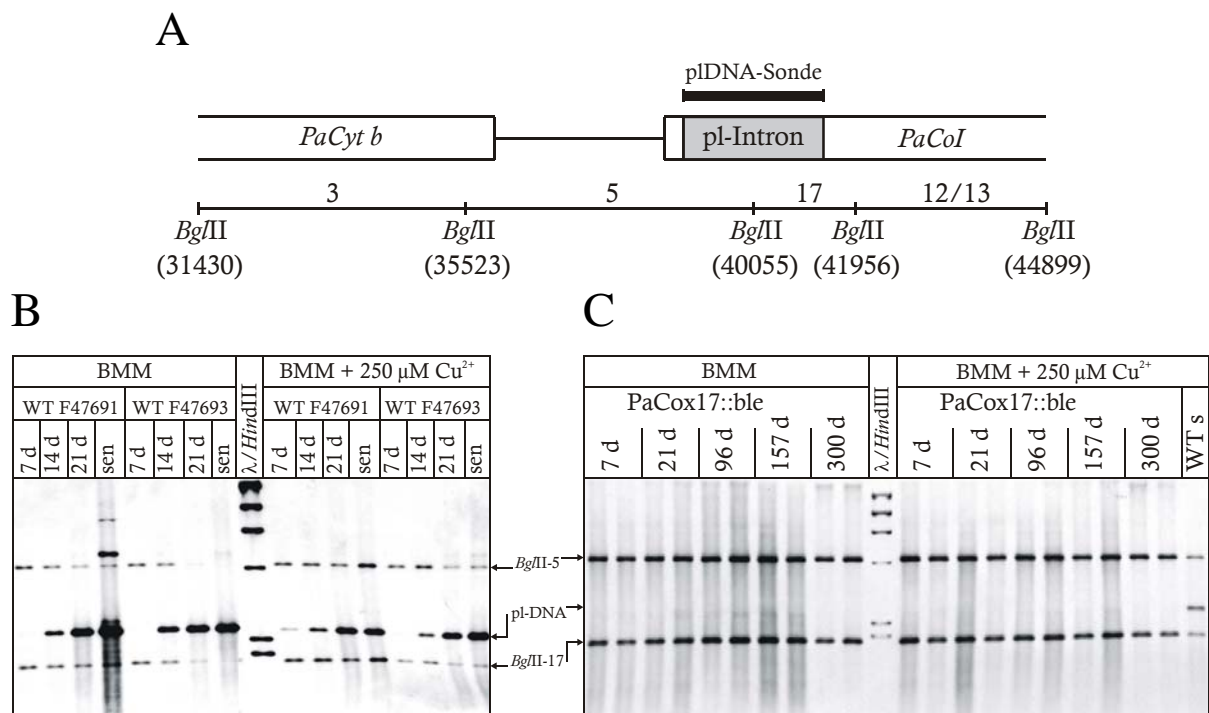
### 3.4.5 Das mitochondriale Genom der Mutante PaCox17::ble ist stabilisiert

#### Amplifikation von pDNA

Ein Merkmal seneszenten *P. anserina*-Stämme ist die ausgedehnte Reorganisation der mitochondrialen DNA (mtDNA). Das prominenteste altersabhängige Rearrangement der mtDNA betrifft das erste Intron des Gens *PaCoxI*, das mit zunehmendem Alter der Kultur zu fortschreitender Amplifikation der pDNA ( $\alpha$ -senDNA) führt (siehe 1.3.2.3). Während alle bekannten Wild-Stämme dieses Phänomen zeigen, kommt es in Kupfer-Mangelmutante *grisea* nicht zur Amplifikation von pDNA. Dennoch lässt sich in *grisea* die Amplifikation der pDNA durch Wachstum auf mit Kupfer supplementiertem Medium (250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>) induzieren (Borghouts *et al.*, 1997). Um zu untersuchen, ob es in PaCox17::ble-Stämmen zu einer Amplifikation von pDNA kommt, wurden die Stämme PaCox17::ble<sup>-</sup>-47690 und PaCox17::ble<sup>-</sup>-47692 für 300 Tage auf BMM und auf BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> angezogen. Nach 7, 21, 96, 157 und 300 Tagen wurde Myzel entnommen und daraus die Gesamt-DNA isoliert. Ein Aliquot dieser DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III geschnitten und einer Southern-Analyse unterzogen (siehe Abb. 43C). Als Sonde wurde Plasmid pSP17 verwendet, welches zwei Kopien des ersten *PaCoxI*-Introns (entspricht der pDNA) enthält. In einem parallelen Experiment – gleichsam als Kontrolle – wurde DNA zweier Wild-Stämme s<sup>-</sup>-47691 und -47693 untersucht. Dazu wurde Myzel im Alter von 7, 14, 21 Tagen und seneszenten Myzel eingesetzt, das Myzel wuchs entweder auf BMM oder auf BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> (siehe Abb. 44B). Bei derartigen Southern-Analysen lassen sich drei Fälle unterscheiden (Fragment-Nummern beziehen sich auf Abb. 43A):

- Die mtDNA ist intakt, es wurde keine pDNA amplifiziert: Die pDNA-Sonde hybridisiert lediglich mit zwei unterschiedlich langen *Bgl*III-Fragmenten der mtDNA. Diese Fragmente haben eine Länge von 4532 Bp (Fragment 5) und 1901 Bp (Fragment 17). Diese Situation ist mit juvenilen Wild-Stämmen vergleichbar.
- Die mtDNA ist zum größeren Teil intakt, pDNA wurde amplifiziert: Neben den *Bgl*III-Fragmenten 5 und 17 lassen sich Fragmente von etwa 2,5 kBp Länge erkennen, bei diesen Fragmenten handelt es sich um als zirkuläres Plasmid amplifizierte pDNA. Dies ist der Fall in mittelalten Wild-Stämmen.
- Die mtDNA ist zum größten Teil rearrangiert, die pDNA wurde in großen Mengen amplifiziert: Fragmente 5 und 17 nehmen in ihrer Intensität ab. Fragmente von 2,5 kBp (pDNA) sind prominent und erzielen teils sehr starke Signale. Diese Situation herrscht in seneszenten Wild-Stämmen vor.

Die untersuchten PaCox17::ble-Stämme zeigen in den ersten 300 Tagen ihres Lebens keinerlei Amplifikation von pDNA (siehe Abb. 43C). In diesem Merkmal gleichen sie Mutante grisea, die allerdings kein derartiges Alter erreicht. Während die Gabe von Kupfer(II)-Ionen in grisea die Amplifikation von pDNA induziert (Borghouts *et al.*, 1997), ließ sich bei PaCox17::ble-Stämmen nach 300 Tagen Wachstum auf BMM mit 250 µM Kupfer(II)-Ionen keinerlei pDNA nachweisen. Die *PaCoxI*-Region der mtDNA der mittelalten Mutante ist stabilisiert (siehe Abb. 43).



**Abbildung 43: Southern-Analyse der mitochondrialen PaCoxI-Region.** (A) Auszug aus der *Bgl*III-Restriktionskarte der *PaCoxI*- und *PaCyt b*-Region der mtDNA. Die Position des mit der pDNA-Sonde (dicker, schwarzer Balken) hybridisierenden *PaCoxI*-Introns und der *Bgl*III-Fragmente 5 und 17 ist angegeben. (B) DNA-Proben der Wild-Stämme s<sup>-</sup>-47691 und s<sup>-</sup>-47693 im Alter von 7, 14, 21 und 28 Tagen und seneszent (etwa 36 Tage). (C) DNA-Proben der Stämme PaCox17::ble<sup>-</sup>-47690 und PaCox17::ble<sup>-</sup>-47692 wurden im Alter von 7, 21, 96, 157 und 300 Tagen entnommen. (B und C) Die Stämme wurden auf BMM (linke Hälfte B und C) bzw. auf BMM mit 250 µM CuSO<sub>4</sub> (rechte Hälfte B und C) angezogen. Die DNA-Proben wurden mit *Bgl*III geschnitten, auf einem 1%-igen-Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit einer pDNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Signale, die den mtDNA Fragmenten 5 (4,5 kBp) und 17 (1,9 kBp) bzw. der amplifizierten pDNA (2,5 kBp) entsprechen, sind durch Pfeile kenntlich gemacht.

### Amplifikation von pDNA in seneszenten PaCox17::ble-Stämmen

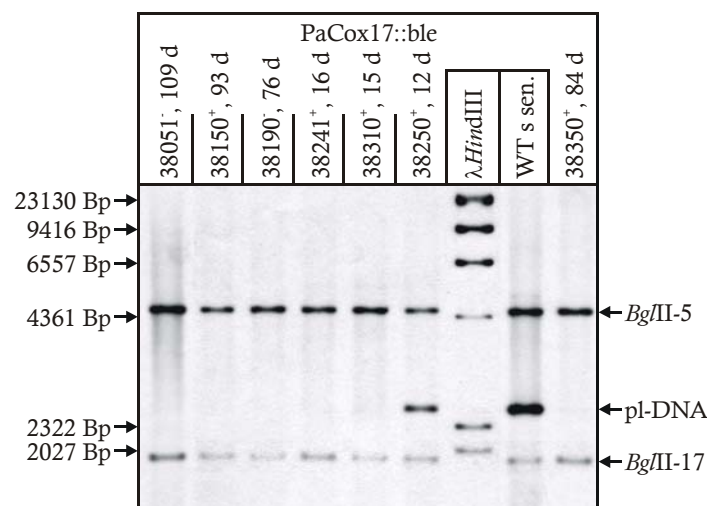
Um die Amplifikation von pDNA in seneszenten PaCox17::ble-Stämmen untersuchen zu können, mussten zuerst derartige Stämme generiert werden. Dazu wurden PaCox17::ble-Stämme mit seneszenten Wild-Stämmen gekreuzt. Es ist bekannt, daß die Nachkommen einer Kreuzung von seneszenten Stämmen eine wesentlich kürzere mittlere Lebensspanne aufweisen als Nachkommen einer Kreuzung mittelalter Stämme (Tudzynski, 1978).

Wird homokaryotisches seneszendes Myzel eines Paarungstyps mit Spermazien des anderen Paarungstyps überschwemmt, treten je nach Rasse 20%-90% „seneszente“ Sporen auf. Das Myzel derartiger Sporen stirbt kurz nach dem Auskeimen ab. Bei der reziproken Kreuzung sind alle Nachkommen juvenil (Tudzynski, 1978).

Es wurde postuliert, daß die Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble x WT<sub>seneszent</sub> einen relativ hohen Anteil kurzlebiger Stämme enthalten. Tatsächlich wurde eine Reihe kurzlebiger Wildstämme und PaCox17-Mutanten isoliert. Um die Amplifikation von plDNA in seneszentem Myzel zu untersuchen, wurde eine Southern-Analyse mit der plDNA-Sonde (Plasmid pSP17) durchgeführt (siehe Methoden). Die eingesetzten Stämme stammen aus den folgenden Kreuzungen:

- PaCox17::ble<sup>-</sup> (47690) X s<sup>+</sup> (690765) seneszent: PaCox17::ble-38051<sup>-</sup>, -38150<sup>+</sup>, -38241<sup>+</sup>, -38310<sup>+</sup> und -38250<sup>+</sup>.
- PaCox17::ble<sup>+</sup> (47631) X s<sup>-</sup> (690766) seneszent: PaCox17::ble-38190<sup>-</sup>.
- PaCox17::ble<sup>±</sup> (37312) X s<sup>-</sup> (690766) seneszent: PaCox17::ble-38350<sup>+</sup>.

Weiterhin wurde der mittelalte Wild-Stamm s<sup>+</sup>-47691 als Positiv-Kontrolle für amplifizierte plDNA eingesetzt (siehe Abb. 44).



**Abbildung 44: Southern-Analyse der mitochondrialen PaCoxI-Region seneszenter PaCox17::ble-Stämme.** DNA-Proben von sieben seneszenten PaCox17::ble-Stämmen und dem mittelalten (14 Tage) Wild-Stamm s<sup>+</sup>-47691 wurden mit BglIII geschnitten, auf einem 1%-igen-Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit einer plDNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Stammbezeichnungen und das Alter der Stämme sind oberhalb der Fotografie angegeben. Signale die den mtDNA Fragmenten 5 (4,5 kBp) und 17 (1,9 kBp) bzw. der amplifizierten plDNA (2,5 kBp) entsprechen sind auf der rechten Seite durch Pfeile kenntlich gemacht. Vergleiche Abb. 43A. Die Fragmentlängen des DNA-Längenstandards (HindIII-geschnittene DNA des Phagen λ) sind links neben der Fotografie angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

Erwartungsgemäß zeigt der seneszente Wild-Stamm deutlich die Amplifikation von plDNA. Erstaunlicherweise wurde auch in einem der sieben untersuchten PaCox17::ble-Stämme – in PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 – plDNA nachgewiesen (siehe Abb. 44). Hierbei handelt es sich um eine Ausnahme, bei allen anderen untersuchten PaCox17::ble-Stämmen konnte plDNA in keinem Fall nachgewiesen werden (vergl. Abb. 43).

Die Lebensspanne des Stammes PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 betrug interessanterweise lediglich 12 Tage, dies entspricht lediglich 3,2% der mittleren Lebensspanne der Mutante PaCox17::ble (siehe 3.4.6). Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich eventuell um einen Wildstamm handelt. Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 qualifiziert sich allerdings durch Bleocin-Resistenz, Hygromycin B-Sensitivität und Wachsrate als PaCox17::ble-Stamm. Seine Wachsrate beträgt 3,0 mm/Tag und liegt damit etwa 25% unter der durchschnittlichen Wachsrate von 3,9 mm/Tag der Mutante PaCox17::ble (siehe 3.4.6). Es kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, daß der Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 weitere Mutationen trägt. Die Charakteristika dieses Stammes könnten auch durch Gen-Konversion beeinflusst worden sein.

Falls es sich bei Stamm 38250<sup>+</sup> tatsächlich um eine PaCox17::ble-Mutante handelt, ist vermutlich der seneszente Eltern-Stamm für das Vorhandensein der pIDNA verantwortlich. Mitochondrien werden in *P. anserina* ausschließlich maternal vererbt. Wird postuliert, daß es sich bei dem maternalen Elter um den seneszenten Stamm der Kreuzung handelt und alle an die Nachkommen weitergegebenen Mitochondrien bereits pIDNA enthalten, so könnte die in PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 nachgewiesene pIDNA auf diesen Eltern-Stamm zurückzuführen sein. Dies wäre dann der Fall, wenn zirkuläre pIDNA in PaCox17::ble-Stämmen, zwar nicht neu gebildet, aber erhalten werden würde.

Die geschilderten Befunde zeigen einerseits, daß pIDNA in seneszenten PaCox17::ble-Stämme üblicherweise nicht in nachweisbaren Mengen enthalten ist. Andererseits hat die genetische Konstitution des maternalen Elters Einfluß auf die Lebensspanne (Tudzynski, 1978) und möglicherweise auch auf das Vorhandensein von pIDNA. Wird eine ausreichende Menge pIDNA durch einen Elter eingebracht, kann diese pIDNA in den Mitochondrien der Mutante PaCox17::ble möglicherweise propagiert werden (siehe 1.3.2.3).

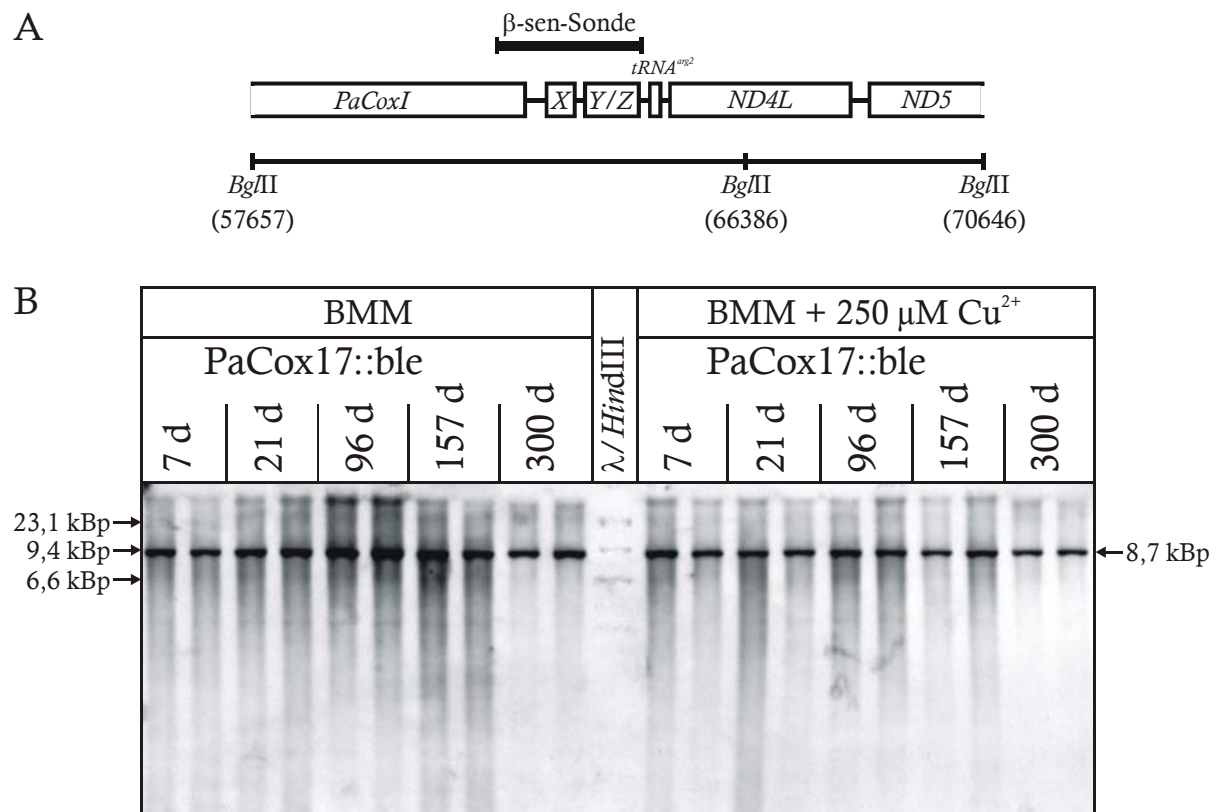
Die in Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-38250 nachgewiesene Menge pIDNA ist im Vergleich zum seneszenten Wildstamm relativ gering, sie entspricht eher einem 1-2 Wochen alten Wildstamm (siehe Abb. 44).

### **Bildung von $\beta$ -senDNAs**

Neben der Amplifikation der pIDNA kommt es in seneszenten Wild-Stämmen zur Bildung von  $\beta$ -senDNAs (siehe 1.3.2.3). Um weitere Befunde über die Stabilität der mtDNA der PaCox17::ble-Stämme zu erhalten, wurde die Bildung von  $\beta$ -senDNAs analysiert. Dies geschah durch die Hybridisierung der mtDNA mit einer Sonde gegen die  $\beta$ -senDNA. Dabei sind intakte mtDNA-Zirkel durch hybridisierende Fragmente von 8729 Bp charakterisiert. Destabilisierte bzw. rearrangierte Chondriome weisen zusätzliche, meist kürzere Fragmente ( $\beta$ -senDNAs) auf.

Von den Stämmen PaCox17::ble<sup>-</sup>-47690 und PaCox17::ble<sup>-</sup>-47692 wurden nach 7, 21, 96, 157 und 300 Tagen Wachstum auf BMM bzw. BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> Myzel-Proben entnommen. Die daraus präparierte, mit *Bg*/II geschnittene DNA wurde im Rahmen einer

Southern-Analyse mit einer  $\beta$ -senDNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Diese Sonde enthält die Kern-Region der  $\beta$ -senDNAs (siehe Methoden). Alle untersuchten Proben beider PaCox17::ble-Stämme wiesen nur bei 8,7 kBp ein Signal auf. In keinem Fall kam es zu einem Rearrangement der  $\beta$ -senDNA-Region. Zumindest während der ersten 300 Tage ist die mtDNA der Mutante PaCox17::ble wahrscheinlich stabilisiert. Selbst die hohe Kupfer-Supplementation des Mediums – während der gesamten Wachstumsperiode – vermochte die Bildung von  $\beta$ -senDNAs nicht zu induzieren. Die Gabe von 250  $\mu$ M Kupfer führte zu keiner Destabilisierung der mtDNA (siehe Abb. 45).



**Abbildung 45: Southern-Analyse der mitochondrialen  $\beta$ -senDNA-Region.** (A) Schema der für die Bildung der  $\beta$ -senDNA verantwortlichen Region der mtDNA. Die Position der Gene *PaCoxI*, *ND4L*, *ND5* und der *tRNA<sup>arg2</sup>* sind angegeben (*X*, *Y* und *Z* sind unbekannte Leseraster). Relevante Restriktions-Schnittstellen sind für *BglII* eingezeichnet. Die verwendete  $\beta$ -senDNA-Sonde ist als dicker, schwarzer Balken oberhalb von *X*, *Y* und *Z* dargestellt. (B) Die analysierten Stämme wurden auf BMM (linke Hälfte) bzw. auf BMM mit 250  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub> (rechte Hälfte) angezogen. DNA-Proben der Stämme PaCox17::ble<sup>-47690</sup> und PaCox17::ble<sup>-47692</sup> wurden im Alter von 7, 21, 96, 157 und 300 Tagen entnommen. Die DNA-Proben wurden mit *BglII* geschnitten, auf einem 1%-igen-Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit einer  $\beta$ -senDNA-spezifischen Sonde hybridisiert (siehe Methoden). Die Position des mitochondrialen *BglII*-Fragments (8,7 kBp) ist rechts der Fotografie durch einen Pfeil angegeben. Relevante Fragmentlängen des DNA-Längenstandards (*HindIII*-geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$ ) sind links neben der Fotografie angegeben.

Die Stabilisierung der mtDNA korrelierte bei den Mutanten *grisea*, *ex1*, *cox5::BLE* und *mex* mit der Verlängerung der Lebensspanne. Dementsprechend wurde vermutet, daß auch die Lebensspanne von Mutante PaCox17::ble gegenüber dem Wild-Stamm verlängert sein könnte.

### 3.4.6 Die Lebensspanne von PaCox17::ble-Mutanten ist signifikant verlängert

Schlussendlich stellte sich die Frage, ob die Disruption von *PaCox17*, und die daraus resultierenden physiologischen und metabolischen Effekte, sowie die Stabilisierung der mtDNA, die Lebensspanne beeinflussen. Die Kupfer-Mangelmutante *grisea* weist eine im Vergleich zum Wild-Stamm um 60% verlängerte mittlere Lebensspanne auf (Marbach *et al.*, 1994; Prillinger und Esser, 1977). Da PaCox17::ble-Stämme – ähnlich wie Mutante *grisea* – den alternativen Atmungsweg nutzen und ein stabilisiertes Chondriom besitzen, wurde eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne erwartet. Um statistisch relevante Aussagen treffen zu können, wurde die Sekundär-Transformante PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 mit dem Wild-Stamm s<sup>-</sup>-690766 gekreuzt.

#### Tetraden-Analyse der zur Bestimmung der Lebensspanne relevanten Stämme

Aus Kreuzungen der Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 und s<sup>-</sup>-690766 gingen 52 Tetraden hervor.

Die Keimungsrate der isolierten Ascosporen dieser Tetraden lag bei 93,5% (siehe Tab. 17).

Insgesamt wurden 52 Asci isoliert. Da jeder Ascus 8 Kerne enthält, sollten die 52 untersuchten Asci dementsprechend 416 Kerne enthalten. Es wurden insgesamt 139 einkernige Sporen (139 Kerne) und 137 zweikernige Sporen (274 Kerne) untersucht (siehe Tab. 17). Dies ergibt insgesamt eine Summe von 276 Sporen mit 413 Kernen. Die Differenz von drei Kernen ist auf bei der Isolation verlorene Sporen zurückzuführen.

**Tabelle 17: Bestimmung der Sporenkeimungsrate der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766.** Bei der Isolation von 52 Asci der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766 wurden insgesamt 276 Sporen isoliert von denen 258 auskeimten, die Keimungsrate lag bei 93,5%. Zwischen monokaryotischen und dikaryotischen bzw. Wild-Stamm und Mutanten-Sporen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. PaCox17::ble-Stämme wurden durch ihre Bleocin-Resistenz von Wild-Stämmen unterschieden. Etwa 50% der PaCox17::ble-Stämme wurden durch Southern-Analysen verifiziert (nicht gezeigt). Weitere Erklärungen siehe Text.

Phänotyp und Genotyp der Sporen	Anzahl isolierter Sporen	Anzahl gekeimter Sporen	Anzahl nicht gekeimter Sporen	Keimungsrate in Prozent
Wild-Stamm s, monokaryotisch	70	65	5	93 %
PaCox17::ble, monokaryotisch	69	62	7	90 %
Wild-Stamm s, dikaryotisch	12	12	-	100 %
PaCox17::ble, dikaryotisch	14	13	1	93 %
WT + PaCox17::ble, dikaryotisch	111	106	5	95,5 %
Summe:	276	258	18	93,5 %

Die Keimungsrate monokaryotischer Ascosporen der PaCox17::ble-Stämme (90%) unterschied sich nicht signifikant von der Keimungsrate monokaryotischer Wild-Stämme (93%). Auch die Keimungsrate dikaryotischer Sporen [Wild-Stämme (100%), PaCox17::ble-Stämme (93%) und Heterokaryen (95,5%)] lag in diesem Bereich (siehe Tab. 17).

Die anschließend durchgeführte Tetraden-Analyse zeigte, daß der Phänotyp der Mutante PaCox17::ble (langsames Wachstum, reduziertes Luftmyzel, etc.) strikt an Bleocin-Resistenz

gekoppelt war. Weiterhin wiesen sowohl Mutanten-Phänotyp als auch Bleocin-Resistenz eine Post-Reduktions-Frequenz (“second strand division“) von 79% auf: Insgesamt wurden 52 auswertbare Asci der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766 analysiert, davon waren 11 präreduziert und 41 postreduziert.

$$\text{Post-Reduktions-Frequenz} = \frac{41 * 100 \%}{52} = \underline{\underline{78,85 \%}}$$

Dieser Befund vermittelt grundlegende Informationen darüber, an welcher Position das Bleocin-Gen der Mutante – und entsprechend *PaCox17* in Wild-Stämmen – auf dem Chromosom lokalisiert ist. So konnte ein Abstand von  $78,85 / 2 = 39,42 = \underline{\underline{39,4 \text{ cM}}}$  berechnet werden.

### **Wuchsrate der Mutante PaCox17::ble**

Bei der Tetraden-Analyse der Mutante PaCox17::ble wurde die im Vergleich zu Wild-Stämmen reduzierte Wuchsrate bestätigt. Die Wuchsrate der Mutante PaCox17::ble ist von Interesse, da sie die Lebensspanne in cm (Wuchsstrecke) beeinflusst. Um die Wuchsrate statistisch relevant zu bestimmen, wurden 60 PaCox17::ble-Stämmen (Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766) analysiert (siehe Methoden). Die durchschnittliche Wuchsrate lag bei  $3,87 \pm 0,15$  mm pro Tag. Die minimale bzw. maximale Wuchsrate eines PaCox17::ble-Stammes lag bei 3,55 mm/Tag (PaCox17::ble<sup>+</sup>-38803) bzw. 4,20 mm/Tag (PaCox17::ble<sup>+</sup>-38721), vergleiche Tabelle 23. Als Referenz wurde die durchschnittliche Wuchsrate von 20 Wild-Stämmen (ebenfalls Nachkommen der Kreuzung: PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766) berechnet, sie lag bei  $6,53 \pm 0,5$  mm/Tag. Die durchschnittliche Wuchsrate der analysierten Wild-Stämme ähnelt dem Literaturwert von  $6,8 \pm 0,3$  (Lorin *et al.*, 2001) bzw.  $7,4 \pm 0,2$  mm/Tag (Esser und Keller, 1976) Minimale bzw. maximale Wuchsraten lagen bei 5,8 mm/Tag (Stamm s<sup>-</sup>-38341) bzw. 7,3 mm/Tag (Stamm s<sup>+</sup>-38921), vergleiche Tabelle 23.

Trotzdem Mutante PaCox17::ble nur etwa 60% der Wuchsrate der parallel untersuchten Wild-Stämme zeigt, ist ihre Wuchsstrecke gegenüber dem Wild-Stamm signifikant verlängert.



### Die Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble

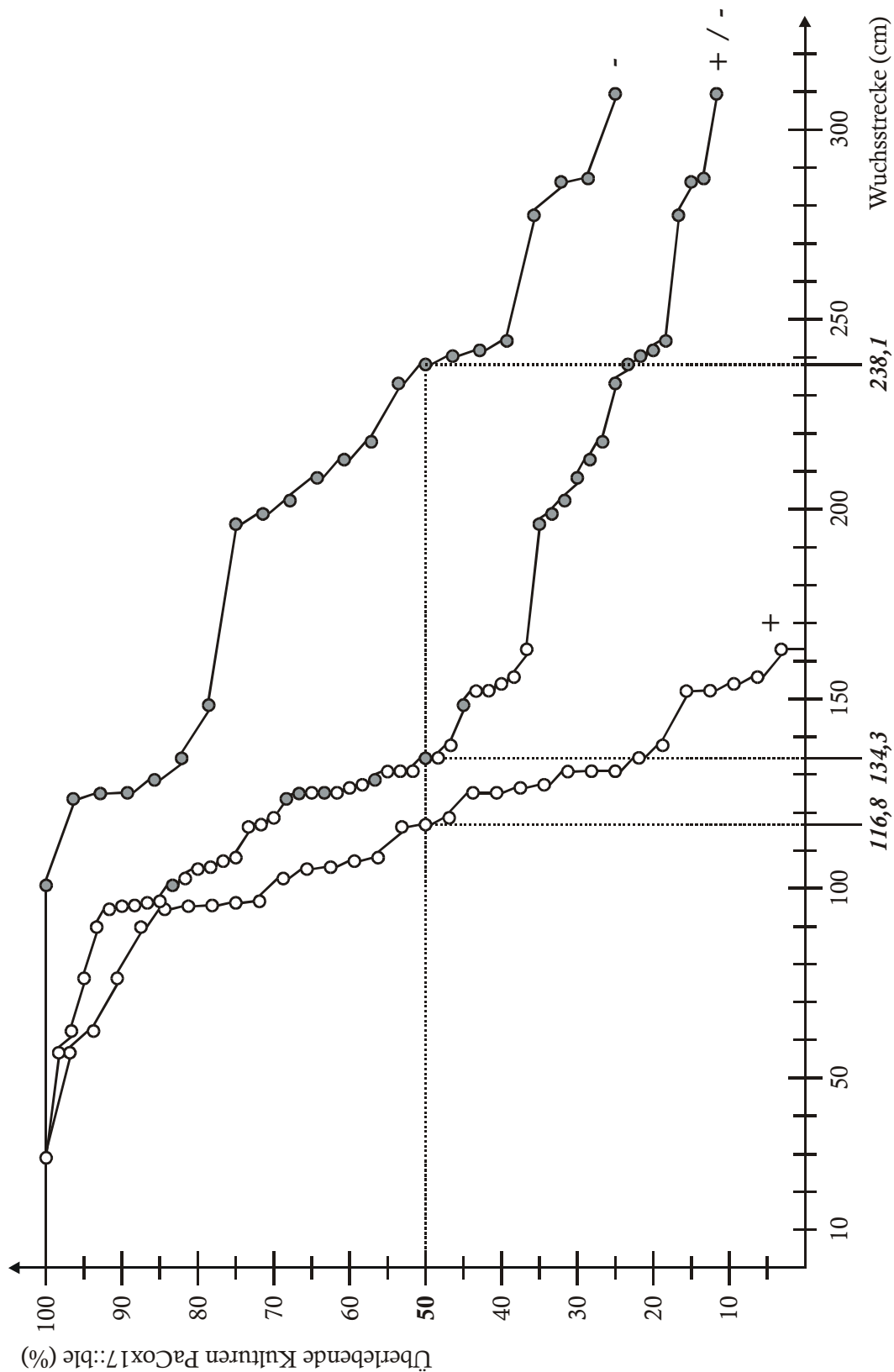
Die aus der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766 resultierenden monokaryotischen Ascosporen wurden isoliert und auf Amonium-Acetat Medium zum Keimen gebracht (siehe Methoden). 60 homokaryotische Stämme mit PaCox17::ble-Mutation [*mat*<sup>+</sup> (n=32); *mat*<sup>-</sup> (n=28)] und 20 Wild-Stämme [*mat*<sup>+</sup> (n=11); *mat*<sup>-</sup> (n=9)] wurden bezüglich ihrer mittleren und maximalen Wuchsstrecke analysiert (siehe Tab. 23). Die Wuchsspanne der einzelnen Isolate wurde in Rennrohren gemessen (siehe Methoden).

Bei Wachstum auf BMM beträgt die mittlere Wuchsstrecke der 60 analysierten PaCox17::ble-Stämme 134,3 cm. Es zeigten sich Paarungstyp-abhängige Unterschiede: Stämme mit Paarungstyp „plus“ wiesen eine mittlere Wuchsstrecke von 116,8 cm auf, die maximal erreichte Wuchsstrecke beträgt 163,0 cm (Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-38322). Stämme mit Paarungstyp „minus“ wuchsen deutlich weiter, ihre mittlere Wuchsstrecke lag bei 238,1 cm. Die maximale Wuchsstrecke (größer 345 cm) konnte bisher nicht bestimmt werden.

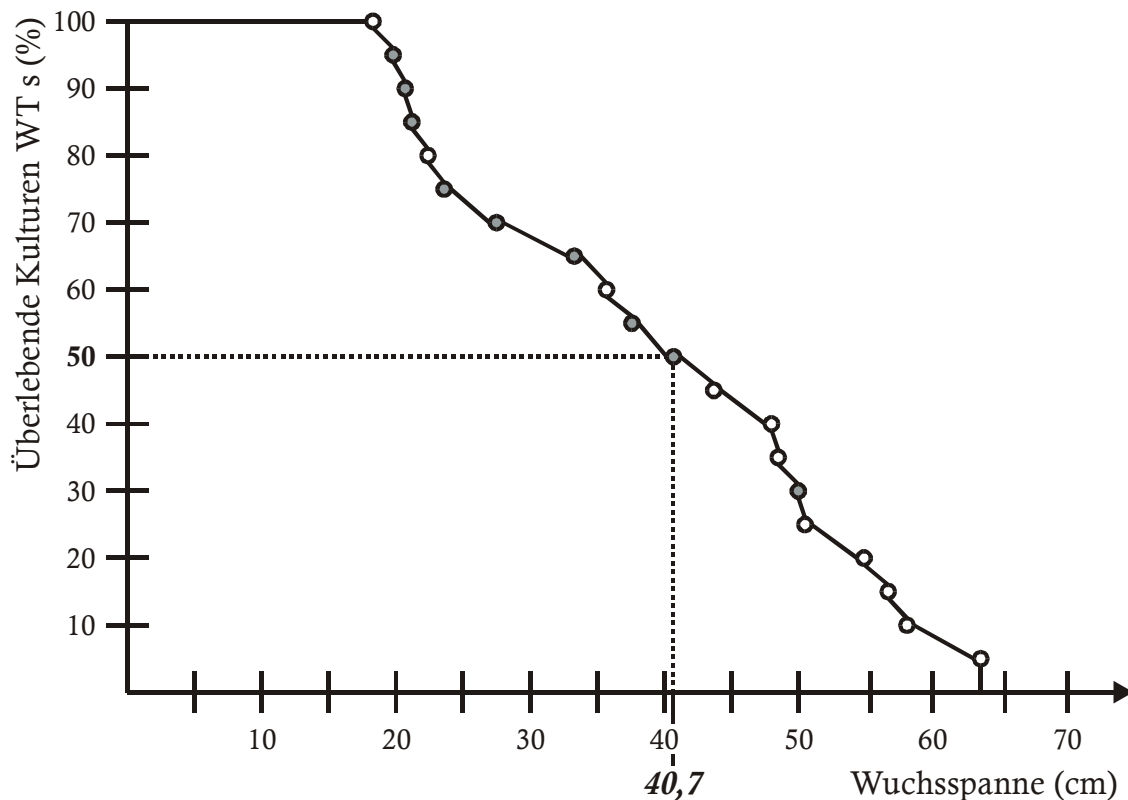
Der Befund, daß einige Stämme einen mit dem Paarungstyp korrelierenden Unterschied in der mittlere Lebensspanne aufweisen, wurde bereits von Tudzynski (1978) beschrieben. Bei einige Rassen wachsen Stämme mit dem Paarungstyp „plus“ signifikant länger als ansonsten isogene Stämme des Paarungstyps „minus“ (Tudzynski, 1978). In jüngerer Zeit konnten diese Befunde durch die Analyse mehrere Stämme untermauert werden, deren Klone sich ebenfalls entsprechend ihres Paarungstyps in ihrer Lebensspanne unterscheiden. Ein Beispiel ist die langlebige Mutante *cox5::BLE*, deren mittlere Wuchsstrecke bei Stämmen des Paarungstyps „minus“ 217% der „Plus“-Stämme beträgt (Lorin *et al.*, 2001).

Die mittlere und die maximale Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble sind, trotz verminderter Wachstumsrate, gegenüber dem Wild-Stamm s signifikant verlängert (siehe Abb. 46 und 47).

Erstaunlicherweise wiesen auch die 20 homokaryotischen Wild-Stämme (Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766) eine, im Vergleich zu dem Literaturwert von 11,0 cm (Dufour *et al.*, 2000), deutlich verlängerte Wuchsstrecke (370%) auf. Die mittlere Wuchsstrecke betrug 40,7 cm und die maximale Wuchsstrecke 63,6 cm (Stamm s<sup>+</sup>-38321; siehe Abb. 47, siehe Tabelle 23). Dabei traten, wie zuvor bei Mutante PaCox17::ble, Paarungstyp-abhängige Unterschiede auf. Im Gegensatz zu Mutante PaCox17::ble ist die mittlere Wuchsstrecke der „Plus“-Stämme (48,5 cm) länger als die der „Minus“-Stämme (27,5 cm). Verglichen mit den 20 genannten Wild-Stämmen ist die mittlere Wuchsstrecke der Mutante signifikant (etwa 287%) verlängert.



**Abbildung 46: Analyse der Wuchsstrecke von 60 PaCox17::ble-Stämmen.** Nach Kreuzung der Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 und s<sup>-</sup>-690766 wurde die Wuchsstrecke von 60 homokaryotischen PaCox17::ble-Stämmen bestimmt. Die Wuchsstrecke ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Die obere, linke Kurve symbolisiert die Wuchsstrecke der 28 Stämme mit Paarungstyp „minus“. Die untere, rechte Kurve symbolisiert die 32 Stämme mit Paarungstyp „plus“. Die mittlere Kurve integriert beide Paarungstypen. Weiße Kreise: Todestag eines Stammes mit Paarungstyp „plus“, Graue Kreise: Paarungstyp „minus“. Halbmaximale Wuchsstrecken sind in kursiven Zahlen angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.



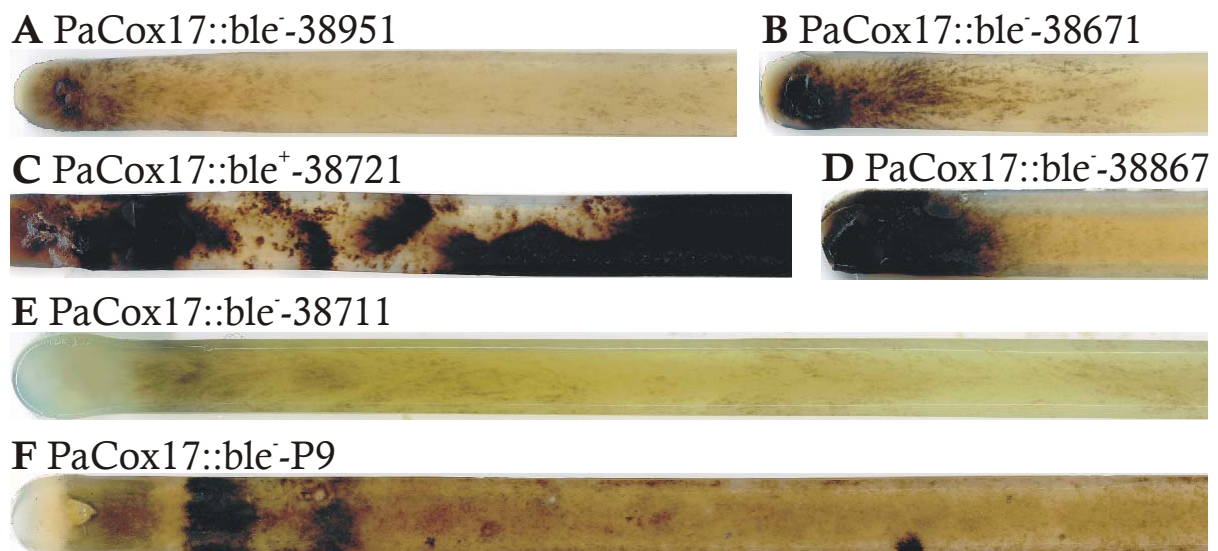
**Abbildung 47: Analyse der Wuchsstrecke von 20 Wild-Stämmen.** Nach Kreuzung der Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 und s<sup>-</sup>-690766 wurde die Wuchsstrecke von 20 homokaryotischen Wild-Stämmen bestimmt. Die Wuchsstrecke ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Weiße Kreise: Todestag eines Stammes mit Paarungstyp „plus“, Graue Kreise: Paarungstyp „minus“. Die halbmaximale Wuchsstrecke (40,7 cm) ist kursiv angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

### Die Lebensspanne der Mutante PaCox17::ble

Neben der Analyse der Wuchsstrecke wurden die beschriebenen 60 homokaryotischen PaCox17::ble-Mutanten [*mat*<sup>+</sup> (n=32); *mat*<sup>-</sup> (n=28)] und die 20 Wild-Stämme [*mat*<sup>+</sup> (n=11); *mat*<sup>-</sup> (n=9)] bezüglich ihrer mittleren Lebensspanne analysiert (siehe Methoden).

Nach über 875 Tagen Wachstum in Rennrohren (auf BMM) wurden 54 Kulturen seneszent und stellten das Wachstum ein. 6 Stämme wuchsen länger als 875 Tage (siehe Tab. 23). Lediglich in einer relativ kurzen Zeitspanne (meist nur wenige Tage, während einer kurzen Wuchsstrecke von einigen Zentimetern) wurden klassische Seneszenz-Symptome entwickelt: Dabei veränderten sich Pigmentierung und Bildung von Luftmyzel, das Wachstum wurde unregelmäßig bis es schließlich ganz eingestellt wurde. Mit einer Einschränkung zeigten die analysierten Stämme, während ihres Wachstums, keinerlei Anzeichen von Seneszenz. Einige Stämme verminderten nach längerem Wachstum auf BMM ihre Pigment-Produktion, das Myzel wurde nahezu farblos. Trotzdem sind diese Stämme weiterhin befähigt Pigmente zu bilden. Dies soll anhand folgender Beispiele dokumentiert werden (siehe Abb. 48):

- Der Stamm PaCox17::ble-38721 wuchs etwa 12 cm mit partiell reduzierter Pigment-Bildung bei gleichbleibender Wachsrates, im Anschluss zeigt der Stamm die für PaCox17::ble-Stämme typische Pigmentierung (Abb. 48C).
- Die Primärtransformante PaCox17::ble-P9 wuchs bereits mehrere Wochen ohne erkennbare Pigmentierung, zeigte jedoch nach dem Überimpfen während einer kurzen Wuchsphase (etwa 4 cm) sehr starke Pigmentierung, die sich anschließend abschwächte und zu kontinuierlicher Hypo-Pigmentierung überging (Abb. 48F).
- Die Stämme PaCox17::ble-38951 (Abb. 48A), -38671 (Abb. 48B) und -38867 (Abb. 48D) wuchsen mehrere Wochen ohne Pigmentierung auf BMM. Nach dem Überimpfen auf neue Rennrohre wurde die Pigment-Bildung induziert. Nach einigen cm Wachstum wurde die Pigment-Bildung wiederum eingestellt.



**Abbildung 48: Unterschiede in der Pigmentbildung einiger PaCox17::ble-Stämme.** (A, B, D) Die Stämme PaCox17::ble-38951 (A), -38671 (B) und -38867 (D) wuchsen ohne erkennbare Pigmentierung auf BMM, nach dem Überimpfen auf neue Rennrohre bildeten sie – mit abnehmender Tendenz - einige Tage lange Pigmente. Nach einigen cm Wachstum wurde die Pigmentbildung eingestellt. (C) Der Stamm PaCox17::ble-38721 wuchs nach dem Überimpfen etwa 4 cm mit starker, dunkler Pigmentierung, nachschließend traten während etwa 12 cm Pigmentierungs-Lücken auf, schließlich wurde die Pigmentierung einheitlich dunkel, und blieb für den Rest der Lebensspanne dunkel. In der Phase der Pigmentierungs-Lücken konnte keine Verlangsamung des Wachstums festgestellt werden. (E, F) Die Stämme PaCox17::ble-38711 (E) und PaCox17::ble-P9 (F; eine Primärtransformante) wuchsen nach dem Überimpfen mit relativ geringer Pigmentierung, zeigten dann eine Phase erhöhter Pigmentierung, die anschließend immer schwächer wurde und schließlich zu Wachstum mit geringer Pigmentierung führte. (A-F) Alle abgebildeten Stämme wuchsen im Anschluss an die hier abgebildeten Wuchs-Abschnitte minimal einen weiteren Monat ohne weitere Anzeichen von Seneszenz.

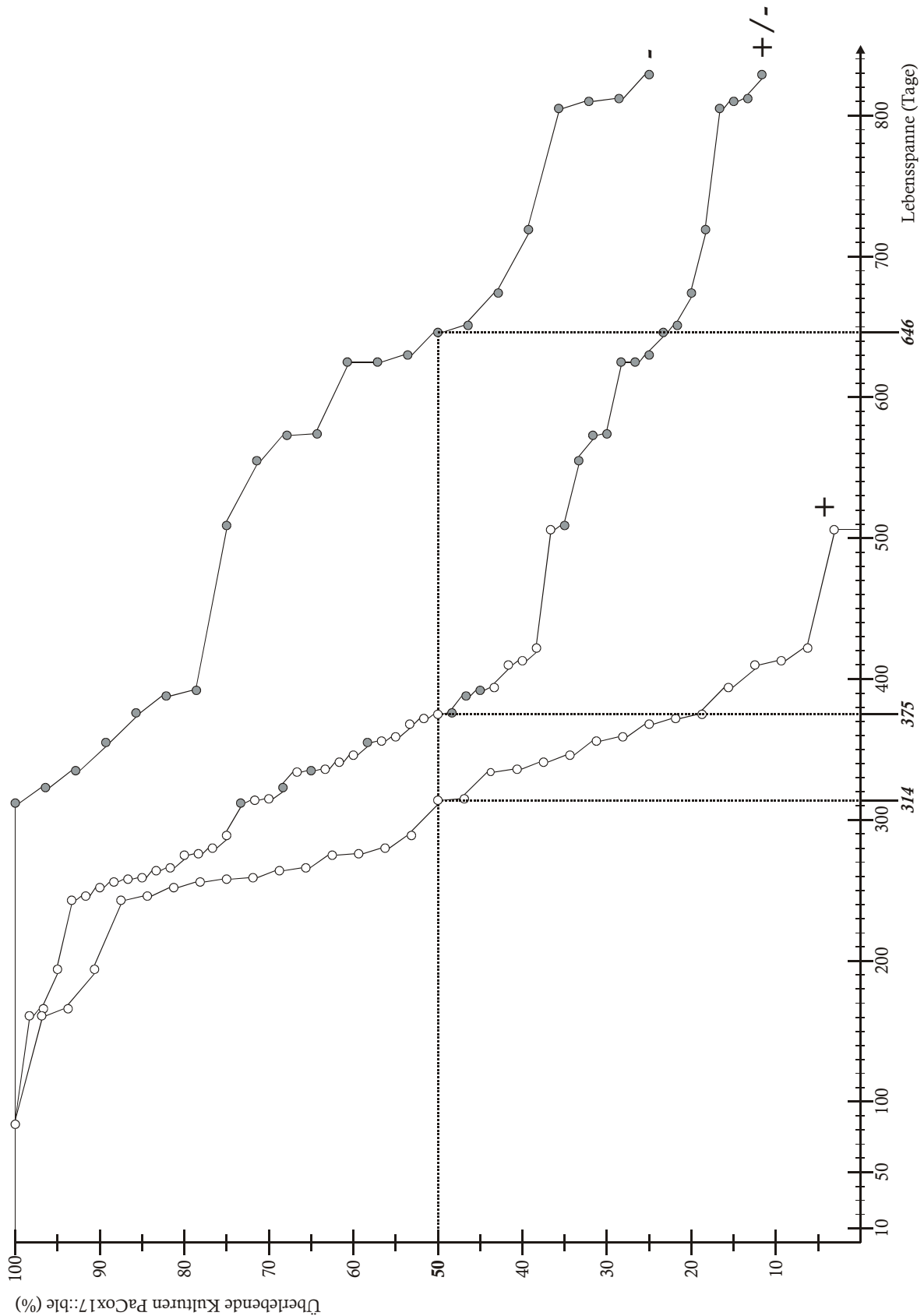
Vermutlich ist der temporäre Pigment-Mangel nicht auf einen Gendefekt zurückzuführen, vielmehr könnten die Ursachen regulatorischer Natur sein. Es ließe sich postulieren, daß die Pigment-Synthese aufgrund von ATP-Mangel reduziert wurde, um essenzielle Funktionen der Zelle aufrecht zu erhalten.

### **Bestimmung der mittleren Lebensspanne**

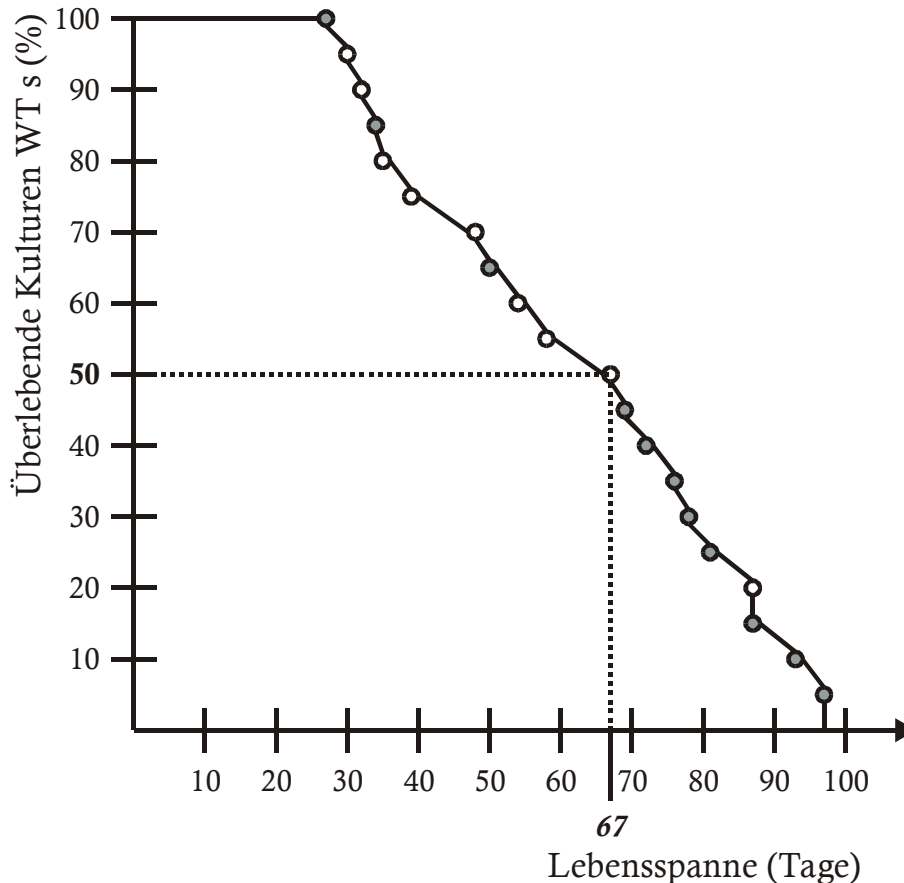
54 der 60 bezüglich ihrer Lebensspanne untersuchten PaCox17::ble-Stämme konnten bis zu ihrem Wuchsstopp kultiviert werden. Die mittlere Lebensspanne wurde auf 375 Tage datiert. Sie übertrifft damit den Literaturwert der mittleren Lebensspanne des Wild-Stammes s (30 Tage; Tudzynski und Esser, 1977) um 1250%. Einzelne PaCox17::ble-Stämme zeigen Unterschiede in der Lebensspanne, die mit dem Paarungstyp korrelieren: Stämme mit Paarungstyp „plus“ wiesen eine mittlere Lebensspanne von 314 Tagen auf, die maximal erreichte Lebensspanne lag bei 506 Tagen (Stamm PaCox17::ble<sup>+</sup>-38322). Stämme mit Paarungstyp „minus“ leben deutlich länger, ihre mittlere Lebensspanne lag bei 646 Tagen. Die maximale Lebensspanne konnte bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bestimmt werden, sie überschreitet 900 Tage (siehe Tab. 23, siehe Abb. 49).

Auch die 20 homokaryotischen Wild-Stämme der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766 zeigten eine, im Vergleich zu bekannten Literaturwerten, verlängerte Lebensspanne. Die mittlere Lebensspanne lag bei 67 Tagen und die maximale Lebensspanne bei 97 Tagen (siehe Abb. 50). Dabei traten, wie zuvor bei Mutante PaCox17::ble, Paarungstyp-abhängige Unterschiede auf. Im Gegensatz zur Mutante ist die mittlere Lebensspanne der „Plus“-Stämme (78 Tage) länger als die der „Minus“-Stämme (54 Tage). Verglichen mit den 20 analysierten Wild-Stämmen ist die mittlere Lebensspanne der Mutante signifikant (etwa 560%) verlängert.

Der Literaturwert der mittleren Lebensspanne des Stammes s auf BMM beträgt 30 Tage (Tudzynski und Esser, 1977). Damit liegt die Verlängerung der mittleren Lebensspanne der in dieser Arbeit untersuchten 20 Wild-Stämme statistisch bei etwa 223% des ursprünglich charakterisierten Wild-Stammes s (siehe Tab. 23).



**Abbildung 49: Analyse der Lebensspanne von 60 PaCox17::ble-Stämmen.** Nach Kreuzung der Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup> (37312) und s<sup>-</sup> (690766) wurde die Lebensspanne von 60 homokaryotischen PaCox17::ble-Nachkommen bestimmt. Die Lebensspanne ist in Tagen, die Überlebensrate ist in Prozent angegeben. Dabei wurde nach Paarungstyp differenziert. Die obere Kurve symbolisiert die Lebensspannen der 28 Stämme mit Paarungstyp „minus“. Die untere Kurve bezieht sich auf 32 Stämme mit Paarungstyp „plus“. Die mittlere Kurve integriert beide Paarungstypen. Kreise mit weißer Füllung symbolisieren den Todestag eines Stammes mit Paarungstyp „plus“, Kreise mit grauer Füllung beziehen sich auf Paarungstyp „minus“. Halbmaximale Lebensspannen sind durch kursive Zahlen unterhalb der Abszisse angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.



**Abbildung 50: Analyse der Lebensspanne von 20 Wild-Stämmen.** Nach Kreuzung der Stämme PaCox17::ble<sup>+</sup> (37312) und s<sup>-</sup> (690766) wurde die Lebensspanne von 20 homokaryotischen Wild-Stämmen s bestimmt. Die Lebensspanne ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Kreise mit weisser Füllung symbolisieren den Todestag eines Stammes mit Paarungstyp „plus“, Kreise mit grauer Füllung beziehen sich auf Paarungstyp „minus“. Die halbmaximale Lebensspanne ist unterhalb der Abszisse als kursive Zahl angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

Die Mutante PaCox17::ble weist eine stark verlängerte Lebensspanne auf. Die beobachteten physiologischen Veränderungen der PaCox17-Nullmutante belegen klar Zusammenhänge zwischen Kupferstoffwechsel, Ontogenese, Respiration, oxidativem Stress und Alterung.

Trotz beeindruckender Verlängerung der Lebensspanne und der Wuchsstrecke sind PaCox17::ble-Stämme nicht unsterblich. Würde neben PaCOX17 eine weitere Komponente des Kupfer-Transportweges zur COX ausgeschaltet werden, ließen sich möglicherweise geringste Kupfer-Leckströme unterbinden, die in PaCox17::ble-Stämmen die COX noch erreichen. Ein vielversprechender Kandidat wäre PaSCO1, ein Assemblierungsfaktor der COX.

### 3.5 Das *P. anserina*-Gen *PaScol*

Die Konstruktion der *PaCox17*-Deletionsmutante war das formulierte Hauptziel der vorliegenden Arbeit. Neben den beschriebenen Untersuchungen war auch die Identifizierung und Isolation von *PaScol* von Interesse. Denn das putative *P. anserina*-Gen *PaScol* kodiert vermutlich das mitochondriale Kupferchaperon PaSCO1, welches Kupfer vermutlich von PaCOX17 übernimmt und in COX2 inseriert. Während PaCOX17 vermutlich für den Kupfer-Transport zu COX1 und COX2 essenziell ist, wird PaSCO1 wahrscheinlich nur für die Insertion von Kupfer in COX1 benötigt. Im Rahmen weiterführender Arbeiten könnte die vergleichende Analyse einer *PaCox17*- und einer *PaScol*-Mutante wertvolle Einblicke in den Kupfer-Metabolismus von *P. anserina* liefern. Weiterhin wäre auch die Konstruktion und Charakterisierung einer *PaCox17/PaScol*-Doppelnulmutante von Interesse, da in Mutante *PaCox17::ble* bei Wachstum in Kupfer-reichem Medium möglicherweise geringe Mengen Kupfer zur COX transportiert werden, und dadurch sehr geringe COX-Aktivität induzieren. In der *PaCox17/PaScol*-Doppelnulmutante wären diese „Leckströme“ möglicherweise unterbrochen.

Die Tatsache, daß *Scol* in *S. cerevisiae*, *Homo sapiens* und anderen Spezies identifiziert und charakterisiert wurde, legt die Existenz eines *P. anserina*-Homologs nahe (Schulze und Rödel, 1988; Petruzzella *et al.*, 1998; Paret *et al.*, 1999). Darüber hinaus wurden *Scol*-Homologe auch in den Bakterien *Rhodobacter capsulatus* und *Bacillus subtilis* beschrieben (Buggy und Bauer, 1995; Mattatall *et al.*, 2000). Die Proteinsequenz-Datenbank des NCBI enthält Einträge zu SCO1-Homologen mehrerer Spezies (siehe Tab. 18).

**Tabelle 18: Vorkommen von SCO1-Homologen in diversen Spezies.** Diese Tabelle benennt einige Spezies, die ein zu SCO1 homologes Protein enthalten. Als Quelle dienen die Proteindatenbanken des NCBI (Altschul *et al.*, 1997). Gesucht wurden Homologien zum SCO1-Protein der Hefe *S. cerevisiae* und des Ascomyceten *N. crassa*. Der Homologievergleich wurde auf Proteinebene durchgeführt.

<b>Pilze:</b>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida albicans</i>	
<b>Tiere:</b>	<i>Mus musculus</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Apis mellifera</i>
	<i>Rattus norvegicus</i>	<i>Gallus gallus</i>	<i>Scutigera coleoptrata</i>
	<i>Homo sapiens</i>		
<b>Pflanzen:</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>		
<b>Bakterien:</b>	<i>Agrobacterium spec.</i>	<i>Anaplasma spec.</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
	<i>Brucella melitensis</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Caulobacter crescentus</i>
	<i>Cowdria ruminantium</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>
	<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Pseudomonas spec.</i>
	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>Rhodobacter spec.</i>	<i>Rhodovulum sulfidophilum</i>
	<i>Rickettsia spec.</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<i>Vibrio cholerae</i>



### 3.5.1 Identifizierung und Isolation von *PaScol*

#### Identifizierung von *PaScol* durch Komplementation einer *Scol*-Defektmutante von *S. cerevisiae*

Um *PaScol* in *P. anserina* zu identifizieren, wurde versucht eine *S. cerevisiae Scol*-Defektmutante zu komplementieren.

Die *Scol*-Nullmutante wurde freundlicherweise von Dr. A. Tzagoloff (USA) zur Verfügung gestellt, es handelt sich dabei um den Stamm aW303 $\Delta$ SCO1 (Glerum *et al.*, 1996b).

Diese atmungsdefiziente Mutante wurde mit einer *P. anserina* cDNA Bank transformiert. Dabei befinden sich die cDNAs in dem Hefe-Expressionsvektor pAD4. Insgesamt wurden etwa 129.000 Hefe-Transformanten analysiert (siehe Methoden). Keine der Transformanten war atmungskompetent. Das vermutete *P. anserina* Homolog von *Scol* ist höchstwahrscheinlich nicht in der Lage eine *S. cerevisiae Scol*-Defektmutante zu komplementieren. Auf funktioneller Ebene scheint *Scol* gering konserviert zu sein: Ein humanes *Scol*-Homolog kann eine Hefe-Defektmutante nicht komplementieren. Allerdings ist ein chimäres *Scol* bestehend aus einem aminoterminalen Hefeanteil und einem carboxyterminalen Teil des Proteins des Menschen in der Lage, eine *Scol*-Hefemutante zu komplementieren (Paret *et al.*, 2000). Anders als für die Isolation von *PaCox17* (Stumpferl *et al.*, 2004) scheint die Komplementation einer *Scol*-Defektmutante der Hefe zur Isolation von *PaScol* nicht geeignet zu sein.

#### Identifizierung und Isolation von *PaScol* mittels heterologer Hybridisierung

Aufgrund der geschilderten Problematik wurde eine alternative Strategie verfolgt. Das Genom von *N. crassa*, das zum Teil in sequenzierter Form vorliegt (MIPS *N. crassa* Datenbank), wurde *in silico* auf die Existenz von Sequenzen mit Homologie zum *Scol* der Hefe untersucht (siehe Methoden). Innerhalb des bekannten Bereichs konnte eine entsprechende Sequenz, ein potenzielles *NcScol* identifiziert werden (siehe Abb. 51).

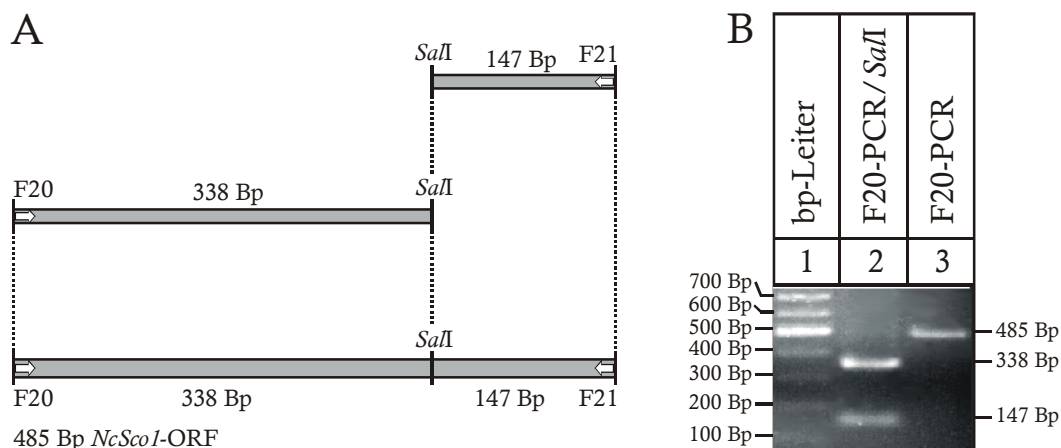
```

          F20
1  cgctttcaca cattcaagct cgctgaccaa atcctttact tttgtacagg tctacttcgg
   a f t h s s s l t k s f t f v q v y f
61  cttcagccac tgccccgaca tctgccccga ggagcttgac aagatggcgg ccatgttcga
   g f s h c p d i c p e e l d k m a a m f
121 aaaggtggag gccgagcgtc ccggcgctct caagcctgtc tttgttacct gcgatccggc
   e k v e a e r p g a l k p v f v t c d p
181 gcgcgatacc ccccaggtgc tcaaggagta cttggccgag ttccaccccc tgttcatcgg
   a r d t p q v l k e y l a e f h p l f i
241 cttgacgggc acatacgacc agatcaaggc catgtgcaag gcgtaccgcy tctacttcag
   g l t g t y d q i k a m c k a y r v y f
301 cactccctcc aaggctgagc ctggccagga ctacctcGTC GACcacagca tctacttcta
   s t p s k v e p g q d y l v d h s i y f
361 cctgatggat cccgagggty atttcgttga ggcccttggc cgccaacact cgcctgacca
   y l m d p e g d f v e a l g r q h s p d
421 ggctgccaaag gtgatcttgg accacatgaa ggattggcag ggtaagtgga agaaggatta
   q a a k v i l d h m k d w q g k w k k d
481 ggcgg
   - a

```

**Abbildung 51: Teilsequenz des *N. crassa* *NcSco1*.** Gezeigt ist der durch PCR amplifizierte Teil von *NcSco1*. Unterhalb der DNA Sequenz ist ein Teil der putativen Aminosäuresequenz von *NcSCO1* angegeben. Die Oligonukleotide F20 (Sequenz fett gedruckt) und F21 (Sequenz des komplementären Stranges fett gedruckt) wurden zur PCR-Amplifikation des gezeigten DNA Abschnitts verwendet. Die Sequenz der *SalI*-Stelle ist in Großbuchstaben (fett) angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

Nach der Konstruktion der Oligonukleotide F20 und F21 wurde eine PCR mit genomischer DNA von *N. crassa* durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt entsprach der erwarteten Länge von 485 Bp. Es wurde durch eine Restriktions-Analyse belegt (siehe Methoden). Der amplifizierte Bereich beinhaltet einen Teil des ORF von *NcSco1* (siehe Abb. 52).

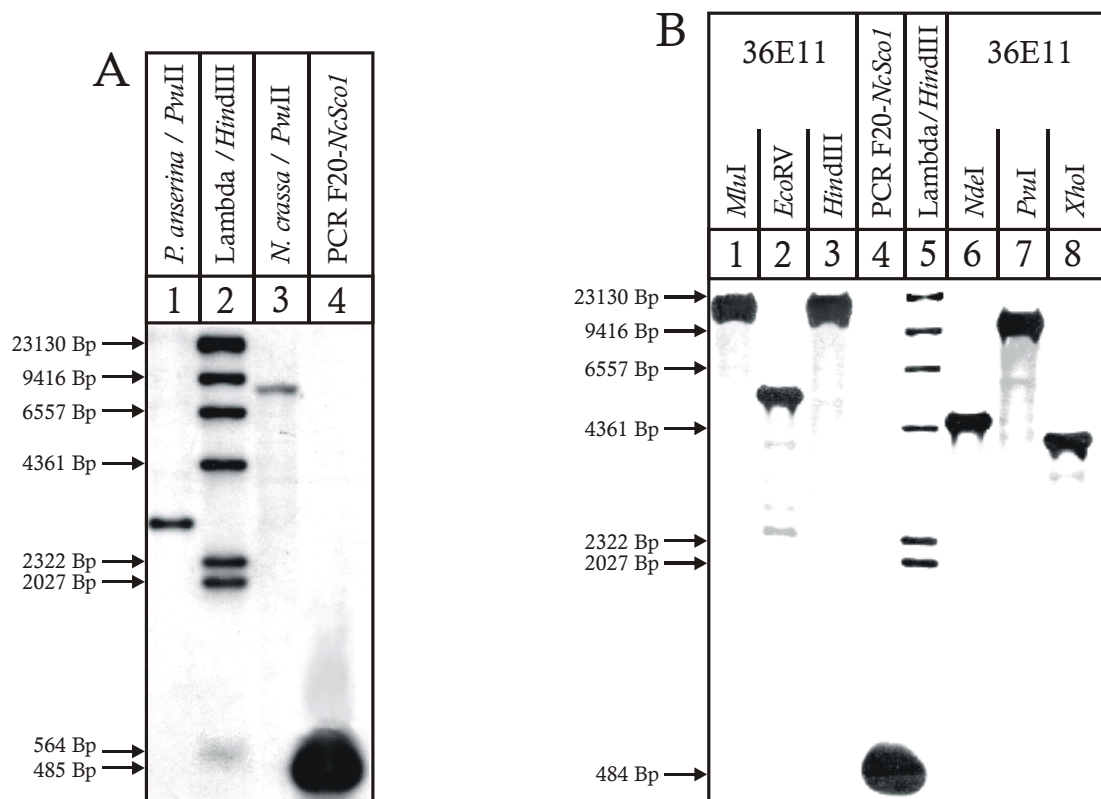


**Abbildung 52: PCR-Amplifikat, Teil des *N. crassa* *NcSco1*.** (A) Teil des *NcSco1*, durch PCR amplifiziert. F20 und F21 symbolisieren die zur PCR verwendeten Oligonukleotide. Über dem PCR-Amplifikat sind die Produkte der Restriktion mit *SalI* dargestellt. (B) Restriktion des PCR-Produktes mit *SalI*. Spur 1 enthält die bp-Leiter als Längen-Standard, relevante Fragmentlängen sind links davon angegeben. In Spur 3 ist das ungeschnittene PCR-Produkt (485 Bp) enthalten (vergl. A, unten). Spur 2 enthält die Subfragmente der Restriktion des PCR-Produktes mit *SalI* (vergl. A, oben und Mitte). Die Länge der Banden stimmt mit der erwarteten Länge (rechts neben dem Foto des Gels angegeben) überein.

Das PCR-Amplifikat des *NcSco1*-ORF wurde radioaktiv markiert. Die resultierende Sonde *F20-NcSco1* wurde mit genomischer DNA von *N. crassa* und *P. anserina* hybridisiert (siehe

Methoden). Diese Southern-Analyse gab Aufschluss über den Grad der Homologie zwischen *NcScoI* und homologen Sequenzen (*PaScoI*) in *P. anserina*. Bei ausreichender Homologie sollte das putative *PaScoI* durch ein Signal nachgewiesen werden (siehe Abb. 53A). Die F20-*NcScoI*-Sonde hybridisierte mit genomischer DNA von *N. crassa* und *P. anserina* (Abb. 53A, Spuren 1 und 3). Dieser Befund lieferte die ersten Evidenzen für die Existenz des Gens *PaScoI*.

Um *PaScoI* zu isolieren, wurde die F20-*NcScoI*-Sonde mit einer *P. anserina* Cosmid-Bank (Osiewacz, 1994) hybridisiert. Dabei wurde ein positiver Cosmid-Klon identifiziert (nicht gezeigt). Die DNA dieses Cosmid-Klons 36E11 (etwa 30 kBp) wurde isoliert und einer Southern-Analyse mit Sonde F20-*NcScoI* unterzogen (siehe Abb. 53B; siehe Methoden).



**Abbildung 53: Southern-Analyse genomischer DNA von *P. anserina*, *N. crassa* und des Cosmid-Klons 36E11.** (A) Genomische DNA von *P. anserina* (Spur 1; 1,0 µg) und *N. crassa* (Spur 3; 0,5 µg) wurde mit *PvuII* geschnitten, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt und mit der F20-*NcScoI*-Sonde (siehe Abb. 51 und 52) hybridisiert. Als Längenstandard wurde in Spur 2, mit *HindIII* geschnittene DNA des Phagen λ aufgetragen. In Spur 4 wurde das ursprüngliche PCR-Fragment aufgetragen, aus dem die F20-*NcScoI*-Sonde hergestellt wurde (Positivkontrolle). (B) Die DNA des Cosmid-Klons 36E11 wurde mit diversen Restriktionsenzymen geschnitten, in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Membran transferiert und mit der F20-*NcScoI*-Sonde hybridisiert (Spuren 1-3 und 6-8). Als Längenstandard diente mit *HindIII* geschnittene DNA des Phagen λ (Spur 5). Spur 4 enthält das ursprüngliche PCR-Fragment, aus dem die F20-*NcScoI* Sonde hergestellt wurde (Positivkontrolle).

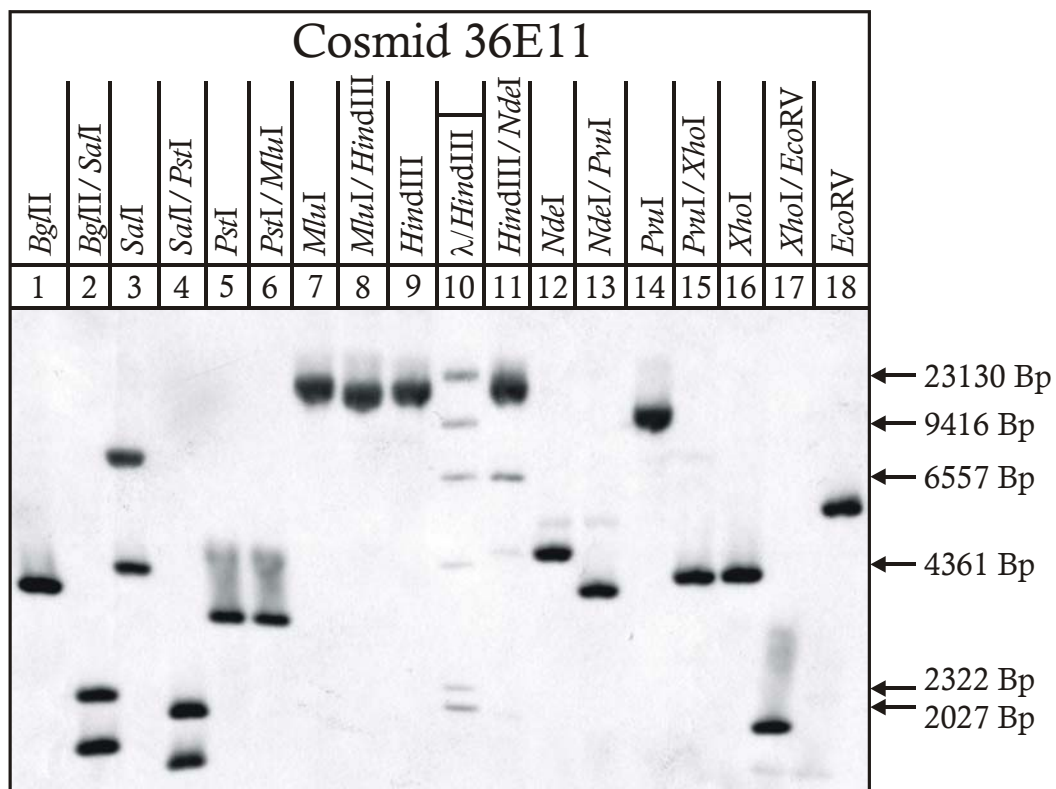
Zur präzisen Kartierung des Gens *PaScoI* innerhalb des Cosmids 36E11 wurde eine Southern-Analyse mit diversen Kombinationen von Restriktionsenzymen durchgeführt. Zur

Hybridisierung wurde wie zuvor Sonde F20-*NcScoI* verwendet (siehe Abb. 54). Zur Isolation des Gens eignen sich vor allem Kombinationen von Restriktionsenzymen, die relativ kurze Fragmente – im Bereich von wenigen kBp – ausschneiden.

Die Existenz einer Kopie von *PaScoI* konnte mit hoher Sicherheit im untersuchten Cosmid 36E11 bestätigt werden (siehe Abb. 53B). Würde Cosmid 36E11 (und damit das Genom von *P. anserina*) weitere Kopie(en) von *PaScoI* enthalten, wäre in den Spuren 1, 5-9 und 14-18 der Abb. 54 wahrscheinlich mehr als ein Signal sichtbar (siehe Abb. 54).

In den Spuren 2-4 und 11-13 schneidet ein Restriktionsenzym innerhalb des Bereichs, mit dem die F20-*NcScoI*-Sonde hybridisiert, dementsprechend werden zwei Signale gezählt (siehe Abb. 54).

Das Gen *PaScoI* ist im Genom von *P. anserina* vermutlich in einer Kopie enthalten.



**Abbildung 54: Ausführliche Southern-Analyse des Cosmids 36E11.** Das Cosmid 36E11 wurden mit verschiedenen Kombinationen von Restriktionsenzymen geschnitten (siehe Angabe oberhalb der Spurnummern), durch Elektrophorese in einem 1% Agarose-Gel aufgetrennt, auf Nylon-Membran transferiert und mit der F20-*NcScoI*-Sonde hybridisiert. Signale gehen auf Fragmente zurück, die Homologie zum ORF des *NcScoI* aufweisen. Als Längen-Standard diente *Hind*III-geschnittene DNA des Phagen λ (Spur 10). Weitere Erklärungen siehe Text.

## Isolation des ORF von *PaScoI*

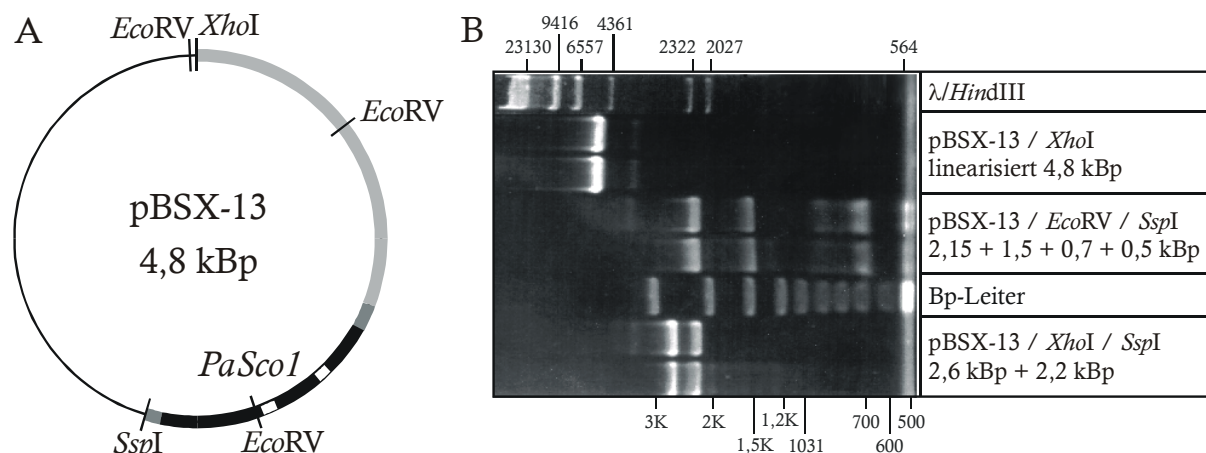
Zur Isolation von *PaScoI* wurde das Plasmid pBSSK(+) mit *SspI* und *XhoI* geschnitten. Zwischen diese Schnittstellen wurde ein 2,6 kBp langes Subfragment integriert, welches mit *SspI* und *XhoI* aus Cosmid 36E11 geschnitten wurde (siehe Methoden).

Zur Isolation des 2,5 kBp langen Fragments wurde Cosmid 36E11 mit *SspI* und *XhoI* geschnitten, auf dem Gel aufgetrennt, die entsprechende Bande wurde aus dem Gel geschnitten und die DNA mittels des Nucleospin-Kits aus dem Gel eluiert (siehe Methoden).

Das resultierende Plasmid pBSK-13 wurde mittels mehrerer Restriktions-Analyse überprüft:

- Die Linearisierung von pBSX-13 mit *XhoI* lieferte erwartungsgemäß Fragmente von 4,8 kBp Länge.
- Die Restriktion mit *EcoRV* und *SspI* ergab Fragmente von 2,15 kBp, 1,5 kBp, 0,7 kBp und 0,5 kBp Länge.
- Die Restriktion mit *XhoI* und *SspI* erzeugte 2,6 kBp lange Fragmente (enthalten Teil des putativen *PaScoI*) und 2,2 kBp lange Fragmente (pBSSK(+)-Rückgrat).

Bei der Verifizierung von pBSX-13 wurden Fragmente der erwarteten Längen erhalten. Plasmid pBSX-13 beinhaltet etwa 1,5 kBp 5'-Bereich, den 977 Bp langen ORF und 72 Bp 3'-Bereich von *PaScoI* (siehe Abb. 55).



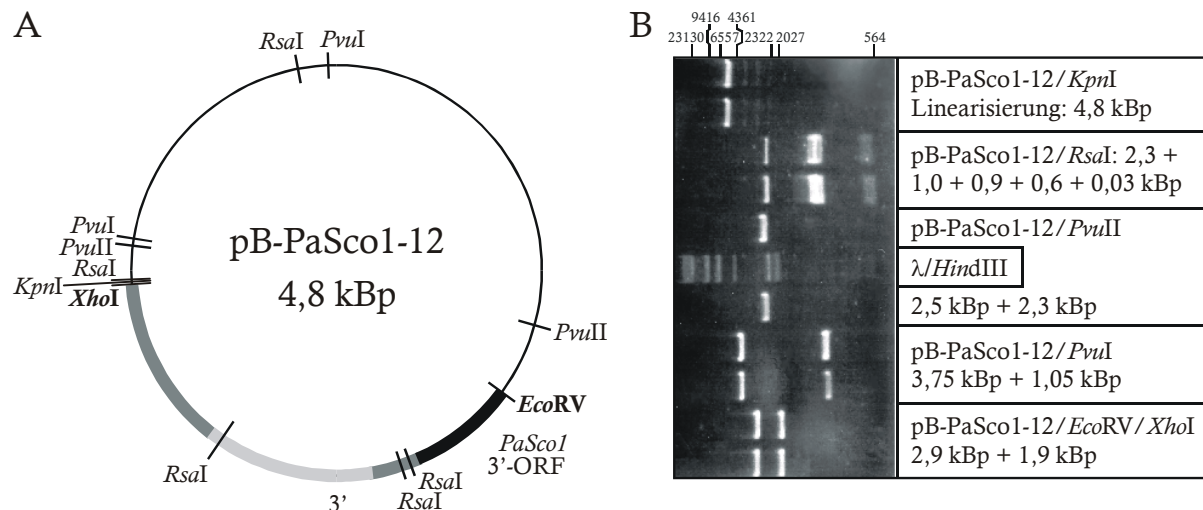
**Abbildung 55: Restriktionsanalyse des Plasmids pBSX-13.** (A) Plasmid pBSX-13 ist dargestellt, der dünne schwarze Bogen symbolisiert das 2,2 kBp lange pBSSK(+)-Rückgrat, während die dickeren Bögen das integrierte 2,6 kBp lange Fragment repräsentieren, welches aus Cosmid 36E11 stammt. Die Sequenz des hellgrauen Teils ist nicht bekannt. Der dunkelgraue und der schwarze Bogen sind sequenziert. Dabei symbolisiert der schwarze Bogen den ORF von *PaScoI*, die kurzen weißen Unterbrechungen repräsentieren die beiden putativen Introns (siehe 3.5.2) von *PaScoI*. (B) zeigt die Photographie der zugehörigen Restriktions-Analyse. Dabei wurde Plasmid pBSX-13 je zweimal mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, deren Namen und die erwarteten Fragment-Längen sind rechts neben dem Foto angegeben. Als Längenstandard wurde DNA des mit *HindIII* geschnittenen Phagen  $\lambda$  und die Bp-Leiter genutzt, entsprechende Fragment-Längen sind oberhalb bzw. unterhalb des Fotos angegeben. Weitere Erklärungen siehe Text.

### Isolation der 3'-Flanke von *PaSco1*

Um die – für ein eventuelles *PaSco1*-Gentauschplasmid nötige – 3'-Flanke zu isolieren, wurde ein weiteres Subfragment des Cosmids 36E11 isoliert. Dazu wurde Cosmid 36E11 mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *XhoI* geschnitten. Ein etwa 1,9 kBp langes Fragment – welches 405 Bp des 3'-Bereichs des ORF von *PaSco1* und 1,5 kBp stromabwärts liegende Sequenzen enthält – wurde wie zuvor beschrieben isoliert (siehe Methoden). Anschließend wurde dieses Fragment in das, ebenfalls mit *EcoRV* und *XhoI* geschnittene Plasmid pBSSK(+) integriert. Das resultierende Plasmid pB-PaSco1-12 wurde durch mehrere Restriktions-Analysen verifiziert (siehe Abb. 56). Im einzelnen wurden folgende Restriktionen durchgeführt:

- pB-PaSco1-12 wurde durch *KpnI* linearisiert. Die erwarteten Fragmente der Länge 4,8 kBp wurden erhalten.
- Die Restriktion mit *RsaI* sollte Fragmente der Längen 2,3 kBp; 1,0 kBp; 0,9 kBp; 0,6 kBp und 32 Bp erzeugen.
- Bei der Restriktion mit *PvuII* wurden 2,5 kBp und 2,3 kBp lange Fragmente erwartet.
- Das Restriktionsenzym *PvuI* sollte Fragmente von 3,75 kBp und 1,05 kBp bilden.
- Das in pB-PaSco1-12 klonierte Fragment des Cosmids 36E11 (1,9 kBp) sollte mit *EcoRV* und *XhoI* aus dem pBSSK(+)-Rückgrat (2,9 kBp) geschnitten werden.

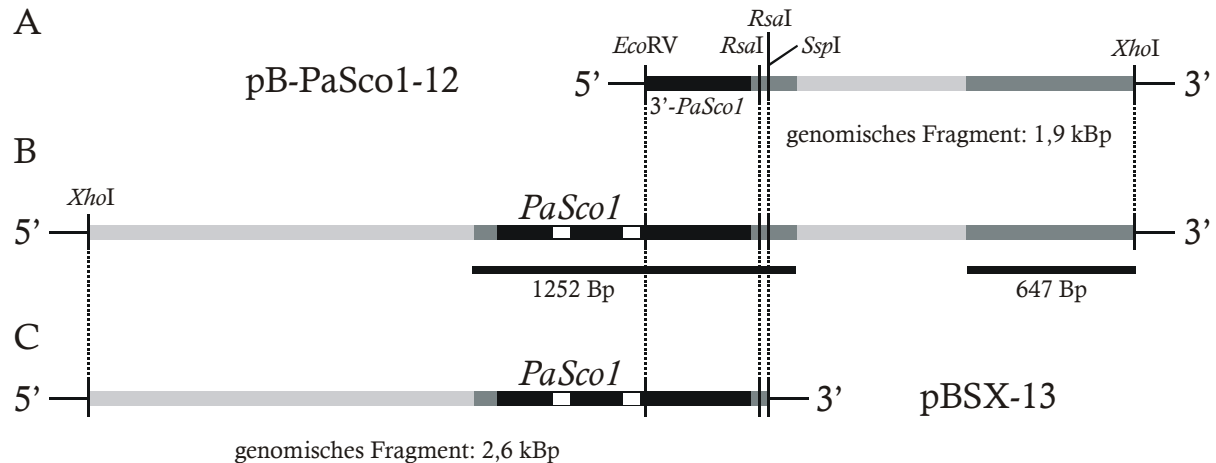
Bei allen durchgeführten Restriktions-Analysen wurden die erwarteten Fragmente erhalten, die Integrität von Plasmid pB-PaSco1-12 konnte belegt werden (siehe Abb. 56).



**Abbildung 56: Verifizierung des Plasmids pB-PaSco1-12.** (A) Plasmid pB-PaSco1-12: Der dünne schwarze Bogen symbolisiert das 2,9 kBp lange pBSSK(+)-Rückgrat und die dickeren Bögen das integrierte 1,9 kBp lange Fragment aus Cosmid 36E11. Die Sequenz des hellgrauen Teils ist nicht bekannt, während der dunkelgraue und der schwarze Bogen sequenziert sind. Der schwarze Bogen repräsentiert 405 Bp des 3'-Teils des *PaSco1*-ORF. Die 3'-Flanke von *PaSco1* (hellgraue und dunkelgraue, dicke Bögen) umfasst etwa 1,5 kBp. (B) Fotografie einer Restriktions-Analyse: Plasmid pB-PaSco1-12 wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, deren Namen und die erwarteten Fragment-Längen sind rechts neben dem Foto angegeben. Als Längenstandard wurde DNA des mit *HindIII* geschnittenen Phagen  $\lambda$  eingesetzt, die entsprechenden Fragment-Längen sind oberhalb des Fotos in Bp angegeben.

### 3.5.2 Initiale Charakterisierung von *PaSco1*

Um zu belegen, daß es sich bei den in pBSX-13 und pB-PaSco1-12 klonierten genomischen Fragmenten um Sequenzen handelt, die Teile des Gens *PaSco1* enthalten wurden Teile beider Fragmente sequenziert. Im Rahmen dieser Sequenzierungen konnten der ORF von *PaSco1* und zwei putative Introns definiert werden (siehe Abb. 57).



**Abbildung 57: Vergleich des *P. anserina PaSco1*-Locus und der Plasmide pB-PaSco1-12 und pBSX-13.** (A-C) Der dicke schwarze Balken symbolisiert den ORF von *PaSco1*, weiße Kästchen repräsentieren die beiden vermuteten Introns. Dunkelgraue dicke Balken wurden sequenziert, von den hellgrauen dicken Balken ist die Sequenz nicht bekannt. (A) Fragment aus Cosmid 36E11 von 1,9 kBp Länge (an *EcoRV*- und *XhoI*-Stellen in Plasmid-Rückgrat von pB-PaSco1-12 integriert), enthält einen Teil des 3'-*PaSco1*-ORF und den angrenzenden 3'-Bereich. (B) Als Referenz dient ein 4 kBp langes Fragment aus dem Cosmid 36E11. Bereiche, von denen Sequenz-Informationen vorliegen, sind unterhalb mit schwarzen Balken kenntlich gemacht, die Anzahl bekannter Basen-Paare ist angegeben (C) In pBSX-13 wurde ein 2,6 kBp langes Fragment aus Cosmid 36E11 (an den *XhoI*- und *SspI*-Stellen) integriert, es umfasst einen Teil der 5'-Flanke und den gesamten *PaSco1*-ORF.

Der ORF des Gens *PaSco1* umfasst 977 Bp und wird vermutlich von zwei Introns unterbrochen. Das erste Intron beginnt an Position +217 und ist 59 Bp lang, Intron 2 beginnt an Position +486 und umfasst 60 Bp (siehe Abb. 58). Die 5'-Spleiß-Stellen der vermutlichen Introns GTATGC (Intron 1) bzw. GTAAGT (Intron 2) ähneln der bekannten Konsensus-Sequenz GTANGT filamentöser Pilze, die beiden 3'-Spleiß-Stellen GTAG (Intron 1) und CCAG (Intron 2) ähneln bzw. stimmen mit dem Konsensus (A/C)(C/T)AG überein (Ballance, 1986).

```

-98                               agattttg gggccatttg ggagctttga
-70 cttggagctt ttatccgcac ccagcacaat tgcggcgctca cccaaggctc ctccagcaaa accacccaaa

  1 ATGTCACAAC CAGCGATGCG TGCCACAATT AACGTCTCTGC CGAGGGCGGC AACTCGACAA TGCCTACGAT
    M S Q   P A M   R A T I   N V L   P R A   A T R Q   C L R

+71 CCCTGTCCAC AGCTAGCAAC ATGGCTGCCA GAAGACCGAC GACATCCTGC CTTCCGAAAC CACAGACACA
    S L S   T A S N   M A A   R R P   T T S C   L P K   P Q T

+141 AACCTACCAG CCATTGGTTC AACGGAGATT CAAGTTCAAG ACAGTGGAGG AGGCAAAAAG TCGCTATCGT
    Q T Y Q   P L V   Q R R   F K F K   T V E   E A K   S R Y R

+211 TCTGGGgtat gcatcggctc tgtccgttgt gtgttttggga cggaagctaa tatgcggggc tgtagCCATT
    S G                               P

+281 CTCATGGAAG GCTGGTATTC TCTTCCTCAT GACTGGCGCC GGGCTCCTGT TTTACTTTGA GAAGGAGAAG
    F S W K   A G I   L F L   M T G A   G L L   F Y F   E K E K

+351 GAGCGCATGC AGCGCAAGAG GATAGCAGAG TCAACCAAGG GTGTTGGAAG GCCCAAGGTG GGC GGCCGT
    E R M   Q R K   R I A E   S T K   G V G   R P K V   G G P

+421 TCAGCTTGAT TGACCAGAAT GGCAACACTG TTACGGACGA GGACTTGAAG GGGCGCTACT CTCTTgtaag
    F S L   I D Q N   G N T   V T D   E D L K   G R Y   S L

+491 tgctggcgtg ttcctctgag tctttgacct tatgctgatt gaagctatgt tccagGTCTA CTTTGGATTT
                               V Y F G F

+561 ACCCATTGTC CGGATATCTG CCCCAGGAG CTCGACAAGA TGGCGAGAAT GTTCGATCTG GTAGAGGAGA
    T H C   P D I   C P E E   L D K   M A R   M F D L   V E E

+631 AGCGTCTCTG TGTGCTGGCA CCTGTATTTG TGACATGCGA CCCCAGCGCT GACGGTCCCA AGGAGTTGAA
    K R P   G V L A   P V F   V T C   D P A R   D G P   K E L

+701 GGAATATCTT GCCGAGTTCC ATCCCAAGTT TATCGGTCTG ACAGGCACAT ACGACCAGAT CAAGGCCATG
    K E Y L   A E F   H P K   F I G L   T G T   Y D Q   I K A M

+771 TGCAAGGCCT ACCGGGTTTA TTTCAGCAGC CCGAACGAAG TCAAGCCAGG CCAGGATTAC CTGGTCGACC
    C K A   Y R V   Y F S T   P N E   V K P   G Q D Y   L V D

+841 ACAGCATCTA CTTCTACCTT ATGGACCCCG AGGGAGACTT TGTGGAGGCG CTCGGCAGAC AGCACTCTCC
    H S I   Y F Y L   M D P   E G D   F V E A   L G R   Q H S

+911 CGACCAAGCA GCCAAGATCA TCGTGGATCA TATGAAGGAG TGAAGGGAC CCTTGAAGAA GGCCTAGaat
    P D Q A   A K I   I V D   H M K E   W K G   P L K   K A *

+981 tatgggcacg tatcaaggat gtataacgcc atgtactatt gatgtatfff gcaacagcta aaatgtacaa
1191 tattgccatt ccatgcagat tacccttggg agtttggtgg tcatgtcagt gagcgggatg aagacagggg
1261 ttctgaaaga agtgggtgatc tgggggtgcag gttg

```

**Abbildung 58: Sequenz des *PaScol*-Locus und des kodierten Proteins.** Nicht kodierende DNA-Sequenzen sind in kleinen Buchstaben dargestellt. Die kodierende Sequenz ist in Groß-Buchstaben dargestellt, *PaScol* kodiert das 285 Aminosäuren lange PaSCO1. Zwei Introns unterbrechen den Leserahmen. Spleiß-Stellen, Initiations- und Terminations-Codons sind fett gedruckt. Weitere Erklärungen siehe Text.

*PaScol* kodiert in *P. anserina* vermutlich ein 285 Aminosäuren langes Protein. In mehreren Spezies wurden zu PaSCO1 homologe Proteine identifiziert (siehe Abb. 59). Die Länge der SCO1-Homologe liegt zwischen 208 (*Apis mellifera*) und 334 (*A. thaliana*) Aminosäuren (siehe Tab. 19).



**Tabelle 19: SCO1-Homologe diverser Spezies.**

Spezies	Länge in Aminosäuren	Identische Aminosäuren	Prozentuale Übereinstimmung	„Accession“-Nummer
<i>Podospora anserina</i>	285	285	100 %	diese Arbeit
<i>Neurospora crassa</i>	303	213	75 %	diese Arbeit
<i>Candida glabrata</i>	294	131	46 %	CAG60395
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	295	122	43 %	NP_009593
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	263	122	43 %	NP_595287
<i>Arabidopsis thaliana</i> I	334	109	38 %	AAL49889
<i>Arabidopsis thaliana</i> II	273	102	36 %	AAF07830
<i>Homo sapiens</i>	301	101	35 %	NP_004580
<i>Caenorhabditis elegans</i>	312	95	33 %	AAB00716
<i>Mus musculus</i>	255	94	33 %	AAH19554
<i>Apis mellifera</i>	208	84	29 %	XP_397438

```

P. anserina      1  -----msqp-----a--mra--fan-----vl-pr-a-----
N. crassa       1  -----msha-----iapurt--fss-----vl-sr-t-----
C. glabrata     1  -----m--lkn--vtn-----iarttr-l-----
S. cerevisiae   1  -----mlkl-----s-rsa--nlr-----lv-gl-p-----
S. pombe        1  -----mfr--g--lvf--srhchyslir-prfp-----
A. thaliana I   1  masalcrtasrlrsvqlfrirrvssdllsaspacisda--lrh--gdf-----sl-pr-sffslncg
A. thaliana II  1  -----ml-k-----
H. sapiens      1  mamlvlpgr-----vmr--l--ggq--lwr-----fl-pr-glefwgpa
C. elegans      1  -----mlrt-----v--slacsan-----lc-kn-t-----
M. musculus     1  -----m--lla-----lg-pk-a-----
A. mellifera    1  -----mr-----

```

```

P. anserina      17  -----atrqcl-rsls--tasnmaar--rpttsclpkp-----gtqty--qplvqrrf
N. crassa       19  -----parqq-rfis--tat--tt--rpt--vprl-----gaglh--qvagrrr-
C. glabrata     14  -----l-trvm-qppa--rpilaatr--tfcnsavvre-----kklr--vpltrp-
S. cerevisiae   17  -----aarl--g--ngaklltq--rgfftvtrlw-----gsngk--kplsrvpv
S. pombe        23  -----lnrtclarfad--grklatd--n-----rtqty--q-----
A. thaliana I   60  iemlkmdqrc1-lstsasdttskhdsg--kpetkssekn-----eksgg--sessdggg
A. thaliana II  4  -----mdqrc1-lstsasdttskhdsg--kpetkssekn-----eksgg--sessdggg
H. sapiens      34  eg---talvll-rqfc--argaeawrasrpgyclgtr-----plsta--rb--pppv
C. elegans      19  -----kpvwtl-asaa--rfsdknkg--ddletdldkdlkklneilktgitetstsspkpvdknf
M. musculus     10  -----w--llsqt-----klsqf--kpll--ri
A. mellifera    3  -----y--qii-----

```

```

P. anserina      58  -kfkveeaksky-----rsgpfs--kag--i--lflmtgagl--llyf--ek--eker--mq
N. crassa       53  -tyktveeaksky-----rsgpfs--kag--l--lflvtgagl--lwyf--eh--ekqr--mq
C. glabrata     54  -kgsepehgiets-----nsiefstgkai--a--lflvvggvs--yyvf--tn--ekkk--lea
S. cerevisiae   54  -ggtpikd-ngkv-----regsief-stgkaia--lflavggal--syff--nr--ekr--le
S. pombe        49  -----sw-----r-gmsi--ral--l--laaatsvg1--yayf--gh--ekkk--vl
A. thaliana I   109 -dhknerasgkdv-----rggpvsw--msf--f--lflfatgagl--vyyv--dt--gkkrhiedin
A. thaliana II  48  -dhknerasgkdv-----rggpvsw--msf--f--lflfatgagl--vyyv--dt--gkkrhiedin
H. sapiens      77  -sgkpgpdstrps-----kpgpvs--ksl--a--itfaigg1--lagm--kh--vkke--ka
C. elegans      77  mnfrkqaqeaafq-----rssifnw--ktv--lgtfavgg1laalfyi--kkirdere--kh
M. musculus     23  -sggetlhrnsrhwagggqrggplr--trl--l--italfgagl--gwawlaaraek--egwr--gq
A. mellifera    7  -----kknr-----

```

```

P. anserina      102 rkria-estkgvgrpkvggpfslidqngntvtdeedlkgryslvyfgfthcpdicpeeldkmarfdlve
N. crassa       97  rkria-datkgvgrpkvggpfslidqngkpytekdldkgryslvfyfgfshcpdicpeeldkmaamfekve
C. glabrata     100 rke-a-eanrgygpkslpgpftlvdttegefteknllrgkfsilyfgfshcpdicpedldkglwldvld-
S. cerevisiae   100 tqkea-eanrgygpkslpgpftlvdttegefteknllrgkfsilyfgfshcpdicpedldkglwntls-
S. pombe        82  erqnd-kvlatigrpqlggafslidhngmrvtdndfkgkfsilyfgftrcpdicpedldkmsaaidivn-
A. thaliana I   157 knsiavkegpsagkaaiaggpfsllrddgkrvteknllmgkwtilyfgfthcpdicpedliklaaaidkik-
A. thaliana II  96  knsiavkegpsagkaaiaggpfsllrddgkrvteknllmgkwtilyfgfthcpdicpedliklaaaidkik-
H. sapiens      121 eklek-erqrhigkpllgpfslltthtgerktokcylgqwllyfgfthcpdvcppelekmiqvvdoid-
C. elegans      128 rkqta-----gkariggewelmntdgkmeqselrgnwllmyfgftrcpdicpediekmvkvveie-
M. musculus     78  qrtea-lrqaavq-----gdfslidhkgqprckadfrgqwlmyfgfthcpdicpedlekllvqvvrklea
A. mellifera    13  kvllh-gkvrqlgkaaiaggfslidsgkikwsddflgqwllyfgfthcpdicpedlekmtievnkle-

```

<i>P. anserina</i>	170	e--krrpgv-lapvfvtcdpardgpkelkeylaefhpkfigltgtydqikamckayrvyfst-pnevkkpgg	
<i>N. crassa</i>	165	a--erpga-lkpvfvtcdpardtgvqlkeylaefhplfigltgtydqikamckayrvyfst-pskveppgg	
<i>C. glabrata</i>	167	k--khdih-lqpifiltcdpardspevlkqylsdfhdgfigltgtydqvkhackgyrvyfst-ppnvkpgg	
<i>S. cerevisiae</i>	168	s--kygit-lqplfilitcdpardspavlkelysdfhpsiligtgtfdevknackkyrvyfst-ppnvkpgg	
<i>S. pombe</i>	150	n--vvgdv-vypifiltcdpardpqqemaeyledfhpkiivgltsyveeikdickkfrvyfst-pknidpkk	
<i>A. thaliana I</i>	226	e--nsgvd-vvpvfisvdpdrdtvqqvheyvkefhpkligltgspseeiksvarsyrvyymk-te--eds	
<i>A. thaliana II</i>	165	e--nsgvd-vvpvfisvdpdrdtvqqvheyvkefhpkligltgspseeiksvarsyrvyymk-te--eds	
<i>H. sapiens</i>	189	sittlpd--ltplfisisdperdtkeaianyvkerfspklvglgtgtreevdqvarayrvyys--pgpkdede	
<i>C. elegans</i>	190	a--kkdatpivpvfisvdpdrdsvarvkeycsefnkrlrgfittgttegvnkvaktfrrvyhsggprtnkqed	
<i>M. musculus</i>	143	e--pdplp-vqpvfilitvdperddvaamaryvqefhprlligtgstevahasrnyrvyysagpkd--edej	
<i>A. mellifera</i>	81	k--qhnik-vqpffisvdpdrdtvqqvheyvkefhpkligltgkegiakvkayrvyysngpkd--qds	
			* ** ** * *
<i>P. anserina</i>	236	d-yldvdsiyfyldmpegdvfealgrqhsdpdqa-----kiivdhmk-----e-w-----	
<i>N. crassa</i>	231	d-yldvdsiyfyldmpegdvfealgrqhsdpdqa-----kviidhmk-----d-w-----	
<i>C. glabrata</i>	233	d-yldvdsiyfyldmpegdvfealgrnydetgtv-----dkivqqvrayqpesernkakns--w-----	
<i>S. cerevisiae</i>	234	d-yldvdsiyfyldmpegdvfdalgrnydektgv-----dkivehvkksyvpa-----e-q-----	
<i>S. pombe</i>	216	ddylvdhsivfyldmpegdvfealgrnstsedla-----raigsyyl-----s-r-----	
<i>A. thaliana I</i>	290	d-yldvdsivmylmspemmfvfygknhdvdslt-----dgvvkeir-----q-y-----	
<i>A. thaliana II</i>	229	d-yldvdsivmylmspemmfvfygknhdvdslt-----dgvvkeir-----q-y-----	
<i>H. sapiens</i>	255	d-yldvdsiimylngpdgefldyfgqnkrkgeila-----asiathmr-----p-y-----	
<i>C. elegans</i>	258	d-yldvdsivmylmspemmfvfygqnrkaeeila-----nviemkvl-----k-y-----	
<i>M. musculus</i>	208	d-yldvdsiaiyllnpgdglftdygrsrnaegiv-----esirrhia-----a-f-----	
<i>A. mellifera</i>	146	d-yldvdsiimylngpdgefldyvgllthtaeqivhsvcinkikyeklk-----sdtwipsip	
			* * * * * ** * *
<i>P. anserina</i>	279	-kspkka-----	
<i>N. crassa</i>	274	-qvllsgsdterwclkvlyasgglgslsl	
<i>C. glabrata</i>	289	-lsflnk-----	
<i>S. cerevisiae</i>	282	-rakqkeawysflfk-----	
<i>S. pombe</i>	260	-k---kqk-----	
<i>A. thaliana I</i>	333	-rk-----	
<i>A. thaliana II</i>	272	-rk-----	
<i>H. sapiens</i>	298	-r---kks-----	
<i>C. elegans</i>	301	-qaqnrksllnlf-----	
<i>M. musculus</i>	251	-hsvltp-----	
<i>A. mellifera</i>	202	fknplsm-----	

**Abbildung 59: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von PaSCO1 mit SCO1-Homologen anderer Spezies** (siehe Tab. 19). Identische Aminosäuren sind invertiert dargestellt. In allen 11 Spezies konservierte Aminosäuren sind mit dem Symbol „\*“ markiert. Weitere Erklärungen siehe Text.

Durch den Vergleich der SCO1-Homologe von 11 Spezies konnten 39 in allen Spezies konservierte Aminosäuren identifiziert werden. Aufgrund seiner Identität zu den Aminosäure-Sequenzen bereits beschriebener SCO1-Homologe handelt es sich bei PaSCO1 tatsächlich um das gesuchte SCO1-Homolog in *P. anserina*.

In weiterführenden Arbeiten wäre nun die Isolation einer *PaScol*-Nullmutante denkbar. Durch die Kreuzung entsprechender Stämme ließe sich möglicherweise eine *PaCox17*-, *PaScol*-Doppelnulmutante isolieren. Durch die Unterbrechung des Kupfer-Transports zur COX wäre ein derartiger Stamm möglicherweise nicht nur extrem langlebig, sondern sogar unsterblich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakteristika von *PaCox17*

COX17-Homologe wurden in einer Reihe von Spezies identifiziert (siehe 1.1.2.3; 3.1.2; Tab. 14). Ihre Funktion besteht in der Weitergabe von Kupfer-Ionen an die COX, in Hefe geschieht dies mittels SCO1 und COX11 (Horng *et al.*, 2004).

Der Schwerpunkt dieser Arbeit bestand darin, eine *PaCox17*-Mutante zu isolieren und zu charakterisieren, in der die Kupfer-Versorgung der COX unterbrochen ist. Dieser Stamm *PaCox17::ble* sollte mit dem Wild-Stamm *s* und der langlebigen Mutante *grisea* verglichen werden (siehe 1.1.3.3).

#### ***PaCox17* ist ein mögliches Zielgen von GRISEA**

Nach der Sequenzierung und der Analyse von 1,15 kbp *PaCox17*-Promotor-Region wurden eine Reihe putativer Protein-Bindestellen identifiziert (siehe Tab. 13). Von besonderem Interesse sind mögliche Bindestellen für GRISEA (Osiewacz und Nuber, 1996) und NRF-2 („nuclear respiratory factor 2“; Virbasius und Scarpulla, 1991).

Der Promotor von *PaCox17* besitzt eine mögliche GRISEA-Bindestelle (nach IUPAC-Nomenklatur: DKTTGCTCW) an Position -98 (ACTTGCTCA). Weiterhin befindet sich an Position +107 eine Sequenz, die der bekannten GRISEA-Bindestelle ähnelt (siehe Tab. 13 und 20). Da sich die letztgenannte Sequenz – im Gegensatz zu allen bisher bekannten GRISEA-Bindestellen, innerhalb des ORF befindet – ist es unwahrscheinlich, daß es sich tatsächlich um eine Bindestelle für GRISEA handelt. Bindestellen für GRISEA und sein *S. cerevisiae*-Ortholog MAC1 sind in den Promotoren entsprechender Gene zwischen den Positionen -1050 und -117 lokalisiert (Borghouts und Osiewacz, 1998; Borghouts *et al.*, 2002a). Dem kommt die putative GRISEA-Bindestelle des *PaCox17*-Promotors (an Position -98) sehr nahe. Im *PaCox17*-Promotor wurde lediglich eine mögliche GRISEA-Bindestelle identifiziert, wohingegen die Promotoren bekannter *P. anserina*-Gene wahrscheinlich zwei GRISEA-Bindestellen enthalten (siehe Tab. 20; Borghouts *et al.*, 2002a). Auch die Zielgene des Transkriptionsfaktors MAC1 – ein GRISEA-Ortholog – besitzen in der Regel mindestens zwei, manchmal vier Bindestellen (siehe Tab. 20; Georgatsou *et al.*, 1997; Labbe *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 1998; Yamaguchi-Iwai *et al.*, 1997).

Ein Befund, der die Hypothese, daß *PaCox17* zum Teil durch GRISEA reguliert wird, unterstützt, wurde durch Northern-Analysen geliefert: *PaCox17* wird im Wild-Stamm wesentlich stärker exprimiert als in der Mutante *grisea* (siehe Abb. 42). Da in Mutante *grisea* der Transkriptionsfaktor GRISEA nicht funktionell gebildet werden kann (Osiewacz und

Nuber, 1996), könnte die verminderte Expression von *PaCox17* auf die Absenz von GRISEA zurückzuführen sein. Alternativ könnte die Expressionsrate von *PaCox17* in Mutante *grisea* indirekt beeinflusst werden, beispielsweise durch den globalen Kupfer-Mangel und den dadurch stark veränderten Metabolismus.

**Tabelle 20: Putative GRISEA- und MAC1-Bindestellen.** Die DNA-Sequenzen der Bindestellen sind in 5'- zu 3'-Richtung angegeben. Pfeile beschreiben die Orientierung der angegebenen Sequenzen. Rechtspfeil: Sequenz auf kodierendem Strang; Linkspfeil: Sequenz auf kodogenem Strang..

Position	Sequenz (5' → 3')	Zielgen	Regulator	Referenz
<b><i>P. anserina:</i></b>				
-98	ACTTGCTCA →	<i>PaCox17</i>	GRISEA	diese Arbeit
+107	GGTTGCGCC →	<i>PaCox17</i>	GRISEA	diese Arbeit
-859	TGTTGCTCA ←	<i>PaCtr3</i>	GRISEA	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
-838	AGTTGCTCT →	<i>PaCtr3</i>	GRISEA	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
-1050	GTTTGCTCA →	<i>PaSod2</i>	GRISEA	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
-681	GTTTGCTCA →	<i>PaSod2</i>	GRISEA	Borghouts <i>et al.</i> , 2002A
<b><i>S. cerevisiae:</i></b>				
-334	TTTTGCTCA →	<i>Ctr1</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-303	TTTTGCTCA ←	<i>Ctr1</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-232	TTTTGCTCG →	<i>Ctr3</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-177	ATTTGCTCG ←	<i>Ctr3</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-297	TTTTGCTCA →	<i>Fre1</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-269	TTTTGCTCA →	<i>Fre1</i>	MAC1	Labbe <i>et al.</i> , 1997
-342	ATTTGCGCT ←	<i>Fre7</i>	MAC1	Martins <i>et al.</i> , 1998
-177	ATTTGCGCA →	<i>Fre7</i>	MAC1	Martins <i>et al.</i> , 1998
-166	ATTTGCGCT →	<i>Fre7</i>	MAC1	Martins <i>et al.</i> , 1998
-117	CTTTGCTCA ←	<i>Fre7</i>	MAC1	Martins <i>et al.</i> , 1998

Neben putativen Bindestellen für GRISEA weist der *PaCox17*-Promotor mögliche Bindestellen für NRF-2 [(A/C)GGAA] auf (Virbasius und Scarpulla, 1991). Mögliche Bindestellen liegen an den Positionen -182 und -51, und damit im basalen Promotor-Bereich (siehe Tab. 13). Ihre Positionierung unmittelbar vor dem Leserahmen unterstreicht die Annahme, daß es sich um reale Bindestellen für NRF-2 – und nicht um zufällige Sequenz-Übereinstimmungen – handelt. NRF-2-Bindestellen wurden auch im *Cox17*-Promotor der Maus beschrieben. Sie sind an den Positionen -107 und -83 lokalisiert und befinden sich damit, genau wie in *P. anserina*, im basalen Promotor. Die Deletion beider NRF-2-Bindestellen im *Cox17*-Promotor der Maus reduziert die Expression des Gens auf ~65% (Takahashi *et al.*, 2002a). Es ist anzunehmen, daß die beiden putativen NRF-2-Bindestellen

des *PaCox17*-Promotors mit einiger Wahrscheinlichkeit eine Rolle bei der Transkription des Gens in *P. anserina* spielen.

Ob die beschriebenen Sequenzen des *PaCox17*-Promotors *in vivo* GRISEA- bzw. NRF-2-Bindestellen darstellen, muß durch weitere Analysen überprüft werden. Dazu eignen sich beispielsweise Bindestudien, Gel-Retardations-Analysen kurzer (50-300 Bp) Abschnitte des Promotors; Deletions-Analysen putativer Bindesequenzen bzw. einzelner Basenpaare dieser Sequenzen. Dabei könnte ein Reporter-Gen, daß hinter den veränderten *PaCox17*-Promotor platziert wird, Auskunft über die Transkriptions-Rate geben. Um die genauen Bindestellen von Protein-Faktoren am *PaCox17*-Promotor zu bestimmen wäre es sinnvoll DNase I-Schutzexperimente / „Footprint“-Analysen durchzuführen.

### **Bestimmung der Kopien-Zahl von *PaCox17* und Sequenz-Analyse von PaCOX17**

Das Expressions-Niveau eines Gens wird neben den cis-Elementen seines Promotors auch durch die Kopienzahl pro Genom bestimmt. Da Spezies wie *A. thaliana* (Wintz und Vulpe, 2002) und *H. sapiens* (Punter *et al.*, 2000) *Cox17* in zwei Kopien pro haploidem Chromosomensatz enthalten, wurde auch *P. anserina* auf weitere Kopien von *Cox17* hin untersucht. Mittels der durchgeführten Southern-Analysen konnte keine Kopie von *PaCox17* identifiziert werden (siehe Abb. 16). Gene, die auf DNA-Ebene eine sehr niedrige Identität aufweisen, hätten bei der niedrig-stringenten Hybridisierung des *P. anserina*-Genoms mit der *PaCox17*-ORF-Sonde möglicherweise nicht detektiert werden können (siehe 3.1.2). Gegen die Existenz von PaCOX17-Homologen mit geringer Sequenz-Identität spricht allerdings die Tatsache, daß die zwei *Cox17*-Kopien anderer Spezies jeweils relativ stark konserviert sind (Wintz und Vulpe, 2002; Punter *et al.*, 2000).

Auf Protein-Ebene zeigen AtCOX17-1 (74 AS) und AtCOX17-2 (72 AS) eine Übereinstimmung von ~70% (51 identische Aminosäuren). Der C-terminale Bereich ist fast vollständig konserviert (siehe Abb. 15). Die Leserahmen der entsprechenden Gene sind immerhin zu 65% identisch (Genbank "accession numbers" *AtCox17-1*: AF349684 und *AtCox17-2*: AF349685).

Die Sequenz des Gens *PaCox17* (Stamm s, siehe Abb. 14) wurde mit der seit kurzem verfügbaren Sequenz des Genoms von *P. anserina* Stamm S (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) durch den sogenannten „Blast Search“ (Altschul *et al.*, 1997) verglichen (siehe Methoden). Dabei wurde nach der DNA-Sequenz des ORF von *PaCox17* und nach der Aminosäure-Sequenz von PaCOX17 gesucht. Es wurde lediglich das Gen *PaCox17* bzw. das von ihm kodierte Protein PaCOX17 des *P. anserina* Stammes S identifiziert.

In *P. anserina* existiert *PaCox17* daher mit hoher Wahrscheinlichkeit in genau eine Kopie. Auch in relativ nah verwandten Spezies wie *N. crassa*, *Gibberella zeae*, *Magnaporthe grisea* und *Aspergillus nidulans* konnte nur eine Kopie von *Cox17* identifiziert werden (siehe Tab.

14; Abb. 15). Entsprechend musste zur Isolation einer *PaCox17*-Nullmutante nur ein Leserahmen disruptiert werden.

Das 80 Aminosäuren lange PaCOX17 enthält 12 konservierte Aminosäuren, die in allen 18 daraufhin untersuchten Spezies gefunden wurden (siehe Abb. 15). Acht dieser 12 Aminosäuren wurden in *S. cerevisiae* als essenzielle Aminosäuren beschrieben. Drei der vier verbleibenden konservierten Aminosäuren sind in Hefe nicht essenziell, die vierte wurde nicht untersucht (Heaton *et al.*, 2000; Punter und Glerum, 2003).

Unter den 12 der in allen 18 untersuchten Spezies konservierten Aminosäure-Reste, befinden sich vier in *S. cerevisiae* essenzielle Cystein-Reste (Heaton *et al.*, 2000). 68% (47 AS) der 69 Aminosäuren des COX17 aus *S. cerevisiae* wurden mutiert; acht dieser 47 Aminosäuren sind für die Funktion von COX17 essenziell, und in PaCOX17 an identischen Positionen konserviert (Punter und Glerum, 2003; siehe Abb. 15).

*PaCox17* ist befähigt, eine *Cox17*-Mutante der Hefe zu komplementieren, COX17 und PaCOX17 sind dementsprechend echte Orthologe (Stumpferl *et al.*, 2004).

## 4.2 Charakterisierung der Mutante *PaCox17::ble*

### 4.2.1 Die Deletion von *PaCox17* erhöht den zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel

In Hefe wurde gezeigt, daß COX17 aufgenommenes Kupfer im mitochondrialen Intermembran-Raum an die COX-Assemblierungs-Faktoren SCO1 und COX11 weitergibt (siehe 1.1.2.3; Horng *et al.*, 2004). Wird in *P. anserina* ein ähnlicher Kupfer-Transportweg zu den Untereinheiten der COX postuliert, führt das Ausschalten des PaCOX17-Weges zu mitochondrialem Kupfer-Mangel, und möglicherweise zu einem „Rückstau“ des Kupfers im Zytoplasma. Da es fraglich war, wie *P. anserina* den postulierten zytoplasmatischen Kupfer-Überschuss reguliert, wurde der Kupfer-Spiegel des Zytoplasmas untersucht. Von Hefe ist bekannt, daß das Zytoplasma große Mengen des Proteins Apo-Cu/Zn-SOD beinhaltet, die Insertion von Kupfer führt zur Bildung der aktiven Form, der Cu/Zn-SOD. Für Apo-Cu/Zn-SOD wird – neben der Bildung der Cu/Zn-SOD – auch die Funktion eines Kupfer-Speichers postuliert. Bei Anstieg des zytoplasmatischen Kupfer-Spiegels wird der Transkriptionsfaktor ACE1 aktiv. ACE1 stimuliert die Transkription von *Sod1* (Pena *et al.*, 1998). Dadurch werden überschüssige Kupfer-Ionen durch das vergrößerte Apo-Cu/Zn-SOD-Reservoir komplexiert (siehe 1.1.2.2; Schmidt *et al.*, 2000). Die Aktivität der Cu/Zn-SOD korreliert demnach mit der zytoplasmatischen Kupfer-Konzentration.

In *P. anserina* ist GRISEA der zentrale Regulator der Kupfer-Homöostase. GRISEA zeigt Homologie zu MAC1 (Jungmann *et al.*, 1993) und zu ACE1 (Thiele, 1988), es ist ein Ortholog von MAC1 (siehe 1.1.2.1; Borghouts und Osiewacz, 1998). Die Transkription von

*PaSod1* wird nicht durch GRISEA reguliert. *PaSod1* wird konstitutiv exprimiert. Die Aktivität der Cu/Zn-SOD ist hauptsächlich vom zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel abhängig (Borghouts *et al.*, 2001; Borghouts *et al.*, 2002b). PaCox17::ble-Stämme zeigten sowohl in juvenilen als auch in mittelalten Stadien starke Cu/Zn-SOD-Aktivität. Wild-Stamm *s* zeigt lediglich in älteren Stadien seiner Entwicklung vergleichbare Cu/Zn-SOD-Aktivität (siehe 3.4.4; siehe Abb. 41).

Im Gegensatz zu PaCox17::ble-Stämmen zeigt der Wild-Stamm *s* in juvenilen Stadien praktisch keine aktive Cu/Zn-SOD. Erst im seneszenten Stadium nimmt die Cu/Zn-SOD-Aktivität zu, erreicht aber nie die hohe Aktivität, die in PaCox17::ble-Stämmen permanent gemessen werden kann (siehe Abb. 41).

Die konstant starke Aktivität der Cu/Zn-SOD in Mutante PaCox17::ble konnte durch die Gabe hoher extrazellulärer Kupfer-Mengen (250 µM) nicht wesentlich gesteigert werden (siehe 3.4.4; siehe Abb. 41). Die geschilderten Befunde geben einen Hinweis drauf, daß PaCox17::ble-Stämme – vor allem in juvenilen und mittelalten Entwicklungsstadien – deutlich höhere zytoplasmatische Kupfer-Spiegel als gleichalte Wild-Stämme aufweisen.

Eine weiterer Beleg für in PaCox17::ble-Stämmen deutlich erhöhte zytoplasmatische Kupfer-Spiegel wurde durch die Northern-Analyse mit den Sonden *PaMtl* und *PaCtr3* geliefert (siehe 3.4.4; siehe Abb. 42). *PaMtl* kodiert das zytoplasmatische Metallothionein PaMT1, dessen Funktion in der Speicherung von Kupfer-Ionen liegt. Dabei steigt die Transkriptmenge von *PaMtl* mit dem Kupfer-Spiegel des Zytoplasmas an. In Übereinstimmung mit diesem Befund ist die Transkriptionsrate von *PaMtl* in der Kupfer-Mangel-Mutante *grisea* deutlich geringer als im Wild-Stamm (Averbeck *et al.*, 2001). Weiterhin ist die Expression von *PaMtl* in PaCox17::ble-Stämmen deutlich höher als in Wild-Stamm *s* (siehe Abb. 42). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß der zytoplasmatische Kupfer-Spiegel der Mutante PaCox17::ble erhöht ist. Die Expression von *PaCtr3* wird durch den Kupfer-abhängigen Transkriptionsfaktor GRISEA reguliert: Die Expressionsrate von *PaCtr3* steigt mit dem Kupfer-Bedarf an, sie ist zum Kupfer-Spiegel des Zytoplasmas indirekt proportional (Borghouts *et al.*, 2002a). Der Befund, daß die Expression von *PaCtr3* in PaCox17::ble-Stämmen kaum nachweisbar ist (siehe Abb. 42), untermauert die Hypothese, daß das Zytoplasma dieser Stämme sehr hohe Kupfer-Spiegel aufweist.

### **Hohe zytoplasmatische Kupferspiegel beeinflussen den zellulären oxidativen Stress**

PaCox17::ble-Stämme weisen diesen indirekten Befunden nach in ihrem Zytoplasma eine im Vergleich zum Wild-Stamm höhere Konzentration von Kupfer-Ionen auf, diese zusätzlichen Kupfer-Ionen werden vermutlich zum Teil durch das Apo-Cu/Zn-SOD-Reservoir und das Metallothionein PaMT1 aufgefangen. Welche Konsequenzen ergeben sich daraus für den

zellulären oxidativen Stress und den Alterungsprozess? Einerseits könnte die erhöhte zytoplasmatische Kupfer-Konzentration zu mehr freien Kupfer-Ionen im Zytoplasma führen, dies würde wiederum die ROS-Produktion (Fenton-Reaktion, siehe 1.1.1.3) stimulieren. Die Konzentration freier Kupfer-Ionen ist – zumindest in Hefe – dennoch so gering, daß die durch die Fenton-Reaktion gebildeten ROS eine, im Vergleich zur Atmungskette, eher geringe Rolle spielen (siehe 1.1.1.3; Rae *et al.*, 1999). Andererseits wird ein hoher zytoplasmatischer Kupferspiegel in Hefe durch das Apo-Cu/Zn-SOD-Reservoir aufgefangen (Schmidt *et al.*, 2000). Da das Apo-Cu/Zn-SOD-Reservoir im Zytoplasma und im mitochondrialen Intermembranraum mit Kupfer beladen wird (Field *et al.*, 2003; Sturtz *et al.*, 2001), führt dies zu verstärkter Bildung der Cu/Zn-SOD in beiden Kompartimenten. Die erhöhte Aktivität der Cu/Zn-SOD wirkt sowohl der zytoplasmatischen ROS-Produktion (nach Fenton), als auch der mitochondrialen Bildung von ROS (Atmungskette) entgegen. Dementsprechend ließe sich postulieren, daß ein erhöhter zytoplasmatischer Kupferspiegel den oxidativen Stress der Zelle nicht begünstigt, sondern vielmehr reduziert. Die Situation in *P. anserina* ist wahrscheinlich ähnlich. Die postulierte Verminderung des zellulären oxidativen Stresses könnte die Lebensspanne der Mutante PaCox17::ble positiv beeinflussen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wären beispielsweise Messungen der ROS-Produktion (z.B. durch NBT) der Mutante PaCox17::ble im Vergleich zum Wild-Stamm von Interesse.

### **Gründe für den erhöhten mitochondrialen Kupferspiegel**

Wird berücksichtigt, daß jeder COX-Komplex drei Kupfer-Ionen bindet, ist es vorstellbar, daß der Anstieg des zytoplasmatischen Kupfer-Spiegels zumindest teilweise auf Kupfer-Ionen zurückzuführen ist, die bei funktionellem PaCOX17-Weg in die COX integriert worden wären. In Hefe ist etwa 10% des mitochondrialen Kupfers in COX-Komplexen komplexiert (Cobine *et al.*, 2004). Da ein Großteil des zellulären Kupfers in den Mitochondrien lokalisiert ist, könnte die Freisetzung des Kupfers aus den COX-Komplexen durchaus für eine drastische Erhöhung des zytoplasmatischen Kupfer-Spiegels verantwortlich sein (Cobine *et al.*, 2004).

In früheren Arbeiten wurde bereits postuliert, daß es in seneszenten Kulturen von *P. anserina* zum Zerfall von COX-Komplexen kommt. Dadurch würde Kupfer freigesetzt werden. Es käme wahrscheinlich zu einer Umverteilung des Kupfers aus den Mitochondrien, in das Cytoplasma (Averbeck *et al.*, 2001; Borghouts *et al.*, 2001).

Warum zerfallen die COX-Komplexe in seneszenten Stämmen? Mit zunehmendem Alter eines *P. anserina*-Stammes kommt es zu fortschreitender Destabilisierung der mtDNA (Übersicht in Osiewacz, 2002A und 2002b). Mutationen in Gen *Cox1* verhindern die Neusynthese der Untereinheit 1 des COX-Komplexes. Bestehende COX-Komplexe werden durch Protein-Degradation nach und nach abgebaut. Das dabei freigesetzte Kupfer diffundiert möglicherweise in das Zytoplasma (Averbeck *et al.*, 2001; Borghouts *et al.*, 2001).



Tatsächlich sprechen eine Reihe von Befunden dafür, daß in seneszenten Wild-Stämmen von *P. anserina* erhöhte Kupferspiegel vorliegen:

- Die Aktivität der Cu/Zn-SOD ist Kupfer-abhängig, sie steigt in seneszenten Wild-Stämmen stark an (Borghouts *et al.*, 2001).
- Der Transkriptionsfaktor GRISEA ist Kupfer-reguliert. Hohe Kupferspiegel führen zur Inaktivierung von GRISEA, und damit zum Abschalten der Transkription seiner Zielgene *PaCtr3* (Borghouts *et al.*, 2002a) und *PaSod2* (Borghouts *et al.*, 2001) in seneszenten Wildstämmen.
- *PaMtl* kodiert das Kupfer-bindende Metallothionein PaMT1. Seine Expression wird durch hohe Kupfer-Spiegel stimuliert. In seneszenten Wild-Stämmen wurde verstärkte Expression nachgewiesen (Averbeck *et al.*, 2001).

Neben den in seneszenten Wild-Stämmen wahrscheinlich erhöhten zytoplasmatischen Kupfer-Spiegeln, untermauert ein weiterer Befund die Hypothese, daß das Fehlen von COX-Komplexen zumindest für eine teilweise Erhöhung der zellulären Kupfer-Konzentration verantwortlich ist. Die mtDNA der langlebigen Mutante ex1 enthält keine funktionelle Kopie des Gens *Cox1*. COX-Komplexe können nicht assembliert werden. Mutante ex1 zeigt, ebenso wie Mutante PaCox17::ble, deutlich erhöhte zytoplasmatische Kupferspiegel (siehe 3.4.4). In beiden Mutanten könnte das Fehlen der mitochondrialen COX-Komplexe zu einem „Rückstau“ von Kupfer ins Zytoplasma führen.

Die Ursache für den erhöhten zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel der Mutante PaCox17::ble könnte auf eine weitere Ursache zurückzuführen sein: Ursprünglich wurde COX17 in Hefe als Kupfer-Chaperon identifiziert, daß Kupfer vom Zytoplasma zum Mitochondrium transportiert (Glerum *et al.*, 1996a). Dieser Hypothese widersprechen allerdings Experimente, in denen COX17 – ohne Funktionsverlust – artifiziell an der inneren mitochondrialen Membran verankert wurde. Die Verankerung von COX17 reduzierte die gemessene COX-Aktivität lediglich auf 80% des Niveaus des Wild-Stammes (Maxfield *et al.*, 2004). Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß PaCOX17 in *P. anserina* zusätzlich die Funktion eines Kupfer-Chaperons ausübt, welches Kupfer aus dem Zytoplasma zu den Mitochondrien transportiert. Aufgrund seiner geringen Größe (80 AS) wäre PaCOX17 wahrscheinlich in der Lage Kupfer durch die äußere mitochondriale Membran zu befördern. Möglicherweise wird Kupfer von einem unbekanntem Faktor und von PaCOX17 zum Mitochondrium transportiert. Die Identifikation des Chaperons, welches Kupfer in Wild-Stämmen in den mitochondrialen Intermembranraum transportiert, wäre von großem Interesse. Eine entsprechende Nullmutante

könnte darüber Aufschluss geben, ob und zu welchem Anteil PaCOX17 an diesem Transportweg beteiligt ist.

Sollte PaCOX17 in *P. anserina* tatsächlich am Kupfer-Transport zum Mitochondrium beteiligt sein, so würde die Deletion von *PaCox17* wahrscheinlich zu einem erhöhtem zytoplasmatischen Kupfer-Spiegel führen. Dies ist in PaCox17::ble-Stämmen der Fall. Dementsprechend kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß PaCOX17 Kupfer im Zytoplasma rekrutiert und anschließend zu den Mitochondrien transportiert.

#### **4.2.2 Mutante PaCox17::ble zeigt alternative Respiration**

Um zu prüfen, ob Mutante PaCox17::ble einen Defekt in der Kupfer-Versorgung der COX zeigt, und in Folge dessen die AOX induziert, wurden Western-Analysen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die alternative Oxidase in Mutante PaCox17::ble gebildet wird (siehe 3.4.2; Abb. 39). In diesem Experiment wurde ein wichtiger Unterschied zu der langlebigen Mutante *grisea* offensichtlich: Die Gabe von 250 µM Kupfer in das extrazelluläre Medium supprimiert *grisea*, die AOX kann durch Western-Analysen nicht mehr detektiert werden. In PaCox17::ble-Stämmen kommt es bei Kupfer-Zugabe zu keiner Reversion, die AOX wird weiterhin gebildet (siehe Abb. 39).

Ein wichtiger Unterschied zwischen der *P. anserina* Mutante PaCox17::ble und der  $\Delta Cox17$ -Mutante der Hefe zeigt sich bei Wachstum in Medium mit hoher Kupfer-Konzentration. Während die  $\Delta Cox17$ -Mutante der Hefe durch extrazelluläres Kupfer supprimiert werden kann (Glerum *et al.*, 1996a), ist dies bei *P. anserina* nicht möglich (siehe 3.4.1). Der Kupfer-Stoffwechsel unterliegt in *P. anserina* vermutlich einer strikten Regulation. In Hefe scheint diese Regulation weniger strikt und kann durch hohe extrazelluläre Kupfer-Mengen überwunden werden. Weiterhin besitzt die Hefe keine alternative Oxidase, bei Disruption von *Cox17* schaltet die Hefe ihren Stoffwechsel von Atmung auf Gärung um.

Um die Respiration der PaCox17::ble-Stämme genauer zu untersuchen, wurden Sauerstoff-Verbrauchs-Messungen durchgeführt. Der Vorteil derartiger physiologischer Messungen liegt darin, daß sie *in vivo* einen direkten Einblick in das Stoffwechsel-Geschehen bieten. Im Vergleich dazu sind Northern- und Western-Analysen nur bedingt aussagekräftig.

Die Transkriptionsrate eines Gens gibt keinen Aufschluss über die Translationsrate, da die Stabilität der mRNA durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst wird. Weiterhin wird die Bildung diverser Proteine auf Translations-Ebene reguliert. Die Regulation einer Reihe von Proteinen wird durch Kofaktoren, prosthetische Gruppen oder Konformations-Änderungen beeinflusst. Ein starkes Signal auf Western-Ebene sagt nur bedingt etwas über die Aktivität eines Proteins *in vivo* aus.

Die durchgeführten Atmungs-Messungen machen deutlich, daß die Respiration der PaCox17::ble-Stämme zum größten Teil (>90%) über AOX läuft, während die COX keine signifikante Rolle spielt (siehe 3.4.3; Abb. 40). PaCox17::ble-Stämme gleichen in ihrer Respiration der Mutante grisea. Beide Mutanten unterschieden sich dennoch bei Wachstum in Medium mit 10 µM Kupfer. Während grisea zur COX-Atmung revertiert, zeigen PaCox17::ble-Stämme weiterhin AOX-Atmung (siehe Abb. 40).

Kultiviert man PaCox17::ble-Stämme mit 250 µM Kupfer im Medium, kommt es ebenfalls zu keiner Reversion der AOX-Respiration (nicht gezeigt).

Wie zuvor beschrieben ist die AOX-Atmungskette weit weniger effektiv als die COX-Atmungskette. Verglichen mit dem COX-Atmungsweg, transportiert der AOX-Atmungsweg theoretisch nur ein Drittel der Protonen in den Intermembranraum (siehe Einleitung, Abb. 3 und 5). Möglichkeiten die geringere Effizienz des AOX-Atmungsweges auszugleichen wären:

- den Metabolismus anzukurbeln, mehr Reduktions-Äquivalente für die AOX-Atmungskette zur Verfügung zu stellen, und dadurch ein für die ATP-Synthese ausreichendes Membran-Potenzial zu generieren (siehe Einleitung).
- Durch Verminderung der Wachsrate könnte pro Zeiteinheit eine höhere Menge an Nährstoffen aufgenommen werden.
- Verzicht auf nicht essenzielle Stoffwechsel-Wege. Auch könnte der Sekundär-Metabolismus gedrosselt werden. Beispiele: Bildung von Pigmenten, die Amplifikation von plDNA etc.
- Einschränkung der Differenzierung bzw. Entwicklung. Beispiele sind die Bildung von Luftmyzel oder Perithezien.

*In vivo* werden scheinbar alle genannten Wege besritten. Der Sauerstoff-Umsatz der PaCox17::ble-Stämme ist knapp dreifach höher als im Wild-Stamm s (siehe Abb. 40). Das Wachstum der Mutante ist gedrosselt und Luftmyzel wird nur in sehr geringem Umfang gebildet (siehe 3.4.1, Abb. 34). Die Pigmentierung wird in einigen Stämmen (zeitweise) unterdrückt (siehe 3.4.6, Abb. 48) und die Bildung weiblicher Gametangien ist empfindlich gestört (siehe 3.4.1, Abb. 36). Weiterhin ist die Amplifikation von plDNA bzw. die Bildung der  $\beta$ -sen-DNAs in PaCox17::ble-Stämmen normalerweise nicht nachzuweisen, dies führt zur Stabilisierung des Chondrioms (siehe 3.4.5).

### 4.2.3 Die Disruption des *PaCOX17*-Weges stabilisiert das mitochondriale Genom

In *PaCox17::ble*-Stämmen kommt es während der juvenilen und mittelalten Stadien weder zu Amplifikation von pDNA, noch zu Bildung von  $\beta$ -senDNAs (siehe 3.4.5; Abb. 43 und 45). Ebenso wird in seneszenten *PaCox17::ble*-Stämmen üblicherweise keine pDNA amplifiziert (siehe Abb. 44).

Lediglich ein Nachkomme (*PaCox17::ble*<sup>+</sup>-38250) der Kreuzung zwischen Mutante *PaCox17::ble* und dem seneszenten Wild-Stamm *s* zeigte die Bildung von pDNA (siehe Abb. 44). Der Nachweis von pDNA in Stamm *PaCox17::ble*<sup>+</sup>-38250 stellt eine Ausnahme dar. Da in *P. anserina* die Mitochondrien (und ebenso die mtDNA) maternal vererbt werden (Tudzynski, 1978), wurde der Stamm *PaCox17::ble*<sup>+</sup>-38250 vermutlich durch maternal vererbte Mitochondrien mit pDNA „überflutet“. Trotzdem pDNA in *PaCox17::ble*-Stämmen anscheinend *de novo* nicht (in durch Southern-Analysen nachweisbaren Mengen) gebildet werden kann, besteht dennoch die Möglichkeit, daß vorhandene pDNA propagiert werden kann. Die Lebensspanne des Stammes betrug lediglich 12 Tage. Die mittlere Lebensspanne der Mutante *PaCox17::ble* ist fast 30 mal länger. Ein möglicher Grund für die nur 12-tägige Lebensspanne könnte in pDNA-vermittelter Destabilisierung der mtDNA bestehen. Schlussendlich besteht die Möglichkeit, daß es sich bei Stamm *PaCox17::ble*-38250<sup>+</sup> nicht um eine *PaCox17::ble*-Mutante handelt, dagegen sprechen allerdings die durchgeführten Analysen.

Auch in der langlebigen Kupfer-Mangel-Mutante *grisea* kommt es bei Kultivierung auf Standard-Medium (BMM) nicht zur Bildung von pDNA. Allerdings lässt sich die Amplifikation der pDNA durch extrazelluläre Gabe von Kupfer induzieren. Dieser Befund führte zu der Annahme, daß die Amplifikation der pDNA Kupfer-abhängig ist (Borghouts *et al.*, 2000). Es stellt sich die Frage, ob Kupfer direkt oder indirekt an der Bildung der pDNA beteiligt ist. Gegen eine direkte Einflussnahme von Kupfer auf die Stabilität des mitochondrialen Genoms spricht folgender Befund: In *PaCox17::ble*-Stämmen wird weder die Amplifikation von pDNA noch die Bildung von  $\beta$ -senDNAs durch die extrazelluläre Gabe von 250  $\mu$ M Kupfer stimuliert (siehe Abb. 43 und 45). Dies ist ein signifikanter Unterschied zu Mutante *grisea*, deren pDNA-Amplifikation durch Kupfer induziert werden kann.

Die Disruption des *PaCOX17*-Weges unterbindet mit hoher Wahrscheinlichkeit nur einen Kupfer-Transport-Weg. Wahrscheinlich existieren in *P. anserina* weitere Transport-Wege, durch die Kupfer in die Mitochondrien und in das putative Kupfer-Reservoir der mitochondrialen Matrix transportiert werden kann (Nobrega *et al.*, 2002).

In Hefe wurde gezeigt, daß die Disruption von *Cox17* das Kupfer-Reservoir der mitochondrialen Matrix nicht beeinträchtigt (Cobine *et al.*, 2004). Auch in *PaCox17::ble*-Stämmen ist das putative mitochondriale Kupfer-Reservoir wahrscheinlich nicht beeinflusst. Ähnlich wie Mutante *PaCox17::ble* verhält sich auch die langlebige Mutante *cox5::BLE*. In diesem Stamm wurde das Gen *PaCox5* disruptiert. Ohne die Bildung der strukturellen Komponente *PaCOX5* kann in *P. anserina* kein funktioneller COX-Komplex assembliert werden. Der Kupfer-Transport zum Mitochondrium wird durch die Deletion von *PaCox5* nicht direkt beeinträchtigt, da *PaCOX5* Kupfer nicht komplexiert. Trotzdem kommt es in *cox5::BLE*-Stämmen zu keiner Amplifikation von pDNA oder  $\beta$ -senDNA-Bildung (Dufour

*et al.*, 2000). Die Kupfer-Abhängigkeit der pDNA-Amplifikation und der Bildung von  $\beta$ -senDNAs ist wahrscheinlich von indirekter Natur. Welche Prozesse führen aber zur Stabilisierung der mitochondrialen DNA? Werden Stämme, die pDNA und  $\beta$ -senDNAs bilden, mit Stämmen, deren mitochondriales Genom stabilisiert ist verglichen, zeigt sich, daß der Typ der Respiration mit der Stabilität der mtDNA korreliert (siehe Tab. 21).

**Tabelle 21: Korrelation zwischen Respiration und Stabilität des mitochondrialen Genoms.**

Bei AOX-Atmung fungiert die alternative Oxidase als terminale Oxidase der Atmungskette, bei COX-Atmung die Cytochrom-*c*-Oxidase. Bei Stämmen die mit Kupfer („+ Cu“) gewachsen sind, wurde 250  $\mu$ M Kupfer-Sulfat ins Medium gegeben. Das Symbol „+ AOX“ symbolisiert die Überexpression der alternativen Oxidase.

Stamm	Amplifikation von pDNA	Bildung von $\beta$ -sen-DNA	Typ der Respiration	Referenz
PaCox17::ble	nein*	nein	AOX-Atmung	diese Arbeit
PaCox17::ble + Cu	nein	nein	AOX-Atmung	diese Arbeit
grisea	nein	nein	AOX-Atmung	Borghouts <i>et al.</i> , 2000
ex1	nein	nein	AOX-Atmung	Kück <i>et al.</i> , 1985b
cox5::BLE	nein	nein	AOX-Atmung	Dufour <i>et al.</i> , 2000
cox5::BLE + AOX	ja	ja	AOX-Atmung	Lorin <i>et al.</i> , 2001
Wild-Stamm s	ja	ja	COX-Atmung	Borghouts <i>et al.</i> , 2000
Wild-Stamm s + Cu	ja	ja	COX-Atmung	diese Arbeit
grisea + Cu	ja	ja	COX-Atmung	Borghouts <i>et al.</i> , 2000

\* Die Existenz von pDNA konnte in einem einzigen Fall belegt werden.

Die in Tabelle 21 präsentierten Daten zeigen, daß Stämme mit AOX-Atmungskette stabilisierte mitochondriale Genome aufweisen.

Stämme mit AOX-Respiration scheinen grundsätzlich an Energie-Mangel zu leiden, denn die AOX-Atmungskette arbeitet weit weniger effizient als die COX-Atmungskette. Weiterhin scheint die AOX in *P. anserina* den limitierenden Faktor der AOX-Atmungskette darzustellen (Lorin *et al.*, 2001).

Eine interessante Ausnahme stellt ein cox5::BLE-Stamm dar, in dem die alternative Oxidase überexprimiert wird. Dieser Stamm zeigt trotz AOX-Atmung die Amplifikation von pDNA und Bildung von  $\beta$ -senDNAs (Lorin *et al.*, 2001). Bereits die Überexpression der AOX ist ausreichend, um das mitochondriale Genom zu destabilisieren (Lorin *et al.*, 2001). Bei AOX-Respiration scheint die AOX den limitierenden Schritt der Atmungskette darzustellen. Wird die AOX überexprimiert, führt dies wahrscheinlich zu vermehrtem Elektronentransport, höherem mitochondrialem Membranpotenzial und höherer ATP-Syntheserate (Lorin *et al.*, 2001). Ausgehend von den geschilderten Befunden gelangt man zu der Hypothese, daß die Amplifikation der pDNA und die Bildung der  $\beta$ -senDNAs von der zur Verfügung stehenden ATP-Menge abhängen. Die Gründe des hohen Energie-Bedarfs liegen möglicherweise in der

Notwendigkeit der homologen Rekombination, die sowohl für die Amplifikation der pDNA, als auch für die Bildung der  $\beta$ -senDNA notwendig ist. Homologe Rekombination ist ein stark Energie-abhängiger Prozess, für den Stämme, die AOX-Respiration zeigen, möglicherweise keine ausreichende Menge ATP bereitstellen können. Alternativ könnte auch ein „Sensor“ postuliert werden, der bei ATP-Mangel destabilisierende Prozesse wie pDNA-Amplifikation und Bildung der  $\beta$ -senDNAs unterdrückt. Beide Hypothesen könnten durch die Überexpression der AOX in Stämmen, die AOX-Respiration zeigen, überprüft werden. Geeignete Stämme wären beispielsweise die Mutante *grisea*, *ex1* oder *PaCox17::ble*.

Die Amplifikation der pDNA und die Bildung der  $\beta$ -senDNAs wird in *P. anserina* mit oxidativem Stress und Alterungs-Prozessen in Zusammenhang gebracht (siehe 1.1.2.3). Dabei ist die Destabilisierung der mtDNA vermutlich nicht die Ursache, sondern vielmehr ein Beschleuniger des Alterungs-Prozesses (Borghouts *et al.*, 1997; Dequard-Chablat und Allandt, 2002; Übersicht in Osiewacz, 2002b). Die Stabilisierung der Chondrioms führt in *PaCox17::ble*-Stämmen wahrscheinlich zum Erhalt einer funktionellen Atmungskette und damit zu einem langsameren Vorranschreiten von Alterungsprozessen.

#### **4.2.4 Die Modulation der mitochondrialen Kupferversorgung führt zur Verlängerung der Lebensspanne**

Um die mittlere und maximale Lebensspanne, die mittlere und maximale Wuchsstrecke und die Wachstumsrate der Mutante *PaCox17::ble* statistisch relevant bestimmen zu können, wurden 60 *PaCox17::ble*-Stämme untersucht (siehe 3.4.6).

Die mittlere Lebensspanne der Mutante *PaCox17::ble* ist mit 375 Tagen (siehe Abb. 49) etwa:

- 12,5 mal länger als der Literatur-Wert des Wild-Stammes *s* (~30 Tage; Nachkommen der Kreuzung zweier Wild-Stämme; siehe Tab. 22; Borghouts *et al.*, 2001; Tudzynski und Esser, 1977).
- sechs mal länger als die mittlere Lebensspanne der parallel untersuchten Wild-Stämme (67 Tage, Nachkommen der Kreuzung zwischen Wild-Stamm und Mutante *PaCox17::ble*, siehe Abb. 50, siehe Tab. 22).
- acht mal länger als die der langlebigen Mutante *grisea* (~48 Tage; siehe Tab. 22; Borghouts und Osiewacz, 1998; Borghouts *et al.*, 2001).

Die mittlere Lebensspanne wird als die Zeitspanne definiert, nach der 50% aller Individuen einer Population gestorben sind. Die mittlere Lebensspanne unterscheidet sich demnach von dem Mittelwert der Lebensspannen einer Population.

**Tabelle 22: Vergleich des Wild-Stammes s mit langlebigen Mutanten bezüglich Lebensspanne und Wuchsstrecke.** Die mittlere Lebensspanne ist in Tagen, die mittlere Wuchsstrecke in cm angegeben. AOX und COX benennen jeweils die terminale Oxidase der in dem entsprechenden Stamm vorhandenen Atmungskette. In der Mutante *cox5::BLE GPD-AOX-T1 (cox5::BLE-A)* wird die AOX stark überexprimiert. „n.d.“ bedeutet nicht durchgeführt. Die angegebenen mittleren Lebensspannen des Wild-Stammes s und der Mutante *grisea* wurden in Borghouts *et al.* (2001) bestätigt.

Stamm und Paarungs-Typ	mittlere Lebensspanne	mittlere Wuchsstrecke	Typ der Respiration	Referenz
Wild-Stamm s „plus“	30	11,4	COX	Dufour <i>et al.</i> , 2000 Tudzynski und Esser, 1977
Wild-Stamm s „minus“	30	10,6	COX	Dufour <i>et al.</i> , 2000 Tudzynski und Esser, 1977
Wild-Stamm s „plus“ *	78	48,5	COX	diese Arbeit
Wild-Stamm s „minus“ *	54	27,5	COX	diese Arbeit
PaCox17::ble „plus“	314	116,8	AOX	diese Arbeit
PaCox17::ble „minus“	646	238,1	AOX	diese Arbeit
<i>grisea</i> „plus“	48	n.d.	AOX	Borghouts und Osiewacz, 1998
<i>grisea</i> „minus“	48	n.d.	AOX	Borghouts und Osiewacz, 1998
<i>cox5::BLE</i> „plus“	n.d.	120	AOX	Lorin <i>et al.</i> , 2001
<i>cox5::BLE</i> „minus“	n.d.	260	AOX	Lorin <i>et al.</i> , 2001
<i>cox5::BLE-A</i> „plus“	n.d.	19,3	AOX	Lorin <i>et al.</i> , 2001
<i>cox5::BLE-A</i> „minus“	n.d.	28,1	AOX	Lorin <i>et al.</i> , 2001

\* Nachkommen einer Kreuzung zwischen Wildstamm s und Mutante PaCox17::ble.

Neben der Lebensspanne ist auch die mittlere Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble signifikant länger als die des Wild-Stammes s (siehe Abb. 46, Tab. 22).

Die mittlere Wuchsstrecke wird als die linear überwachsene Strecke definiert, nach der 50% aller Individuen einer Population ihr Wachstum eingestellt haben. Die mittlere Wuchsstrecke unterscheidet sich von dem Mittelwert aller Wuchsstrecken einer Population.

Die mittlere Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble (134,3 cm) ist gegenüber den publizierten Daten des Wild-Stammes (11 cm; siehe Tab. 22; Dufour *et al.*, 2000) etwa 12-fach verlängert. Auch gegenüber den parallel zu Mutante PaCox17::ble untersuchten Wild-Stämmen (40,7 cm; Nachkommen der Kreuzung zwischen Wild-Stamm und Mutante PaCox17::ble; siehe Tab. 22) ist die Wuchsstrecke der Mutante etwa 3,3-fach verlängert. PaCox17::ble-Stämme wachsen, trotz ihrer verminderten Wachsrate (60% des Wild-Stammes s), um ein Vielfaches weiter als Wild-Stämme.

### **Gründe für die stark erhöhte Lebens- und Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble**

Die Gründe der signifikant verlängerten mittleren Lebensspanne und Wuchsstrecke der Mutante PaCox17::ble liegen in der Disruption des Gens *PaCox17*, da sich Wild-Stamm und Mutante genetisch in keinem anderen Merkmal unterscheiden. Die Unterbrechung des PaCOX17-Weges führt zum Ausfall der COX und induziert damit die alternative Oxidase. Die Modulation der mitochondrialen Kupfer-Versorgung führt in PaCox17::ble-Stämmen im einzelnen zu folgenden Effekten, die wiederum die Lebensspanne positiv beeinflussen:

- pDNA und  $\beta$ -senDNAs werden in PaCox17::ble-Stämmen normalerweise nicht gebildet (siehe 3.4.5). Während in Wildstämmen die Amplifikation von pDNA und  $\beta$ -senDNAs den Alterungsprozess beschleunigt (siehe 1.3.2.3), führt die Stabilisierung der mtDNA in PaCox17::ble-Stämmen zur Verlängerung der Lebensspanne.
- Da in PaCox17::ble-Stämmen der Kupfer-Spiegel des Zytoplasmas erhöht ist, wird das putative Apo-Cu/Zn-SOD-Reservoir vermutlich mit deutlich mehr Kupfer versorgt, als vergleichsweise in Wild-Stämmen. In PaCox17::ble-Stämmen zeigt die Cu/Zn-SOD während juveniler, mittelalter und vermutlich auch seneszenten Stadien starke Aktivität (siehe 3.4.4). Die konstitutiv hohe Aktivität der Cu/Zn-SOD führt wahrscheinlich zur einer Verminderung des oxidativen Stresses und zur Verlangsamung von ROS-induzierten Alterungsprozessen (siehe 1.1.1.3).
- Der hohe zytoplasmatische Kupfer-Spiegel führt zu starker Expression des Gens *PaMtl*, welches das Metallothionein PaMT1 kodiert. PaMT1 komplexiert Kupfer-Ionen, welche nicht in die Cu/Zn-SOD inseriert wurden, so daß sie der Fenton-Reaktion nicht zur Verfügung stehen (siehe 1.1.1.3).
- In Hefe detoxifizieren Metallothioneine Hydroxyl-Radikale etwa 300 mal effektiver als Glutathion (siehe 1.1.2.2; Sato, 1992). Möglicherweise ist PaMT1 in *P. anserina* ebenfalls an der Detoxifikation von Hydroxyl-Radikalen beteiligt, die vermehrte Expression von *PaMtl* würde dann in PaCox17::ble-Stämmen zu verstärktem Abbau von Hydroxyl-Radikalen führen. Dies würde oxidativem Stress entgegenwirken.
- GRISEA ist in PaCox17::ble-Stämmen vermutlich beinahe inaktiv (siehe 1.1.2.1), die Expression des Gens *PaCtr3* wird stark reduziert (siehe 3.4.4). Trotzdem eine *Cox17*-Nullmutante der Hefe keine Änderung des mitochondrialen Kupfer-Reservoirs zeigt (Cobine *et al.*, 2004), kann nicht ausgeschlossen werden, daß in PaCox17::ble-Stämmen wahrscheinlich weniger Kupfer importiert wird, als in Wild-Stämmen. In diesem Fall wäre möglicherweise – trotz des erhöhten zytoplasmatischen Kupferspiegels – das putative mitochondriale Kupfer-Reservoir reduziert. Es ist



fraglich, ob Kupfer des vermuteten mitochondrialen Kupfer-Reservoirs, der Fenton-Reaktion zur Verfügung steht. Wenn dem so ist, dann würde ein vermindertes Kupfer-Reservoir auch die Fenton-Reaktion vermindern. Dadurch würde die endogen produzierte ROS-Menge verringert werden, und Alterungsprozesse würden weniger schnell voranschreiten.

- Wird postuliert, daß PaCOX17 direkt oder indirekt zur Versorgung des putativen mitochondrialen Kupfer-Reservoirs mit Kupfer-Ionen beiträgt, dann wäre auch eine Wirkung auf Fenton-Reaktion und ROS-Produktion innerhalb der mitochondrialen Matrix denkbar. Dem stehen allerdings Befunde aus Hefe gegenüber, die zeigen, daß die Disruption von *Cox17* keinen Einfluß auf das mitochondriale Kupfer-Reservoir hat (Cobine *et al.*, 2004).

PaCox17::ble-Stämme produzieren wahrscheinlich (pro Zeiteinheit und Gewicht) weniger ATP als Wild-Stämme. Dies zeigt sich anhand der reduzierten Wachstumsrate, der stark reduzierten weiblichen Fertilität und der stark verminderten Bildung von Luftmyzel. Auch in Kalorien-reduzierten Individuen kommt es, aufgrund des reduzierten mitochondrialen Membranpotenzials, zu einer Verlangsamung der ATP-Syntheserate.

Bei AOX-Respiration ist der Protonen-Gradient über der inneren mitochondrialen Membran vermutlich geringer als bei COX-Atmung (Lorin *et al.*, 2001). In *cox5::BLE*-Stämmen konnte gezeigt werden, daß die Überexpression der AOX diesen Effekt kompensiert und zu einer phänotypischen Reversion der Mutante führt (Lorin *et al.*, 2001).

Die Überexpression der AOX führt zu einer starken Zunahme der Respirationsrate in Stämmen, die über AOX-Respiration verfügen. Dies wurde durch die Suppression der Mutante *cox5::BLE* gezeigt (Lorin *et al.*, 2001).

Auch in PaCox17::ble-Stämmen ist das mitochondriale Membran-Potenzial wahrscheinlich vermindert. Dieser Effekt der AOX-Respiration ließe sich als „endogene Kalorien-Restriktion“ beschreiben, denn Kalorien-reduzierte Individuen zeigen ebenfalls einen reduzierten Protonen-Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran (siehe 1.2.2; Merry, 2002). Weiterhin führen AOX-Atmung und Kalorien-Restriktion zu einer Verlängerung der Lebensspanne. Die lebensverlängernde Wirkung der Kalorien-Restriktion wurde auch für *P. anserina* beschrieben. Dabei führte die 100-fache Reduktion des Glucose-Gehalts im Medium zu einer 2,65-fachen Verlängerung der durchschnittlichen Lebensspanne (Maas *et al.*, 2004).

Insgesamt wurden 65 *P. anserina*-Stämme untersucht, dabei wurden je fünf Isolate der Stämme Wa3, 7, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 23-25, 29 und Wa52 berücksichtigt. Die Stämme wurden entweder auf Komplexmedium mit 7,0 g/L D-Glucose oder lediglich 0,07 g/L D-Glucose gewachsen. Die Herabsetzung des D-Glucose-Gehalts des Mediums bewirkte eine Verlängerung der durchschnittlichen Lebensspanne von 251±8 Stunden (10,5±0,3 Tage) auf 664±46 Stunden (27,7±1,9 Tage; Maas *et al.*, 2004).

### **Die Lebensspanne der Mutante PaCox17::ble ist vom Paarungs-Typ abhängig**

Erstaunlicherweise zeigen PaCox17::ble-Stämme des Paarungs-Typs „minus“, im Vergleich zu Stämmen des Paarungs-Typs „plus“, eine verdoppelte mittlere Lebensspanne (208%) und mittlere Wuchsstrecke (204%; siehe Abb. 46 und 49, Tab. 22). Auch die mittlere Lebensspanne (bzw. Wuchsstrecke) anderer Stämme hängt vom Paarungs-Typ ab. Ein Beispiel hierfür ist die *cox5::BLE*-Mutante, deren Stämme mit Paarungs-Typ „minus“ etwas mehr als die doppelte (217%) Wuchsstrecke entsprechender „Plus“-Stämme aufweisen. Die Überexpression der AOX in Mutante *cox5::BLE*, und der damit einhergehende starke Rückgang der Wuchsstrecke, vermindern die Diskrepanz der Wuchsstrecke von Stämmen unterschiedlichen Paarungs-Typs. Stämme mit Paarungs-Typ „minus“ wachsen etwa 45% weiter als „Plus“-Stämme (siehe Tab. 22; Lorin *et al.*, 2001). Anscheinend zeigen sich Paarungstyp-bedingte Unterschiede in der mittleren Lebensspanne deutlicher bei Stämmen mit höherer mittlerer Lebensspanne.

Die Ursache für die Unterschiede der mittleren Lebensspanne bzw. Wuchsstrecke der beiden Paarungs-Typen eines Stamme liegt wahrscheinlich nicht im *mat*-Lokus selbst. Das nicht näher charakterisierte Gen *rmp1* (aus dem französischen „regulateur de la mort prematuree“), welches dem *mat*-Lokus unmittelbar benachbart ist, kommt in mindestens acht Allelen vor. Sein Genprodukt scheint die beschriebenen Unterschiede zu verursachen (Contamine *et al.*, 2004; Dequard-Chablat und Sellem, 1994).

Im *ASI-4*-Kontext zeigen Stämme mit Allel *rmp1-2* gegenüber Stämmen mit Allel *rmp1-1* eine deutlich verlängerte Wuchsstrecke. Das Gen *rmp1* ist essenziell, sein Genprodukt RMP1 ist in Mitochondrien und im Zytoplasma lokalisiert. Die Verteilung ist von Zell-Typ und der Entwicklungs-Stufe der Zelle abhängig. Stämme, die RMP1 ohne seine mitochondriale Ziel-Sequenz bilden, sind zwar lebensfähig, zeigen aber Defekte während des vegetativen Wachstums und der Entwicklung der Sexualorgane (Contamine *et al.*, 2004).

### **Wild-Stämme mit verlängerter Lebensspanne**

Um die, zur Bestimmung der Lebensspanne der Mutante PaCox17::ble, notwendigen PaCox17::ble-Sporen isolieren zu können, wurde ein PaCox17::ble-Stamm mit dem Wild-Stamm s gekreuzt. Neben 60 PaCox17::ble-Stämmen wurde auch die Lebensspanne von 20 Wild-Stämmen dieser Kreuzung bestimmt. Die mittlere Lebensspanne dieser 20 Wild-Stämme lag mit 67 Tagen (223%) deutlich über dem Literatur-Wert von 30 Tagen (siehe Abb. 50; Borghouts *et al.*, 2001; Tudzynski und Esser, 1977).

Der Grund für die deutliche Verlängerung der mittleren Lebensspanne von Wild-Stämmen ist möglicherweise auf ihre Eltern zurückzuführen (Wildstamm x Mutante PaCox17::ble). Es ist bekannt, daß die Kreuzung zweier juveniler Wild-Stämme Nachkommen produziert, deren mittlere Lebensspanne deutlich über der liegt, die Nachkommen einer Kreuzung zweier

seneszenten Wild-Stämme aufweisen (Tudzynski, 1978). Eine Kreuzung zwischen einem mittelalten Wild-Stamm und einem mittelalten PaCox17::ble-Stamm erzeugt möglicherweise Nachkommen (Wild-Stämme), deren mittlere Lebensspanne Stämmen ähnelt, die auf eine Kreuzung zweier juveniler Wild-Stämme zurückgehen. Trifft diese Hypothese zu, lässt sich postulieren, daß mittelalte PaCox17::ble-Stämme in einigen entwicklungsbiologischen Bereichen juvenilen Wild-Stämmen ähneln.

Alternativ ließe sich vermuten, daß alle untersuchten Wild-Stämme beispielsweise an einem Stoffwechsel-Defekt leiden, der zu einer Verringerung der Respirationsrate führt, und damit für die Verlängerung der Lebensspanne verantwortlich ist. In diesem Fall wäre die Wachstumsrate der betroffenen Stämme mit hoher Wahrscheinlichkeit herabgesetzt. Als Beispiele mögen hier die Mutanten PaCox17::ble, ex1 und cox5::BLE dienen, deren Wachstumsraten alle deutlich unter der des Wild-Stammes liegen (Kück *et al.*, 1985b; Lorin *et al.*, 2001; Schulte *et al.*, 1988). Die Wuchsrate der 20 analysierten Wild-Stämme liegt mit  $6,53 \pm 0,52$  mm/Tag in einem Bereich, der den bisher beschriebenen Daten des Wild-Stammes *s* entspricht (Borghouts *et al.*, 2001; Tudzynski und Esser, 1977). Entsprechend leiden die 20 Wild-Stämme mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht an Mutations-bedingten Stoffwechsel-Defekten.

### **Mutante PaCox17::ble in entwicklungsbiologischer Hinsicht**

Welche Befunde sprechen für eine veränderte Entwicklungsbiologie der Mutante PaCox17::ble? Die Untersuchung 300 Tage alter PaCox17::ble-Stämme lieferte kein Anzeichen für Amplifikation von pDNA bzw.  $\beta$ -senDNA (3.4.5). Das Chondriom dieser „mittelalten“ Stämme ähnelt dem juveniler Wild-Stämme. Da Mitochondrien (und mit ihnen die mtDNA, pDNA,  $\beta$ -senDNA, etc.) in *P. anserina* maternal vererbt werden (Tudzynski, 1978), würden die Nachkommen eine Kreuzung mit Stamm PaCox17::ble als Mutter wahrscheinlich Mitochondrien erhalten, deren intakte mtDNA weder pDNA noch  $\beta$ -senDNA enthält (abgesehen von geringen Mengen, die durch Southern-Analysen nicht nachweisbar wären). Dies würde sich sicherlich positiv auf die Lebensspanne der Nachkommen auswirken. Ein Beispiel hierfür sind die Nachkommen der Kreuzung PaCox17::ble x WT *s* (siehe voriger Abschnitt, siehe 3.4.6).

Während das Chondriom von PaCox17::ble-Stämmen juvenilen Wildstämmen ähnelt, so stimmen die SOD-Aktivitätsschemata mit mittelalten Wildstämmen überein. Während in juvenilen Wildstämmen (max. 7 Tage) die Mn-SOD dominiert, so wird in mittelalten und seneszenten Wildstämmen die Cu/Zn-SOD prominent. PaCox17::ble-Stämme zeigen während ihrer gesamten Entwicklung starke Cu/Zn-SOD-Aktivität (3.4.4). Bezüglich des SOD-Aktivitätsmusters scheinen diese Stämme keine Phase zu durchlaufen, die juvenilen Wild-Stämmen entspricht.

In einem weiteren entwicklungsbiologischen Aspekt unterscheidet sich Mutante PaCox17::ble deutlich von Wildstämmen: Ihre Fertilität ist drastisch reduziert. PaCox17::ble-Stämme sind nahezu weiblich steril, weibliche Gametangien werden nur in geringem Umfang gebildet. Trotzdem ist die Bildung männlicher Gametangien scheinbar nicht beeinflusst. So zeigt die

Kreuzung von Wildstamm und Mutante PaCox17::ble die Bildung von Perithezien mit fertilen Ascosporen. Die Ursache für die reduzierte Bildung weiblicher Gametangien könnte auf den wahrscheinlich reduzierten ATP-Spiegel von PaCox17::ble-Stämmen zurückzuführen sein. Auch in anderen Stämmen (*grisea*, *ex1*, *cox5::BLE*), welche durch den AOX-Atmungsweg charakterisiert sind, und deshalb vermutlich einen verringerten ATP-Spiegel aufweisen, ist die Bildung weiblicher Gametangien stark vermindert (Dufour *et al.*, 2000; Kück *et al.*, 1985b; Prillinger und Esser, 1977).

Die beobachteten physiologischen Veränderungen der Mutante PaCox17::ble belegen klar Zusammenhänge zwischen Kupfermetabolismus, Ontogenese, Respiration, oxidativem Stress und Alterung. Die Induktion der AOX-Respiration, und die damit verbundene Reduktion der ATP-Syntheserate der Mutante PaCox17::ble, erinnert an die metabolische Situation Kalorien-reduzierter Individuen.

Zwar führte die Disruption des PaCOX17-Weges zu einer enormen Steigerung der Lebensspanne, Unsterblichkeit konnte dennoch nicht erlangt werden. Um dieser einen Schritt näher zu kommen, erscheint es sinnvoll eine dem PaCOX17 nachgeschaltete Komponente zusätzlich auszuschalten. Ein entsprechender Kandidat wird von dem Gen *PaSco1* kodiert.

### 4.3 Charakterisierung von *PaScol*

#### ***PaScol* kodiert ein mögliches Kupferchaperon**

Das Gen *PaScol* wurde durch die Hybridisierung genomischer *P. anserina*-DNA mit einem Teil des ORF von *N. crassa* identifiziert und anschließend isoliert (siehe 3.5). Die Homologie von PaSCO1 zu SCO1-Proteinen anderer Spezies ist signifikant (siehe Tab. 19). Aufgrund des Vorhandenseins einer Reihe konservierter Motive handelt es sich bei PaSCO1 mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein Homolog der SCO1-Familie (siehe Abb. 59).

#### ***PaScol* ist in *P. anserina* in einer Kopie enthalten.**

Bei der Hybridisierung genomischer *P. anserina*-DNA mit der F20-*NcScol*-Sonde (siehe Abb. 51) wurden hybridisierende Fragmente von nur einer Länge detektiert (siehe 3.5.1; siehe Abb. 53). Das Gen *PaScol* ist im Genom von *P. anserina* wahrscheinlich in einer Kopie vorhanden.

Für die beschriebene Southern-Analyse wurde die genomische DNA von *P. anserina* mit *PvuII* geschnitten, dieses Enzym erkennt eine Sequenz von sechs Basenpaaren. Rein statistisch kann an jeder dieser sechs Positionen eine von vier Basen sitzen. Die Abfolgen von sechs Basen bietet somit  $4^6 = 4096$  Kombinationsmöglichkeiten. Durchschnittlich schneidet *PvuII* die DNA also alle 4 kBp. Da im in Abb. 53 gezeigten Gel nur Fragmente von weniger als 0,4 kBp aus dem Gel gelaufen sind, ist es unwahrscheinlich, daß hybridisierende Fragmente geringer Länge nicht detektiert wurden.

Wird die Existenz eines Homologs von PaSCO1 postuliert, beispielsweise ein putatives PaSCO2, wäre das kodierende Gen durch die angewandte Methode möglicherweise nicht detektiert worden. Um die mögliche Existenz einer zweiten Kopie von *PaScol* auszuschließen wären beispielsweise weitere Southern-Analyse mit sehr niedriger Stringenz nötig.

Da bisher – abgesehen von *Sco2* – in keiner, der daraufhin untersuchten Spezies, eine Kopie von *Scol* identifiziert wurde, ist es wahrscheinlich, daß auch in *P. anserina* *PaScol* in nur einer Kopie vorhanden ist (siehe 3.5, Tab. 18 und 19). Da SCO1 und SCO2 in Hefe nur geringe Homologie aufweisen (50% identische Aminosäuren; Smits *et al.*, 1994), erschien es fraglich, ob ein putatives *PaScol2* mit der DNA-Sonde F20-*NcScol* detektierbar ist.

Die Sequenz des Gens *PaScol* (Stamm s; siehe Abb. 58) wurde mit der Sequenz des Genoms von *P. anserina* Stamm S (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) durch den „Blast Search“ (Altschul *et al.*, 1997) verglichen (siehe Methoden). Dabei wurde nach der DNA-Sequenz des ORF von *PaScol* und nach der Aminosäure-Sequenz von PaSCO1 gesucht. Es wurde lediglich das Gen *PaScol* und das von ihm kodierte Protein PaSCO1 des *P. anserina* Stammes S identifiziert.

### ***PaScol* kann eine *Sco1*-Mutante der Hefe nicht komplementieren**

Zur Isolation des Gens *PaScol* wurde eine *P. anserina* cDNA-Bank in eine *Sco1*-Nullmutante der Hefe transformiert (siehe 3.5.1). Ein Ortholog des SCO1 der Hefe konnte durch Komplementations-Studien nicht identifiziert werden. Möglicherweise ist *PaScol* in der cDNA-Bank nicht oder in zu geringem Umfang enthalten. Die Anzahl der untersuchten Transformanten betrug 129.000. Diese Anzahl ist prinzipiell ausreichend, da in *P. anserina* etwa 11.000 Gene exprimiert werden (Silar *et al.*, 2003).

Die Genomgröße von *P. anserina* beträgt etwa 33 - 34 MBp (Javerzat *et al.*, 1993; Osiewacz *et al.*, 1990). Davon kodieren etwa 1,5 MBp für ribosomale „rRNA-Gen-Cluster“ bzw. stellen sieben Zentromer-Regionen dar. Auf der verbleibenden DNA befindet sich im Durchschnitt ein Gen auf 2,8 kBp. Dementsprechend werden im Genom von *P. anserina* etwa 11.000 Gene vermutet, die Proteine kodieren (Silar *et al.*, 2003).

Die Zahl der untersuchten Transformanten übersteigt die Zahl exprimierter Gene um den Faktor 12. Bei sehr geringer Expressionsrate wäre *PaScol* in der verwendeten cDNA-Bank möglicherweise stark unterrepräsentiert oder nicht enthalten.

Die cDNA von *PaScol* wurde isoliert und heterolog in einer *Sco1*-Mutante der Hefe exprimiert. Dabei wurde die Transkription von *PaScol* in den Hefe-Transformanten nachgewiesen. Trotzdem kam es zu keiner Reversion (J. Grief, persönliche Mitteilung). PaSCO1 und des SCO1 der Hefe sind wahrscheinlich keine Orthologe. Neben *PaScol* ist auch das humane *Sco1* nicht befähigt eine *Sco1*-Mutante der Hefe zu komplementieren (Paret *et al.*, 1999). Die Angehörigen der SCO1-Familie zeigen zwar durchaus signifikante Homologie, es handelt sich dennoch nicht um eine Gruppe von Orthologen, wie es beispielsweise für einige Angehörige die COX17-Familie gezeigt wurde (Balandin und Castresana, 2002; Kako *et al.*, 2000; Punter *et al.*, 2000; Stumpferl *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2001; Wintz und Vulpe, 2002).

Die weiterführende Analyse von PaSCO1, und seiner Funktion im Kupfer-Metabolismus von *P. anserina*, könnte wertvolle Einblicke in molekulare Netzwerke liefern, die den Kupfer-Metabolismus mit Respiration, oxidativem Stress und Aspekten der Ontogenese – vor allem der Bildung von Fruchtkörpern und Alterungsprozessen – verbinden.

## 4.4 Ausblick

### Weiterführende Analyse der Mutante PaCox17::ble

Durch die Isolation und Charakterisierung der Mutante PaCox17::ble wurden Befunde über die Verknüpfungen von Kupfermetabolismus, Ontogenese, Respiration, oxidativem Stress und Alterung gewonnen. Die weiterführende Analyse dieser Mutante könnte tiefere Einsichten in Zusammenhänge zwischen Atmungskette, mitochondrialem Membran-Potenzial, Kalorien-Restriktion und Alterungsprozessen liefern. Von besonderem Interesse ist dabei die drastische Verlängerung der Lebensspanne (1250%), die wahrscheinlich auf den in PaCox17::ble-Stämmen abgesenkten Protonengradienten über der inneren mitochondrialen Membran zurückzuführen ist. Vermutlich handelt es sich dabei um eine Art endogener Kalorien-Restriktion. Bei allen daraufhin untersuchten Spezies führte Kalorien-Restriktion zu einer signifikanten Verlängerung der Lebensspanne. Durch die Analyse der Mutante PaCox17::ble ließe sich eventuell die Frage beantworten, in welcher Weise die endogene Kalorien-Restriktion den Metabolismus der Zelle – und damit die Lebensspanne – beeinflusst.

### Überexpression von PaSco1 in Mutante PaCox17::ble

In Hefe führt die Überexpression von *Sco1* zur Reversion einer *Cox17*-Nullmutante (Glerum *et al.*, 1996b). Erste Befunde deuten darauf hin, daß die Überexpression von *PaSco1* in *P. anserina* zumindest zu einer teilweisen Reversion führt: Die Wachstumsrate entsprechender Stämme scheint gegenüber PaCox17::ble-Stämmen erhöht zu sein (J. Grief, pers. Mitteilung). Weitere Analysen der entsprechenden Stämme sind daher von großem Interesse: Die modulierte Expression von *PaSco1* in PaCox17::ble-Stämmen würde es erlauben, die Atmungskette mit zwei terminalen Oxidasen (AOX und COX) zu analysieren, wobei der Anteil von AOX und COX an der Respiration durch die Expressionsrate von *PaSco1* modulierbar wäre.

### Isolation und Charakterisierung einer PaSco1-Nullmutante

Über den Phänotyp einer *PaSco1*-Nullmutante kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Vermutlich würde sie zum Teil ähnliche Charakteristika aufweisen wie Mutante PaCox17::ble, da in beiden Mutanten der Einbau von Kupfer in die COX unterbunden ist. Der Unterschied beider Mutanten liegt in dem Schritt, in dem der Kupfer-Transport gestört ist. Während Mutante PaCox17::ble Kupfer wahrscheinlich weder an *PaSco1*, noch an *PaCox11* weitergibt, wäre bei einer *PaSco1*-Mutante der *PaCox11*-Weg wahrscheinlich nicht beeinflusst. Die vergleichende Analyse beider Mutanten würde Einblicke in den präzisen

Ablauf des Kupfer-Transports und der Integration von Kupfer in Untereinheit 2 der COX ermöglichen.

Eine *PaScol*-Mutante würde sich wahrscheinlich deutlich von der bereits charakterisierten *Scol*-Mutante der Hefe unterscheiden. Im Gegensatz zu Hefe handelt es sich bei *P. anserina* um einen Hyphenpilz. Entsprechend können entwicklungsbiologische Aspekte in Hefe nur sehr eingeschränkt untersucht werden. In *P. anserina* ließen sich beispielsweise Differenzierung, die Bildung von Fruchtkörpern und Seneszenzprozesse analysieren. Weiterhin enthält die Hefe keine induzierbare alternative Oxidase. Bei Ausfall der COX ist die Hefe darauf angewiesen, ATP über Gärung zu synthetisieren. *Podospora* hingegen induziert beim Ausfall der COX die AOX und verfügt dadurch weiterhin über eine funktionelle Atmungskette.

### **Isolation und Charakterisierung einer *PaCox17/PaScol*-Doppel-Nullmutante**

Die Isolation einer *PaScol*-Nullmutante ist aus einem weiteren Grund von Interesse: *PaCox17::ble*-Stämme zeigen zwar eine signifikant verlängerte Lebensspanne, sie sind dennoch nicht unsterblich. Insofern wäre es sinnvoll, eine *PaScol*-Mutante im *PaCox17::ble*-Hintergrund zu analysieren. Die *PaCox17/PaScol*-Doppelnulmutante könnte eine im Vergleich zur *PaCox17*-Nullmutante verlängerte Lebensspanne aufweisen, unter Umständen wäre sie sogar unsterblich. Die vergleichende Analyse von *PaCox17*-, *PaScol*- und *PaCox17/PaScol*-Deletionsmutanten wird sicherlich wertvolle Einblicke in den Kupfer-Stoffwechsel, Ontogenese, Stabilität des Chondrioms, Respiration, ROS-Produktion und Alterungsprozesse filamentöser Pilze liefern.



## 5 Zusammenfassung

Die Grundlage dieser Arbeit bilden Befunde über den Kupfer-Metabolismus des Ascomyceten *Podospira anserina*. In der Kupfermangel-Mutante *grisea* ist der Transkriptionsfaktor GRISEA inaktiv, welcher die Aktivität der hochaffinen Kupfer(I)-Permease PaCTR3 kontrolliert. Der Kupfer-Mangel aller Zellkompartimente führt zu pleiotropen Effekten und zu einer moderaten Verlängerung der mittleren Lebensspanne (60%). Um Effekte des Kupfermangels, die positiven bzw. negativen Einfluß auf die Lebensspanne zeigen, voneinander zu trennen, erschien es vielversprechend, den Kupfermangel auf ein Kompartiment der Zelle zu beschränken.

In Hefe komplexiert COX17 Kupfer und gibt es im mitochondrialen Intermembranraum an SCO1 und COX11 (Assemblierungsfaktoren der Cytochrom-*c*-Oxidase) weiter. Zur Aufschlüsselung Kupfer-abhängiger Stoffwechsel-Wege wurde in dieser Arbeit eine *PaCox17*-Nullmutante konstruiert und charakterisiert. Die *PaCox17::ble*-Deletionsmutante ist durch AOX-Respiration, hohe Aktivität der Cu/Zn-SOD und ein stabilisiertes Chondriom charakterisiert. Eine vergleichende Analyse von Mutante und Wild-Stamm führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Disruption des PaCOX17-Weges verhindert die Assemblierung der COX beinahe völlig. COX-Respiration kann nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen werden.
2. Der Ausfall der COX induziert die alternative Oxidase und führt zu AOX-Respiration.
3. Die Atmungsrate der Mutante *PaCOX17::ble* ist, aufgrund der AOX-Respiration, gegenüber dem Wild-Stamm annähernd verdreifacht.
4. Weiterhin zeigen *PaCox17::ble*-Stämme ein stabilisiertes mitochondriales Genom, normalerweise wird weder plDNA amplifiziert noch wird  $\beta$ -senDNA gebildet.
5. Der Kupfer-Spiegel des Zytoplasmas ist gegenüber Wild-Stämmen stark erhöht.
6. *PaCox17::ble*-Stämme sind durch konstant starke Expression der Cu/Zn-SOD charakterisiert. Die Mn-SOD spielt eine untergeordnete Rolle.
7. Die beschriebenen Effekte führen zu einer enormen Verlängerung der mittleren Lebensspanne (1250% des Wild-Stammes).

Neben der Isolation und Charakterisierung der Mutante *PaCox17::ble* wurde *PaSco1* isoliert und initial charakterisiert. *PaSco1* liegt in *P. anserina* wahrscheinlich in einer Kopie vor. Es kodiert das Kupferbindeprotein PaSCO1, welches Kupfer vermutlich von PaCOX17 übernimmt und an die Untereinheit 2 der COX weitergibt.

In dieser Arbeit wurden Teilaspekte des Kupfermetabolismus von *P. anserina* untersucht. Von besonderem Interesse waren Zusammenhänge zwischen Kupfer-Metabolismus und mitochondrialen Funktionen. Einen weiteren Schwerpunkt bildeten entwicklungsbiologische Prozesse, der Alterungsprozess war von übergeordneter Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, daß Störungen der Kupfer-Homöostase die Respiration, den zellulären oxidativen Stress, die Stabilität des Chondrioms und diverse Entwicklungsprozesse, wie beispielsweise Fortpflanzung und Alterung des Hyphenpilzes beeinflussen.

## 6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).  
Abbildung 2: Schema der intrazellulären Kupferhomöostase in *S. cerevisiae*.  
Abbildung 3: Elektronenfluß und Protonentransfer der Atmungskette.  
Abbildung 4: Quellen von Superoxid-Anionen.  
Abbildung 5: Elektronenfluß und Protonentransfer der Atmungskette mit AOX als terminaler Oxidase.  
Abbildung 6: Amplifikation von pDNA.  
Abbildung 7: Restriktionskarte von Plasmid pPaCox17g-1.  
Abbildung 8: Southern-Analyse von Plasmid pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und genomischer DNA von *P. anserina*.  
Abbildung 9: Southern-Analyse von pPaCox17g-1, Cosmid 28H1 und genomischer DNA.  
Abbildung 10: Southern-Analyse der Cosmide 18F1, 19C2 und genomischer DNA von *P. anserina*.  
Abbildung 11: Schematische Darstellung und Restriktionsanalyse des Plasmids pPaCox17g-2.  
Abbildung 12: Southern-Analyse von Plasmid pPaCox17g-1 bzw. pPaCox17g-2 und genomischer DNA von *P. anserina*.  
Abbildung 13: Vergleich des *PaCox17*-Locus mit klonierten Subfragmenten.  
Abbildung 14: Sequenz des *PaCox17*-Locus und des kodierten Proteins.  
Abbildung 15: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von PaCOX17 mit COX17-Homologen anderer Spezies.  
Abbildung 16: Southern-Analyse genomischer DNA mit Sonde *PaCox17*-ORF.  
Abbildung 17: Schematische Darstellung des homologen Gentaushes.  
Abbildung 18: Konstruktion der Plasmide pPaCox17g-1b und pPaCox17g-1c.  
Abbildung 19: Lokalisation der Oligonukleotide CB und CN.  
Abbildung 20: Deletion des Leserahmens von *PaCox17*.  
Abbildung 21: Restriktions-Analyse des Plasmids pPa $\Delta$ Cox17.  
Abbildung 22: Konstruktion und Verifizierung des Plasmids pPaCox17::ble.  
Abbildung 23: Konstruktion des Plasmids pPaCox17 $\Delta$ ble.  
Abbildung 24: Konstruktion des Plasmids pPaC17-hph.  
Abbildung 25: Konstruktion des Plasmids pBH-4.  
Abbildung 26: Konstruktion der Plasmide pPa $\Delta$ Cox17g-2 und pPa $\Delta$ Cox17 $\Delta$ K.  
Abbildung 27: Konstruktion und Verifizierung des Plasmids pPa $\Delta$ C17-K5.  
Abbildung 28: Konstruktion und Restriktions-Analyse des Plasmids pBH-K5.  
Abbildung 29: Konstruktion und Verifizierung des Gentausch-Plasmids pBHP-9.  
Abbildung 30: Southern-Analyse einiger mit pBHP-9 transformierter Klone.  
Abbildung 31: Southern-Analyse von Klonen, die mit pBHP-9 transformiert wurden.  
Abbildung 32: Southern-Analyse einiger Sphäroplasten von T28.  
Abbildung 33: Stammbaum der Mutante PaCox17::ble.  
Abbildung 34: Phänotyp der Mutante PaCox17::ble im Vergleich zum Wild-Stamm, Mutante grisea und Mutante ex1.  
Abbildung 35: Wachstum von Mutante PaCox17::ble und Wild-Stamm mit steigender Kupfer-Konzentration.  
Abbildung 36: Perithezien-Morphologie der Kreuzung PaCox17::ble<sup>+</sup>-37312 x s<sup>-</sup>-690766.  
Abbildung 37: Southern-Analyse einiger Klone des mit pPaCox17g-2 transformierten Stammes PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10.  
Abbildung 38: Vergleich von Wild-Stamm s<sup>-</sup>, Mutante PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10 und Revertante PaCox17::ble<sup>-</sup>-P10/pPaCox17g-2-4.  
Abbildung 39: Western-Analyse der Mutante PaCox17::ble.  
Abbildung 40: Sauerstoff-Verbrauch von Wild-Stamm s<sup>-</sup> und den Mutanten PaCox17::ble und grisea.  
Abbildung 41: Analyse der Aktivität der Cu/Zn-SOD und der Mn-SOD.  
Abbildung 42: Northern-Analyse des Wild-Stammes und der Mutanten PaCox17::ble und grisea.  
Abbildung 43: Southern-Analyse der mitochondrialen *PaCoxI*-Region.  
Abbildung 44: Southern-Analyse der mitochondrialen *PaCoxI*-Region seneszenten PaCox17::ble-Stämme.  
Abbildung 45: Southern-Analyse der mitochondrialen  $\beta$ -senDNA-Region.  
Abbildung 46: Analyse der Wuchsstrecke von 60 PaCox17::ble-Stämmen.  
Abbildung 47: Analyse der Wuchsstrecke von 20 Wild-Stämmen.  
Abbildung 48: Unterschiede in der Pigmentbildung einiger PaCox17::ble-Stämme.  
Abbildung 49: Analyse der Lebensspanne von 60 PaCox17::ble-Stämmen.  
Abbildung 50: Analyse der Lebensspanne von 20 Wild-Stämmen.  
Abbildung 51: Teilsequenz des *N. crassa NcSco1*.  
Abbildung 52: PCR-Amplifikat, Teil des *N. crassa NcSco1*.  
Abbildung 53: Southern-Analyse genomischer DNA von *P. anserina*, *N. crassa* und des Cosmid-Klons 36E11.  
Abbildung 54: Ausführliche Southern-Analyse des Cosmids 36E11.  
Abbildung 55: Restriktionsanalyse des Plasmids pBSX-13.  
Abbildung 56: Verifizierung des Plasmids pB-PaSco1-12.  
Abbildung 57: Vergleich des *P. anserina PaSco1*-Locus und der Plasmide pB-PaSco1-12 und pBSX-13.  
Abbildung 58: Sequenz des *PaSco1*-Locus und des kodierten Proteins.  
Abbildung 59: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von PaSCO1 mit SCO1-Homologen anderer Spezies.

## 7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Kupfer-bindende Proteinfaktoren eukaryontischer Zellen.  
Tabelle 2: Kupfer-Transporter eukaryontischer Zellen.  
Tabelle 3: Putative CuRE-Elemente in den Promotoren der Zielgene von MAC1 und GRISEA.  
Tabelle 4: Lokalisierung mitochondrialer ROS-Quellen.  
Tabelle 5: Vergleich von Modellsystemen der Alterung.  
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.  
Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.  
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli*-Stämme.  
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete *Podospora anserina*-Stämme.  
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme.  
Tabelle 11: Zusammensetzung Polyacrylamid-Gele.  
Tabelle 12: Zusammensetzung nativer Polyacrylamid-Gele.  
Tabelle 13: Mögliche Promotor-Bindestellen und Bindeproteine des *PaCox17*-Promotors.  
Tabelle 14: COX17-Homologe diverser Spezies.  
Tabelle 15: Übersicht der mit pBHP-9 transformierten Klone.  
Tabelle 16: Wuchsstrecke und Wachstumsrate der Mutante *PaCox17::ble*-P12 und des Wild-Stammes *s*<sup>-</sup>-690766 auf BMM mit steigender Kupfer-Konzentration.  
Tabelle 17: Bestimmung der Sporenkeimungsrate der Kreuzung *PaCox17::ble*<sup>+</sup>-37312 x *s*<sup>-</sup>-690766.  
Tabelle 18: Vorkommen von SCO1-Homologen in diversen Spezies.  
Tabelle 19: SCO1-Homologe diverser Spezies.  
Tabelle 20: Putative GRISEA- und MAC1-Bindestellen.  
Tabelle 21: Korrelation zwischen Respiration und Stabilität des mitochondrialen Genoms.  
Tabelle 22: Vergleich des Wild-Stammes *s* mit langlebigen Mutanten bezüglich Lebensspanne und Wuchsstrecke.  
Tabelle 23: Vergleich von Wild-Stämmen und *PaCox17::ble*-Stämmen.

## 8 Literaturverzeichnis

### A. Originalarbeiten und Übersichtsartikel

- Adams TH, Deising H und Timberlake WE.** (1990). *brlA* requires both zinc fingers to induce development. *Mol. Cell. Biol.* 10(4):1815-1817.
- Affourtit C, Albury MS, Crichton PG und Moore AL.** (2002). Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* 510(3):121-126.
- Alan JF und Holmes NG.** (1986). Electron transport and redox titration. In: *Photosynthesis, Energy Transduction. A practical Approach.* MF Hipkins und NR Baker (eds.) IRL-Press Limited, Oxford.
- Allcroft R, Clegg FG und Uvarov O.** (1959). Prevention of swayback in lambs. *Vet. Rec.* 71:884-889.
- Altschul, SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W und Lipman DJ.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R und Young IG.** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290(5806):457-465.
- Arnesano F, Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL und O'Halloran TV.** (2001). Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. *J. Biol. Chem.* 276(44):41365-41376.
- Askwith C, Eide D, Van Ho A, Bernard PS, Li L, Davis-Kaplan S, Sipe DM und Kaplan J.** (1994). The *FET3* gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell.* 76(2):403-410.
- Askwith C und Kaplan J.** (1998). Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem. Sci.* 23(4):135-138.
- Ausubel FM, Brenz R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA und Struhl K.** (1987). *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Averbeck NB, Borghouts C, Hamann A, Specke V und Osiewacz HD.** (2001). Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 264(5):604-612.
- Babior BM.** (2000). The NADPH oxidase of endothelial cells. *IUBMB Life.* 50(4-5):267-269.
- Babior BM.** (2004). NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16(1):42-47.
- Babior BM, Lambeth JD und Nauseef W.** (2002). The neutrophil NADPH oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 397(2):342-344.
- Balandin T und Castresana C.** (2002). AtCOX17, an Arabidopsis homolog of the yeast copper chaperone COX17. *Plant. Physiol.* 129(4):1852-1857.
- Ballance DJ.** (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast.* 2(4):229-236.
- Barja G.** (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J. Bioenerg. Biomembr.* 31(4):347-366.
- Barja G und Herrero A.** (1998). Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30(3):235-243.
- Beers J, Glerum DM und Tzagoloff A.** (1997). Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J. Biol. Chem.* 272(52):33191-63319.
- Begel O, Boulay J, Albert B, Dufour E und Sainsard-Chanet A.** (1999). Mitochondrial group II introns, cytochrome *c* oxidase, and senescence in *Podospora anserina*. *Mol. Cell. Biol.* 19(6):4093-4100.
- Belcour L und Vierny C.** (1986). Variable DNA splicing sites of a mitochondrial intron: relationship to the senescence process in *Podospora*. *EMBOJ.* 5(3):609-614.
- Bell AA und Wheeler MH.** (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu. Rev. Phytopathol.* 24:411-451.

- Bennetts HW und Chapman FE.** (1937). Copper deficiency in sheep in western Australia: a preliminary account of the aetiology of enzootic ataxia of lambs and anemia of the ewe. *Aust. Vet. J.* 13:138–149.
- Berry S.** (2003). Endosymbiosis and the design of eukaryotic electron transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1606(1-3):57-72.
- Bitterman KJ, Medvedik O und Sinclair DA.** (2003). Longevity regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: linking metabolism, genome stability, and heterochromatin. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(3):376-399.
- Borghouts C, Kerschner S und Osiewacz HD.** (2000). Copper-dependence of mitochondrial DNA rearrangements in *Podospira anserina*. *Curr. Genet.* 37(4):268-275.
- Borghouts C, Kimpel E und Osiewacz HD.** (1997). Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospira anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(20):10768-10773.
- Borghouts C und Osiewacz HD.** (1998). GRISEA, a copper-modulated transcription factor from *Podospira anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of MAC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 260(5):492-502.
- Borghouts C, Scheckhuber CQ, Stephan O und Osiewacz HD.** (2002a). Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospira anserina*: differential expression of *PaCtr3* encoding a copper transporter. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34(11):1355-1371.
- Borghouts C, Scheckhuber CQ, Werner A und Osiewacz HD.** (2002b). Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology.* 3(3):143-153.
- Borghouts C, Werner A, Elthon T und Osiewacz HD.** (2001). Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Mol. Cell. Biol.* 21(2):390-399.
- Boveris A, Cadenas E und Stoppani AO.** (1976). Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156(2):435-444.
- Boveris A und Chance B.** (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134(3):707-716.
- Boyd WA und Williams PL.** (2003). Comparison of the sensitivity of three nematode species to copper and their utility in aquatic and soil toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(11):2768-2774.
- Brakhage AA, Browne P und Turner G.** (1992). Regulation of *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis and penicillin biosynthesis genes *acvA* and *ipnA* by glucose. *J. Bacteriol.* 174(11):3789-3799.
- Brandt U und Trumpower B.** (1994). The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29(3):165-197.
- Brewer NR.** (1987). Comparative metabolism of copper. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 190(6):654-658.
- Buchman C, Skroch P, Welch J, Fogel S und Karin M.** (1989). The *CUP2* gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 9(9):4091-4095.
- Buggy J und Bauer CE.** (1995). Cloning and characterization of *senC*, a gene involved in both aerobic respiration and photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 177:6958-6965.
- Bui LM, Dressendorfer RH, Keen CL, Summary JJ und Dubick MA.** (1994). Zinc status and interleukin-1 beta-induced alterations in mineral metabolism in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206(4):438-444.
- Bullock WO, Fernandez JM und Short JM.** (1987). *Biotechniques* 5:376-379.
- Butler MJ, Day AW, Henson JM und Money NP.** (2001). Pathogenic properties of fungal melanins. *Mycologia* 93, 1–8.
- Butterfield DA.** (2002). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review. *Free Radic. Res.* 36(12):1307-1313.
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI und Stoppani AO.** (1977). Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome *c* reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180(2):248-257.
- Cadenas E und Davies KJ.** (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29(3-4):222-230.

- Calmels T, Parriche M, Durand H und Tiraby G.** (1991). High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes conidiospores* to phleomycin resistance. *Curr. Genet.* 20(4):309-314.
- Carr HS, George GN und Winge DR.** (2002). Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome *c* oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 277(34):31237-31242.
- Carroll MC, Girouard JB, Ulloa JL, Subramaniam JR, Wong PC, Valentine JS und Culotta VC.** (2004). Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(16):5964-5969.
- Casadevall A, Rosas AL und Nosanchuk JD.** (2000). Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3(4):354-358.
- Chance B, Sies H und Boveris A.** (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59(3):527-605.
- Chang EC, Crawford BF, Hong Z, Bilinski T und Kosman DJ.** (1991). Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 266(7):4417-4424.
- Chang YC und Timberlake WE.** (1993). Identification of *Aspergillus brlA* response elements (BREs) by genetic selection in yeast. *Genetics.* 133(1):29-38.
- Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N und Monaco AP.** (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat. Genet.* 3(1):14-19.
- Chen XZ, Peng JB, Cohen A, Nelson H, Nelson N und Hediger MA.** (1999). Yeast SMF1 mediates H(+)-coupled iron uptake with concomitant uncoupled cation currents. *J. Biol. Chem.* 274(49):35089-35094.
- Ciriolo MR, Battistoni A, Falconi M, Filomeni G und Rotilio G.** (2001). Role of the electrostatic loop of Cu,Zn superoxide dismutase in the copper uptake process. *Eur. J. Biochem.* 268(3):737-742.
- Cobine PA, Ojeda LD, Rigby KM und Winge DR.** (2004). Yeast contain a non-proteinacious pool of copper in the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 279(14):14447-14455.
- Cohen A, Nelson H und Nelson N.** (2000). The family of *SMF* metal ion transporters in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 275(43):33388-33394.
- Cohen SN, Chang AC und Hsu L.** (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69(8):2110-2114.
- Contamine V, Zickler D und Picard M.** (2004). The *Podospora rmp1* gene implicated in nucleus-mitochondria cross-talk encodes an essential protein whose subcellular location is developmentally regulated. *Genetics.* 166(1):135-150.
- Coon MJ, Ding XX, Pernecky SJ und Vaz AD.** (1992). Cytochrome P<sub>450</sub>: progress and predictions. *FASEB J.* 6(2):669-673.
- Crofts AR.** (2004). The Cytochrome *bc*<sub>1</sub> Complex: Function in the Context of Structure. *Annu. Rev. Physiol.* 66:689-733.
- Crofts AR, Shinkarev VP, Kolling DR und Hong S.** (2003). The modified Q-cycle explains the apparent mismatch between the kinetics of reduction of cytochromes *c*<sub>1</sub> and *b*<sub>H</sub> in the *bc*<sub>1</sub> complex. *J. Biol. Chem.* 278(38):36191-36201.
- Cui L, Takagi Y, Wasa M, Iiboshi Y, Inoue M, Khan J, Sando K, Nezu R und Okada A.** (1998). Zinc deficiency enhances interleukin-1 $\alpha$ -induced metallothionein-1 expression in rats. *J. Nutr.* 128(7):1092-1098.
- Culotta VC, Howard WR und Liu XF.** (1994). *CRS5* encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269(41):25295-25302.
- Culotta VC, Joh HD, Lin SJ, Slekar KH und Strain J.** (1995). A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J. Biol. Chem.* 270(50):29991-29997.
- Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B und Gitlin JD.** (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272(38):23469-23472.
- Cummings DJ, Belcour L und Grandchamp C.** (1979). Mitochondrial DNA from *Podospira anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. *Mol. Gen. Genet.* 171(3):239-250.
- Cummings DJ, MacNeil IA, Domenico J und Matsuura ET.** (1985). Excision-amplification of mitochondrial DNA during senescence in *Podospira anserina*. DNA sequence analysis of three unique "plasmids". *J. Mol. Biol.* 185(4):659-680.

- Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM und Matsuura ET.** (1990). The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 17(5):375-402.
- Cummings DJ, Michel F und McNally KL.** (1989). DNA sequence analysis of the 24.5 kilobase pair cytochrome oxidase subunit I mitochondrial gene from *Podospora anserina*: a gene with sixteen introns. *Curr. Genet.* 16(5-6):381-406.
- Dameron CT, Winge DR, George GN, Sansone M, Hu S und Hamer D.** (1991). A copper-thiolate polynuclear cluster in the *ACE1* transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88(14): 6127-6131.
- Dancis A, Haile D, Yuan DS und Klausner RD.** (1994a). The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J. Biol. Chem.* 269(41):25660-25667.
- Dancis A, Roman DG, Anderson GJ, Hinnebusch AG und Klausner RD.** (1992). Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(9):3869-3873.
- Dancis A, Yuan DS, Haile D, Askwith C, Eide D, Moehle C, Kaplan J und Klausner RD.** (1994b). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell.* 76(2):393-402.
- Danks DM.** (1995). The metabolic and molecular basis of inherited disease. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WM und Valle D. (eds), *Disorders of Copper Transport*. McGraw-Hill, New York, NY. S. 2211-2235.
- Dequard-Chablat M und Allandt C.** (2002). Two copies of *mtbmg1*, encoding a novel mitochondrial HMG-like protein, delay accumulation of mitochondrial DNA deletions in *Podospora anserina*. *Eukaryot. Cell.* 1(4):503-513.
- Dequard-Chablat M und Sellem CH.** (1994). The S12 ribosomal protein of *Podospora anserina* belongs to the S19 bacterial family and controls the mitochondrial genome integrity through cytoplasmic translation. *J. Biol. Chem.* 269(21):14951-14956.
- DiDonato M, Narindrasorasak S, Forbes JR, Cox DW und Sarkar B.** (1997). Expression, purification, and metal binding properties of the N-terminal domain from the wilson disease putative copper-transporting ATPase (ATP7B). *J. Biol. Chem.* 272(52):33279-33282.
- Dierick HA, Adam AN, Escara-Wilke JF und Glover TW.** (1997). Immunocytochemical localization of the Menkes copper transport protein (ATP7A) to the trans-Golgi network. *Hum. Mol. Genet.* 6(3):409-416.
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA und Eide DJ.** (1994). The *FET4* gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269(42):26092-26099.
- Drahota Z, Chowdhury SK, Floryk D, Mracek T, Wilhelm J, Rauchova H, Lenaz G und Houstek J.** (2002). Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. *J. Bioenerg. Biomembr.* 34(2):105-113.
- Droge W.** (2003). Oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 543:191-200.
- Dufour E, Boulay J, Rincheval V und Sainsard-Chanet A.** (2000). A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(8):4138-4143.
- Durnam DM, Perrin F, Gannon F und Palmiter RD.** (1980). Isolation and characterization of the mouse metallothionein-I gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77(11):6511-6515.
- Eide DJ.** (2000). Metal ion transport in eukaryotic microorganisms: insights from *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Microb. Physiol.* 43:1-38.
- Eisses JF, Stasser JP, Ralle M, Kaplan JH und Blackburn NJ.** (2000). Domains I and III of the human copper chaperone for superoxide dismutase interact via a cysteine-bridged Dicopper(I) cluster. *Biochemistry.* 39(25):7337-7342.
- Elthon TE, Nickels RL und McIntosh L.** (1989). Monoclonal Antibodies to the Alternative Oxidase of Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* 89:1311-1317.
- Esser K.** (1956). Gen-Mutanten von *Podospora anserina* (CES.) REHM mit männlichem Verhalten. *Naturwissenschaften* 43:284.
- Esser K.** (1963a). Quantitatively and qualitatively phenoloxidases in *Podospora anserina* due to mutations at non-linked loci. *Proc. XIth Intern. Congr. Genetics.* 1:51-52.



- Esser K.** (1963b). Die Phenoloxidasen des Ascomyceten *Podospora anserina*. I. Die Identifizierung von Laccase und Tyrosinase beim Wildstamm. Arch. Mikrobiol. 46(1):217-226.
- Esser K.** (1974). *Podospora anserina*. In R. C. King (ed.), Handbook of Genetics, vol. I. Plenum Press, New York. 531-551.
- Esser K und Keller W.** (1976). Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 144(1):107-110.
- Esser K und Tudzynski P.** (1980). Senescence in fungi. In K. V. Thimann (ed.), Senescence in plants. CRC Press, Boca Raton, Fla. 67-83.
- Fang J und Beattie DS.** (2003). External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. Free. Radic. Biol. Med. 34(4):478-488.
- Faßbender S, Brühl KH, Ciriacy M und Kück U.** (1994). Reverse transcriptase activity of an intron encoded polypeptide. EMBO J. 13(9):2075-2083.
- Feinberg AP und Vogelstein B.** (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. Anal. Biochem. 137(1):266-267.
- Field LS, Furukawa Y, O'Halloran TV und Culotta VC.** (2003). Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. J. Biol. Chem. 278(30):28052-28059.
- Flohe L und Ötting F.** (1984). Superoxide dismutase assays. Methods Enzymol. 105:93-104.
- Fogel S und Welch JW.** (1982). Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (17):5342-5346.
- Forman HJ und Kennedy J.** (1976). Dihydroorotate-dependent superoxide production in rat brain and liver. A function of the primary dehydrogenase. Arch. Biochem. Biophys. 173(1):219-224.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N und Purnelle B.** (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 440(3):325-331.
- Frese D und Stahl U.** (1992). Oxidative stress and ageing in the fungus *Podospora anserina*. Mech. Ageing Dev. 65(2-3):277-288.
- Fridovich I.** (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann. N.Y. Acad. Sci. 893:13-18.
- Fridovich I.** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu. Rev. Biochem. 64:97-112.
- Fu D, Beeler TJ und Dunn TM.** (1995). Sequence, mapping and disruption of *CCC2*, a gene that cross-complements the  $Ca^{2+}$ -sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the  $Cu^{2+}$ -ATPase subfamily. Yeast. 11(3):283-292.
- Gadd GW.** (1980). Melanin production and differentiation in batch cultures of the polymorphic fungus. FEMS Microbiol. Lett.. 9:237-240.
- Garcia-Borron JC und Solano F.** (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. Pigment Cell Res. 15(3):162-173.
- Genova ML, Ventura B, Giuliano G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G und Lenaz G.** (2001). The site of production of superoxide radical in mitochondrial Complex I is not a bound ubisemiquinone but presumably iron-sulfur cluster N2. FEBS Lett. 505(3):364-368.
- Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS und Alexandraki D.** (1997). The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. J. Biol. Chem. 272(21):13786-13792.
- George GN, Byrd J und Winge DR.** (1988). X-ray absorption studies of yeast copper metallothionein. J. Biol. Chem. 263(17):8199-8203.
- Gerdemann C, Eicken C und Krebs B.** (2002). The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. Acc. Chem. Res. 35(3):183-191.
- Ghoshal K, Majumder S, Li Z, Bray TM und Jacob ST.** (1999). Transcriptional induction of metallothionein-I and -II genes in the livers of Cu,Zn-superoxide dismutase knockout mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 264(3):735-742.

- Gietz RD und Woods RA.** (1994). High efficiency transformation with lithium acetate, in: J.S. Johnston (Ed.), *Molecular Genetics of Yeast*, Oxford University Press, Oxford, 1994, pp. 121–134.
- Glerum DM, Shtanko A und Tzagoloff A.** (1996a). Characterization of *COX17*, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 271(24):14504-14509.
- Glerum DM, Shtanko A und Tzagoloff A.** (1996b). *SCO1* and *SCO2* act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 271(34):20531-20535.
- Ghosh D.** 1999. Object oriented Transcription Factors Database (ooTFD). *Nucleic Acids Res.* 27(1):315-317.
- Gossiau A und Rensing L.** (2002). Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Z. Gerontol. Geriatr.* 35(2):139-150.
- Gredilla R, Sanz A, Lopez-Torres M und Barja G.** (2001). Caloric restriction decreases mitochondrial free radical generation at complex I and lowers oxidative damage to mitochondrial DNA in the rat heart. *FASEB J.* 15(9):1589-1591.
- Gross C, Kelleher M, Iyer VR, Brown PO und Winge DR.** (2000). Identification of the copper regulon in *Saccharomyces cerevisiae* by DNA microarrays. *J. Biol. Chem.* 275(41):32310-32316.
- Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL und Hediger MA.** (1997). Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388(6641):482-488.
- Halliwell B und Gutteridge J.** (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press: Oxford.
- Halliwell B und Gutteridge JMC.** (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*. ed 3. New York, Oxford University Press.
- Hamer DH.** (1986). Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.* 55:913-951.
- Hamer DH, Thiele DJ und Lemontt JE.** (1985). Function and autoregulation of yeast copperthionein. *Science.* 228(4700):685-690.
- Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D und Cadenas E.** (2003). Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *J. Biol. Chem.* 278(8):5557-5563.
- Han D, Williams E und Cadenas E.** (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* 353(Pt.2):411-416.
- Hanahan D.** (1985) Techniques for transformation in *E. coli*. In Rickwood, D. und Hames, B.D. (eds.), *DNA cloning, a practical approach*, Vol. 1, pp. 109-135. IRL Press.
- Harman D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11(3):298-300.
- Harman D.** (1981). The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(11):7124-7128.
- Harman D.** (1998a). Aging and oxidative stress. *J. Int. Fed. Clin. Chem.* 10(1):24-27.
- Harman D.** (1998b). Aging: phenomena and theories. *Ann. NY. Acad. Sci.* 854:1-7.
- Harman D.** (2003). The free radical theory of aging. *Antioxid. Redox Signal.* 5(5):557-561.
- Harris ZL, Klomp LW und Gitlin JD.** (1998). Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 67(5):972-977.
- Hart EB.** (1928). Copper as a supplement to iron for hemoglobin building in the rat. *J. Biol. Chem.* 77, 797–812.
- Hassett R, Dix DR, Eide DJ und Kosman DJ.** (2000). The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 351(Pt 2):477-484.
- Hassett R und Kosman DJ.** (1995). Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 270(1):128-134.
- Heaton DN, George GN, Garrison G und Winge DR.** (2001). The mitochondrial copper metallochaperone Cox17 exists as an oligomeric, polycopper complex. *Biochemistry.* 40(3):743-751.
- Heaton DN, Nittis T, Srinivasan C und Winge DR.** (2000). Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J. Biol. Chem.* 275(48):37582-37587.

- Helfand SL und Rogina B.** (2003). Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Genet.* 37:329-348.
- Hensgens LA, Bonen L, de Haan M, van der Horst G und Grivell LA.** (1983). Two intron sequences in yeast mitochondrial *COXI* gene: homology among URF-containing introns and strain-dependent variation in flanking exons. *Cell.* 32(2):379-389.
- Heredia J, Crooks M und Zhu Z.** (2001). Phosphorylation and Cu<sup>+</sup> coordination-dependent DNA binding of the transcription factor Mac1p in the regulation of copper transport. *J. Biol. Chem.* 276(12):8793-8797.
- Herzfeld F und Esser K.** (1969). Die Phenoloxidasen des Ascomyceten *Podospora anserina*. IV. Reinigung und Eigenschaften der Tyrosinase. *Arch. Mikrobiol.* 65(2):146-162.
- Hidiroglou M und Knipfel JE.** (1981). Maternal fetal relationships of copper, manganese and sulfur in ruminants. A review. *J. Dairy Science* 64,1637-1647.
- Himelblau E, Mira H, Lin SJ, Culotta VC, Penarrubia L und Amasino RM.** (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from Arabidopsis. *Plant Physiol.* 117(4):1227-1234.
- Hiromura M und Sakurai H.** (1999). Molecular cloning of rat ATX1 homologue protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265(2):509-512.
- Hiser L, Di Valentin M, Hamer AG und Hosler JP.** (2000). Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 275(1):619-623.
- Horecka J, Kinsey PT und Sprague GF.** (1995). Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *LYS7* gene: evidence for function outside of lysine biosynthesis. *Gene.* 162(1):87-92.
- Hornig YC, Cobine PA, Maxfield AB, Carr HS und Winge DR.** (2004). Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 279(34):35334-35340.
- Hostetler CE, Kincaid RL und Mirando MA.** (2003). The role of essential trace elements in embryonic and fetal development in livestock. *Vet. J.* 166(2):125-39.
- Hsi G, Cullen LM, Moira Glerum D und Cox DW.** (2004). Functional assessment of the carboxy-terminus of the Wilson disease copper-transporting ATPase, ATP7B. *Genomics.* 83(3):473-481.
- Hung IH, Suzuki M, Yamaguchi Y, Yuan DS, Klausner RD und Gitlin JD.** (1997). Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 272(34):21461-21466.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ und White TJ.** (1990). PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, USA.
- Irani K, Xia Y, Zweier JL, Sollott SJ, Der CJ, Fearon ER, Sundaresan M, Finkel T und Goldschmidt-Clermont PJ.** (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 275(5306):1649-1652.
- Jackman MP, Hajnal A und Lerch K.** (1991). Albino mutants of *Streptomyces glaucescens* tyrosinase. *Biochem. J.* 274(Pt3):707-713.
- Jamet-Vierny C, Begel O und Belcour L.** (1980). Senescence in *Podospora anserina*: amplification of a mitochondrial DNA sequence. *Cell.* 21(1):189-194.
- Jamet-Vierny C, Boulay J, Begel O und Silar P.** (1997a). Contribution of various classes of defective mitochondrial DNA molecules to senescence in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 31(2):171-178.
- Jamet-Vierny C, Boulay J und Briand JF.** (1997b). Intramolecular cross-overs generate deleted mitochondrial DNA molecules in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 31(2):162-170.
- Jamet-Vierny C und Shechter E.** (1994). Senescence-specific mitochondrial DNA molecules in *P. anserina*: evidence for transcription and normal processing of the RNA. *Curr. Genet.* 25(6):538-544.
- Javerzat JP, Jacquier C und Barreau C.** (1993). Assignment of linkage groups to the electrophoretically-separated chromosomes of the fungus *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 24(3):219-222.
- Jensen LT, Posewitz MC, Srinivasan C und Winge DR.** (1998). Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273(37):23805-23811.

- Joenje H.** (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res.* 219(4):193-208.
- Jorgensen EM und Mango SE.** (2002). The art and design of genetic screens: *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Rev. Genet.* 3(5):356-369.
- Juneau P, El Berdey A und Popovic R.** (2002). PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42(2):155-164.
- Jungmann J, Reins HA, Lee J, Romeo A, Hassett R, Kosman D und Jentsch S.** (1993). MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J.* 12(13):5051-5056.
- Kagi RHJ.** (1993). Evolution, structure and chemical activity of class I metallothioneins: an overview. In: Suzuki KT, Imura N and Kimura M (eds) *Metallothioneins III*. Birkhauser Verlag, Basel. 29–56.
- Kagi JHR und Vallee BL.** (1960). Metallothionein: a cadmium- and zink-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.* 235:3460-3465.
- Kako K, Tsumori K, Ohmasa Y, Takahashi Y und Munekata E.** (2000). The expression of Cox17p in rodent tissues and cells. *Eur. J. Biochem.* 267(22):6699-6707.
- Kampfenkel K, Kushnir S, Babiychuk E, Inze D und Van Montagu M.** (1995). Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J. Biol. Chem.* 270(47):28479-28486.
- Karin M und Richards RI.** (1982). Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature.* 299(5886):797-802.
- Kaur H und Halliwell B.** (1994) Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett.* 350(1):9-12.
- Kloekener-Gruissem B, McEwen JE und Poyton RO.** (1987). Nuclear functions required for cytochrome *c* oxidase biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: multiple trans-acting nuclear genes exert specific effects on expression of each of the cytochrome *c* oxidase subunits encoded on mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* 12(5):311-322.
- Klomp AE, Tops BB, Van Denberg IE, Berger R und Klomp LW.** (2002). Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem. J.* 364(Pt 2):497-505.
- Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC und Gitlin JD.** (1997). Identification and functional expression of *HAHI*, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J. Biol. Chem.* 272(14):9221-9226.
- Knight SA, Labbe S, Kwon LF, Kosman DJ und Thiele DJ.** (1996). A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes. Dev.* 10(15):1917-1929.
- Kobayashi T, Vieira WD, Potterf B, Sakai C, Imokawa G und Hearing VJ.** (1995). Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *J. Cell Sci.* 108(Pt6):2301-2309.
- Kück U, Kappelhoff B und Esser K.** (1985a). Despite mtDNA polymorphism the mobile intron (pIDNA) of the *COI* gene is present in ten different races of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 10:59–67.
- Kück U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U und Esser K.** (1985b). The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 9(5):373-382.
- Kück U, Stahl U und Esser K.** (1981). Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.* 3:151-156.
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE und Kunz WS.** (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279(6):4127-4135.
- Kuo YM, Zhou B, Cosco D und Gitschier J.** (2001). The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98(12):6836-6841.
- Kushnareva Y, Murphy AN und 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(Pt 2):545-553.
- Labbe S, Zhu Z und Thiele DJ.** (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J. Biol. Chem.* 272(25):15951-15958.

- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(259):680-685.
- Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV und Rosenzweig AC.** (2000). Heterodimer formation between superoxide dismutase and its copper chaperone. *Biochemistry*. 39(48):14720-14727.
- Lambert AJ und Merry BJ.** (2004). Effect of caloric restriction on mitochondrial reactive oxygen species production and bioenergetics: reversal by insulin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 286(1):R71-R79.
- Lambert AJ, Wang B und Merry BJ.** (2004). Exogenous insulin can reverse the effects of caloric restriction on mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316(4):1196-1201.
- Langfelder K, Streibel M, Jahn B, Haase G und Brakhage AA.** (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal. Genet. Biol.* 38(2):143-158.
- Larin D, Mekios C, Das K, Ross B, Yang AS und Gilliam TC.** (1999). Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J. Biol. Chem.* 274(40):28497-28504.
- Lecellier G und Silar P.** (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25(2):122-123.
- LeDoux SP, Driggers WJ, Hollensworth BS und Wilson GL.** (1999). Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat. Res.* 434(3):149-59.
- Lee J, Pena MM, Nose Y und Thiele DJ.** (2002a). Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J. Biol. Chem.* 277(6):4380-4387.
- Lee J, Petris MJ und Thiele DJ.** (2002b). Characterization of mouse embryonic cells deficient in the Ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J. Biol. Chem.* 277(43):40253-40259.
- Lee J, Prohaska JR, Dagenais SL, Glover TW und Thiele DJ.** (2000). Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene*. 254(1-2):87-96.
- Lee J, Prohaska JR und Thiele DJ.** (2001). Essential role for mammalian copper transporter *Ctr1* in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98(12):6842-6847.
- Lenaz G.** (2001). The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life*. 52(3-5):159-164.
- Lin SJ und Culotta VC.** (1995) The *ATX1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(9):3784-3788.
- Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV und Culotta VC.** (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae ATX1* gene in copper trafficking and iron transport. *J. Biol. Chem.* 272(14):9215-9220.
- Linder MC und Hazegh-Azam M.** (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *Am. J. Clin. Nutr.* 63(5):797-811.
- Liochev SI und Fridovich I.** (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*. 48(2):157-161.
- Liu XF, Supek F, Nelson N und Culotta VC.** (1997). Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae BSD2* gene. *J. Biol. Chem.* 272(18): 11763-11769.
- Lode A, Kuschel M, Paret C und Rödel G.** (2000). Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett.* 485(1):19-24.
- Lode A, Paret C und Rödel G.** (2002). Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Sco2p reveals a high degree of redundancy with Sco1p. *Yeast*. 19(11):909-922.
- Logan JJ, Harveyson KB, Wisdom GB, Hughes AE und Archbold GP.** (1994). Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus. *QJM*. 87(11):663-670.
- Lorin S, Dufour E, Boulay J, Begel O, Marsy S und Sainsard-Chanet A.** (2001). Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.* 42(5):1259-1267.
- Lundin M, Nehlin JO und Ronne H.** (1994). Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* 14(3):1979-1985.

- Lutsenko S und Petris MJ.** (2003). Function and regulation of the mammalian copper-transporting ATPases: insights from biochemical and cell biological approaches. *J. Membr. Biol.* 191(1):1-12.
- Lutsenko S, Petrukhin K, Cooper MJ, Gilliam CT und Kaplan JH.** (1997). N-terminal domains of human copper-transporting adenosine triphosphatases (the Wilson's and Menkes disease proteins) bind copper selectively in vivo and in vitro with stoichiometry of one copper per metal-binding repeat. *J. Biol. Chem.* 272(30):18939-18944.
- McCay CM, Crowell MF und Maynard LA.** (1989). The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. *Nutrition.* 5(3):155-172.
- Maas MF, de Boer HJ, Debets AJ und Hoekstra RF.** (2004). The mitochondrial plasmid pAL2-1 reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet. Biol.* 41(9):865-871.
- Marbach K, Fernandez-Larrea J und Stahl U.** (1994). Reversion of a long-living, undifferentiated mutant of *Podospora anserina* by copper. *Curr. Genet.* 26(2):184-186.
- Margulis L.** (1971). The origin of plant and animal cells. *Am. Sci.* 59(2):230-235.
- Martinez MV und Whitaker JR.** (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* 6(6):195-200.
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR und Simons JR.** (1998). Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273(37):23716-23721.
- Marvin ME, Williams PH und Cashmore AM.** (2003). The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. *Microbiology.* 149(Pt.6):1461-1474.
- Mattatall NR, Jazairi J und Hill BC.** (2000). Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 275:28802-28809.
- Maxfield AB, Heaton DN und Winge DR.** (2004). Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* 279(7):5072-5080.
- McCord JM und Fridovich I.** (1988). Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic. Biol. Med.* 5(5-6):363-369.
- McLennan HR und Degli Esposti M.** (2000). The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32(2):153-162.
- Medvedev ZA.** (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 65(3):375-398.
- Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR und Sung JH.** (1962). A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics.* 29:764-779.
- Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhawe M und Siemieniak D.** (1993). Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat. Genet.* 3(1):20-25.
- Merry BJ.** (2002). Molecular mechanisms linking calorie restriction and longevity. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34(11):1340-1354.
- Mertz W.** (1981). The essential trace elements. *Science.* 213(4514):1332-1338.
- Michel F und Lang BF.** (1985). Mitochondrial class II introns encode proteins related to the reverse transcriptases of retroviruses. *Nature.* 316(6029):641-643.
- Michel H, Behr J, Harrenga A und Kannt A.** (1998). Cytochrome *c* oxidase: structure and spectroscopy. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:329-356.
- Mitchell P.** (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* 59(2):137-139.
- Morita H, Ikeda S, Yamamoto K, Morita S, Yoshida K, Nomoto S, Kato M und Yanagisawa N.** (1995). Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol.* 37(5):646-656.
- Münger K, Germann UA und Lerch K.** (1985). Isolation and structural organization of the *Neurospora crassa* copper metallothionein gene. *EMBO J.* 4(10):2665-2668.
- Münger K und Lerch K.** (1985). Copper metallothionein from the fungus *Agaricus bisporus*: chemical and spectroscopic properties. *Biochemistry.* 6751-6756.

- Nelson N.** (1999). Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J.* 18(16):4361-4371.
- Nelson N und Schatz G.** (1979). Energy-dependent processing of cytoplasmically made precursors to mitochondrial proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76(9):4365-4369.
- Nittis T, George GN und Winge DR.** (2001). Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome *c* oxidase function is a Cu(I)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 276(45):42520-42526.
- Nomura K, Imai H, Koumura T, Kobayashi T und Nakagawa Y.** (2000). Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome *c* from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia-induced apoptosis. *Biochem. J.* 351(Pt.1):183-193.
- Nosanchuk JD und Casadevall A.** (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell. Microbiol.* 5(4):203-223.
- O'Halloran TV und Culotta VC.** (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J. Biol. Chem.* 275(33):25057-25060.
- Orr WC und Sohal RS.** (1994). Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science.* 263(5150):1128-1130.
- Osiewacz HD.** (1994). A versatile shuttle cosmid vector for the efficient construction of genomic libraries and for the cloning of fungal genes. *Curr. Genet.* 26(1):87-90.
- Osiewacz HD.** (2002a). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res. Rev.* 1(3):425-442.
- Osiewacz HD.** (2002b). Mitochondrial functions and aging. *Gene.* 286(1):65-71.
- Osiewacz HD, Clairmont A und Huth M.** (1990). Electrophoretic karyotype of the ascomycete *Podospira anserina*. *Curr. Genet.* 18, 481-483.
- Osiewacz HD. und Esser K.** (1984). The mitochondrial plasmid of *Podospira anserina*: a mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr. Genet.* 8:299-305.
- Osiewacz HD und Nuber U.** (1996). GRISEA, a putative copper-activated transcription factor from *Podospira anserina* involved in differentiation and senescence. *Mol. Gen. Genet.* 252(1-2):115-124.
- Osiewacz HD, Skaletz A und Esser K.** (1991). Integrative transformation of the ascomycete *Podospira anserina*: identification of the mating-type locus on chromosome VII of electrophoretically separated chromosomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(1):38-45.
- Osiewacz HD und Stumpferl SW.** (2001). Metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32(3):185-197.
- Palumaa P, Kangur L, Voronova A und Sillard R.** (2004). Metal-binding mechanism of Cox17, a copper chaperone for cytochrome *c* oxidase. *Biochem. J.* 382(Pt. 1):307-314.
- Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, Krishna S, Walker W, Selby J, Glerum DM, Coster RV, Lyon G, Scalais E, Lebel R, Kaplan P, Shanske S, De Vivo DC, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S und Schon EA.** (1999). Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in *SCO2*, a COX assembly gene. *Nat. Genet.* 23(3):333-337.
- Paret C, Lode A, Krause-Buchholz U und Rödel G.** (2000). The P(174)L mutation in the human *hSCO1* gene affects the assembly of cytochrome *c* oxidase. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 279:341-347.
- Paret C, Ostermann K, Krause-Buchholz U, Rentzsch A und Rödel G.** (1999). Human members of the *SCO1* gene family: complementation analysis in yeast and intracellular localization. *FEBS Lett.* 447(1):65-70.
- Park JW und Babior BM.** (1997). Activation of the leukocyte NADPH oxidase subunit p47phox by protein kinase C. A phosphorylation-dependent change in the conformation of the C-terminal end of p47phox. *Biochemistry.* 36(24):7474-7480.
- Payne AS und Gitlin JD.** (1998). Functional expression of the menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases. *J. Biol. Chem.* 273(6):3765-3770.
- Pena MM, Koch KA und Thiele DJ.** (1998). Dynamic regulation of copper uptake and detoxification genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18(5):2514-2523.

- Pena MM, Puig S und Thiele DJ.** (2000). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J. Biol. Chem.* 275(43):33244-33251.
- Petris MJ, Mercer JF, Culvenor JG, Lockhart P, Gleeson PA und Camakaris J.** (1996). Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J.* 15(22):6084-6095.
- Petris MJ, Strausak D und Mercer JF.** (2000). The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum. Mol. Genet.* 9(19):2845-2851.
- Petrukhin K, Lutsenko S, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH und Gilliam TC.** (1994). Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum. Mol. Genet.* 3(9):1647-1656.
- Petruzzella V, Tiranti V, Fernandez P, Ianna P, Carozzo R und Zeviani M.** (1998). Identification and characterization of human cDNAs specific to *BCS1*, *PET112*, *SCO1*, *COX15*, and *COX11*, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics.* 54(3):494-504.
- Phung CD, Ezieme JA und Turrens JF.** (1994). Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 315(2):479-482.
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW und Vogelstein B.** (1997). A model for p53-induced apoptosis. *Nature.* 389(6648):300-305.
- Portnoy ME, Liu XF und Culotta VC.** (2000). *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol. Cell. Biol.* 20(21):7893-7902.
- Portnoy ME, Schmidt PJ, Rogers RS und Culotta VC.** (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics.* 265(5):873-882.
- Price DL und Sisodia SS.** (1998). Mutant genes in familial Alzheimer's disease and transgenic models. *Annu. Rev. Neurosci.* 21:479-505.
- Prigge ST, Mains RE, Eipper BA und Amzel LM.** (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanism and function. *Cell. Mol. Life. Sci.* 57(8-9):1236-1259.
- Prillinger H und Esser K.** (1977). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospira anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol. Gen. Genet.* 156(3):333-345.
- Prohaska JR und Lukasewycz OA.** (1990). Effects of copper deficiency on the immune system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 262:123-143.
- Puig S und Thiele DJ.** (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6(2):171-180.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH und van den Hondel CA.** (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene.* 56(1):117-124.
- Punter FA, Adams DL und Glerum DM.** (2000). Characterization and localization of human *COX17*, a gene involved in mitochondrial copper transport. *Hum. Genet.* 107(1):69-74.
- Punter FA und Glerum DM.** (2003). Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase. *J. Biol. Chem.* 278(33):30875-30880.
- Quaife CJ, Kelly EJ, Masters BA, Brinster RL und Palmiter RD.** (1998). Ectopic expression of metallothionein-III causes pancreatic acinar cell necrosis in transgenic mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 148(1):148-157.
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD und Freeman BA.** (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266(32):22028-22034.
- Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC und O'Halloran TV.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284(5415):805-808.
- Raper HS.** (1928). The anaerobic oxidases. *Physiol. Rev.* 8:245-282.
- Raha S, McEachern GE, Myint AT und Robinson BH.** (2000) Superoxides from mitochondrial complex III: the role of manganese superoxide dismutase. *Free. Radic. Biol. Med.* 29(2):170-180.



- Rayms-Keller A, Olson KE, McGaw M, Oray C, Carlson JO und Beaty BJ.** (1998). Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 39(1):41-47.
- Rees EM, Lee J und Thiele DJ.** (2004). Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter. *J. Biol. Chem.* 279(52):54221-54229.
- Reichert AS und Neupert W.** (2002). Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592(1): 41-49.
- Rentzsch A, Krummeck-Weiss G, Hofer A, Bartuschka A, Ostermann K und Rödel G.** (1999). Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase. *Curr. Genet.* 35(2):103-108.
- Richter C, Park JW und Ames BN.** (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85(17):6465-6467.
- Ridder R und Osiewacz HD.** (1992). Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. *Curr. Genet.* 21(3):207-213.
- Rizet G.** (1953a). Sur la longevite des phenomen des souches de *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 237:1106-1109.
- Rizet G.** (1953b). Sur l'impossibilite d'obtenir la multiplication vegetative ininterrompue illimite de l'ascomycete *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci. Paris.* 237:838-855.
- Robb DA und Gutteridge S.** (1981). Polypeptide composition of two fungal tyrosinases. *Phytochemistry.* 20:1481-1485.
- Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M und Freeman BA.** (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. Biol. Chem.* 269(42):26066-26075.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N.** (1985) Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230(4732):1350-1354.
- Sambrook J, Frisch EF und Maniatis T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F und Garcia-Carmona F.** (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1247(1):1-11.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12):5463-5467.
- Sato M.** (1992). Biological antioxidant defence system and metallothionein. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.* 38:228-239.
- Sato M und Gitlin JD.** (1991). Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 266(8):5128-5134.
- Satoh M und Kuroiwa T.** (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell. Res.* 196(1):137-140.
- Scheinberg ICH und Gitlin D.** (1952). Deficiency of ceruloplasmin in patients with hepatolenticular degeneration (Wilson's disease). *Science.* 116(3018):484-485.
- Schmidt PJ, Kunst C und Culotta VC.** (2000). Copper activation of superoxide dismutase 1 (SOD1) *in vivo*. Role for protein-protein interactions with the copper chaperone for SOD1. *J. Biol. Chem.* 275(43):33771-33776.
- Schmidt PJ, Ramos-Gomez M und Culotta VC.** (1999). A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J. Biol. Chem.* 274(52):36952-36956.
- Schmidt U, Riederer B, Morl M, Schmelzer C und Stahl U.** (1990). Self-splicing of the mobile group II intron of the filamentous fungus *Podospora anserina* (COI I1) *in vitro*. *EMBO J.* 9(7):2289-2298.
- Schöneich C, Pogocki D, Hug GL und Bobrowski K.** (2003). Free radical reactions of methionine in peptides: mechanisms relevant to beta-amyloid oxidation and Alzheimer's disease. *J. Am. Chem. Soc.* 125(45):13700-13713.

- Schon EA, Bonilla E und DiMauro S.** (1997). Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29(2):131-149.
- Schulte E.** (1988). Einfluß struktureller Umordnungen des Chondrioms auf die Seneszenz bei *Podospora anserina.*, Cramer J. (Hrsg.) *Bibliotheka Mycologica* Bd. 122.
- Schulte E, Kück U und Esser K.** (1988). Extrachromosomal mutants from *Podospora anserina*: Permanent vegetative growth in spite of multiple recombination events in the mitochondrial genome. *Mol. Gen. Genet.* 211:342-349.
- Schulze M und Rödel G.** (1988). *SCO1*, a yeast nuclear gene essential for accumulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit II. *Mol. Gen. Genet.* 211(3):492-498.
- Schwartz RM und Dayhoff MO.** (1978). Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science.* 199(4327):395-403.
- Selkoe DJ.** (1998). The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell. Biol.* 8(11):447-453.
- Sellem CH, Lecellier G und Belcour L.** (1993). Transposition of a group II intron. *Nature.* 366(6451):176-178.
- Sellem CH, Sainsard-Chanet A und Belcour L.** (1990). Detection of a protein encoded by a class II mitochondrial intron of *Podospora anserina.* *Mol. Gen. Genet.* 224(2):232-240.
- Seo SY, Sharma VK und Sharma N.** (2003). Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J. Agric. Food. Chem.* 51(10):2837-2853.
- Sharp PA.** (2003). *Ctr1* and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 35(3):288-291.
- Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A und Greenamyre JT.** (2003). Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 23(34):10756-10764.
- Shi X, Stoj C, Romeo A, Kosman DJ und Zhu Z.** (2003). Fre1p Cu<sup>2+</sup> Reduction and Fet3p Cu<sup>1+</sup> Oxidation Modulate Copper Toxicity in *Saccharomyces cerevisiae.* *J. Biol. Chem.* 278(50):50309-50315.
- Shoubridge EA.** (2001). Cytochrome *c* oxidase deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 106(1):46-52.
- Silar P, Barreau C, Debuchy R, Kicka S, Turcq B, Sainsard-Chanet A, Sellem CH, Billault A, Cattolico L, Duprat S und Weissenbach J.** (2003). Characterization of the genomic organization of the region bordering the centromere of chromosome V of *Podospora anserina* by direct sequencing. *Fungal Genet. Biol.* 39(3):250-263.
- Smith RM, Fraser FJ, Russell GR und Robertson JS.** (1977). Enzootic ataxia in lambs: appearance of lesions in the spinal cord during foetal development. *J. Comp. Pathol.* 87:119-128.
- Smits PH, De Haan M, Maat C und Grivell LA.** (1994). The complete sequence of a 33 kb fragment on the right arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* reveals 16 open reading frames, including ten new open reading frames, five previously identified genes and a homologue of the *SCO1* gene. *Yeast. Suppl. A:*S75-80.
- Soares EV, Hebbelinck K und Soares HM.** (2003). Toxic effects caused by heavy metals in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a comparative study. *Can. J. Microbiol.* 49(5):336-343.
- Soliz M und Vulpe C.** (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem. Sci.* 21(7):237-241.
- Southern EM.** (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98(3):503-517.
- Speno H, Taheri MR, Sieburth D und Martin CT.** (1995). Identification of essential amino acids within the proposed Cu<sub>A</sub> binding site in subunit II of Cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* 270(43):25363-25369.
- Spizzo T, Byersdorfer C, Duesterhoeft S und Eide D.** (1997). The yeast *FET5* gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. *Mol. Gen. Genet.* 256(5):547-556.
- Stadtman ER und Levine RL.** (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino. Acids.* 25(3-4):207-218.
- Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kück U und Esser K.** (1978). Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina.* *Mol. Gen. Genet.* 162(3):341-343.

- Stahl U, Tudzynski P, Kück U und Esser K.** (1982) Replication and expression of a bacterial--mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79(11):3641-3645.
- Starkov AA und Fiskum G.** (2001). Myxothiazol induces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from mitochondrial respiratory chain. Biochem. Biophys. Res. Commun. 281(3):645-650.
- Stevens B.** (1981) The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Life Cycle and Inheritance (Strathern, J. N., Jones, E. W., and Broach, J. R., Eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Stevenson CB, Fox AN und Kennell JC.** (2000). Senescence associated with the over-replication of a mitochondrial retroplasmid in *Neurospora crassa*. Mol. Gen. Genet. 263(3):433-444.
- Strothkamp KG, Jolley RL und Mason HS.** (1976). Quaternary structure of mushroom tyrosinase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70(2):519-524.
- Stumpferl SW, Stephan O und Osiewacz HD.** (2004). Impact of a Disruption of a Pathway Delivering Copper to Mitochondria on *Podospora anserina* Metabolism and Life Span. Eukaryot. Cell. 3(1):200-211.
- Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R und Culotta VC.** (2001). A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. J. Biol. Chem. 276(41):38084-38089.
- Supek F, Supekova L, Nelson H und Nelson N.** (1996). A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93(10):5105-5110.
- Supek F, Supekova L, Nelson H und Nelson N.** (1997). Function of metal-ion homeostasis in the cell division cycle, mitochondrial protein processing, sensitivity to mycobacterial infection and brain function. J. Exp. Biol. 200(Pt 2):321-330.
- Suresh K und Subramanyam C.** (1996). Isolation and characterization of a copper containing protein from blue cell walls of *Neurospora crassa*. Indian J. Exp. Biol. 34(7):671-677.
- Takahashi Y, Kako K, Arai H, Ohishi T, Inada Y, Takehara A, Fukamizu A und Munekata E.** (2002a). Characterization and identification of promoter elements in the mouse *COX17* gene. Biochim. Biophys. Acta. 1574(3):359-364.
- Takahashi Y, Kako K, Kashiwabara S, Takehara A, Inada Y, Arai H, Nakada K, Kodama H, Hayashi J, Baba T und Munekata E.** (2002b). Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome *c* oxidase and embryonic development. Mol. Cell. Biol. 22(21):7614-7621.
- Takahashi Y, Kako K, Ohmura K, Tsumori K, Ohmasa Y, Kashiwabara S, Baba T und Munekata E.** (2001). Genomic structure of mouse copper chaperone, COX17. DNA Seq. 12(5-6):305-318.
- Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L und Brzustowicz LM.** (1993). The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. Nat. Genet. 5(4):344-350.
- Telford J, Kressmann A, Koski R, Müller F, Clarkson S und Birnstiel M.** (1979). Delimitation of a promoter for RNA polymerase III by means of a functional test. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(6):2590-2594.
- Thiele DJ.** (1988). *ACE1* regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. Mol. Cell. Biol. 8(7):2745-2752.
- Trojanowski JQ.** (2003). Rotenone neurotoxicity: a new window on environmental causes of Parkinson's disease and related brain amyloidoses. Exp. Neurol. 179(1):6-8.
- Trumpower BL.** (1990). The protonmotive Q cycle. Energy transduction by coupling of proton translocation to electron transfer by the cytochrome bc<sub>1</sub> complex. J. Biol. Chem. 265(20):11409-11412.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R und Yoshikawa S.** (1995). Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å. Science. 269(5227):1069-1074.
- Tudzynski P und Esser K.** (1977). Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 153(1):111-113.
- Tudzynski P und Esser K.** (1979). Chromosomal and extrachromosomal control of senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. Mol. Gen. Genet. 173(1):71-84.

- Turrens JF, Alexandre A und Lehninger AL.** (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237(2):408-414.
- Turrens JF und Boveris A.** (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191(2):421-427.
- Tzagoloff A, Capitanio N, Nobrega MP und Gatti D.** (1990). Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of *COX11*, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by *ORF3*. *EMBO J.* 9(9):2759-2764.
- Urbanowski JL und Piper RC.** (1999). The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J. Biol. Chem.* 274(53):38061–38070.
- Valentine JS, Wertz DL, Lyons TJ, Liou LL, Goto JJ und Gralla EB.** (1998). The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2(2):253-262.
- Valnot I, Kleist-Retzow JC, Barrientos A, Gorbatyuk M, Taanman JW, Mehaye B, Rustin P, Tzagoloff A, Munnich A und Rotig A.** (2000a). A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (*COX10*) causes cytochrome *c* oxidase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* 9(8):1245-1249.
- Valnot I, Osmond S, Gigarel N, Mehaye B, Amiel J, Cormier-Daire V, Munnich A, Bonnefont JP, Rustin P und Rotig A.** (2000b). Mutations of the *SCO1* gene in mitochondrial cytochrome *c* oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 67(5):1104-1109.
- Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L und Müller F.** (2003). Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature.* 426(6967):620.
- van Heeswijk R und Hynes MJ.** (1991). The *amdR* product and a CCAAT-binding factor bind to adjacent, possibly overlapping DNA sequences in the promoter region of the *Aspergillus nidulans amdS* gene. *Nucleic Acids Res.* 19(10):2655-2660.
- Verbeet MP, Klootwijk J, van Heerikhuizen H, Fontijn R, Vreugdenhil E und Planta RJ.** (1983) Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene.* 23(1):53-63.
- Vierny C, Keller AM, Begel O und Belcour L.** (1982). A sequence of mitochondrial DNA is associated with the onset of senescence in a fungus. *Nature.* 297(5862):157-159.
- Vignais PV.** (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 59(9):1428-1459.
- Virbasius JV und Scarpulla RC.** (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome *c* oxidase subunit IV gene. *Mol. Cell. Biol.* 11(11):5631-5638.
- Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, Gitschier J und Anderson GJ.** (1999). Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the *sla* mouse. *Nat. Genet.* 21(2):195-199.
- Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S und Gitschier J.** (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat. Genet.* 3(1):7-13.
- Waggoner DJ, Bartnikas TB und Gitlin JD.** (1999). The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 6(4):221-230.
- Walshe JM.** (1989). Wilson's disease presenting with features of hepatic dysfunction: a clinical analysis of eighty-seven patients. *Q. J. Med.* 70(263):253-263.
- Weindruch R und Sohal RS.** (1997). Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N. Engl. J. Med.* 337(14):986-994.
- Welch J, Fogel S, Buchman C und Karin M.** (1989). The CUP2 gene product regulates the expression of the CUP1 gene, coding for yeast metallothionein. *EMBO J.* 8(1):255-260.
- West AH, Clark DJ, Martin J, Neupert W, Hartl FU und Horwich AL.** (1992). Two related genes encoding extremely hydrophobic proteins suppress a lethal mutation in the yeast mitochondrial processing enhancing protein. *J. Biol. Chem.* 267(34), 24625–24633.
- Widdowson EM, Dauncey J und Shaw JCL.** (1974). Trace elements in foetal and early postnatal development. *Proc. Nutr. Soc.* 33(3):275–284.

- Winge DR, Nielson KB, Gray WR und Hamer DH.** (1985). Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J. Biol. Chem.* 260(27):14464-14470.
- Wintz H und Vulpe C.** (2002). Plant copper chaperones. *Biochem. Soc. Trans.* 30(4):732-735.
- Wood PM und Hollomon DW.** (2003). A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Qo site of complex III. *Pest Manag. Sci.* 59(5):499-511.
- Xiao Z und Wedd AG.** (2002). A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(I) with the copper chaperone Atx1. *Chem. Commun. (Camb).* (6):588-589.
- Yamaguchi Y, Heiny ME, Suzuki M und Gitlin JD.** (1996). Biochemical characterization and intracellular localization of the Menkes disease protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93(24):14030-14035.
- Yamaguchi-Iwai Y, Dancis A und Klausner RD.** (1995). AFT1: a mediator of iron regulated transcriptional control in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14(6):1231-1239.
- Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD und Dancis A.** (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J. Biol. Chem.* 272(28):17711-17718.
- Yanisch-Perron C, Vieira J und Messing J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* 33(1):103-119.
- Yokoyama Y, Beckman JS, Beckman TK, Wheat JK, Cash TG, Freeman BA und Parks DA.** (1990). Circulating xanthine oxidase: potential mediator of ischemic injury. *Am. J. Physiol.* 258(4 Pt.1):G564-G570.
- Yonkovich J, McKendry R, Shi X und Zhu Z.** (2002). Copper ion-sensing transcription factor Mac1p post-translationally controls the degradation of its target gene product Ctr1p. *J. Biol. Chem.* 277(27):23981-23984.
- Yu W, Farrell RA, Stillman DJ und Winge DR.** (1996). Identification of SLF1 as a new copper homeostasis gene involved in copper sulfide mineralization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16(5):2464-2472.
- Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T und Klausner RD.** (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92(7):2632-2636.
- Zhang L, Yu L und Yu CA.** (1998). Generation of superoxide anion by succinate-cytochrome *c* reductase from bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273(51):33972-33976.
- Zhou B und Gitschier J.** (1997). *hCTR1*: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94(14):7481-7486.
- Zhou H, Cadigan KM und Thiele DJ.** (2003). A copper-regulated transporter required for copper acquisition, pigmentation, and specific stages of development in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 278(48):48210-48218.
- Zhu Z, Yao J, Johns T, Fu K, DeBie I, Macmillan C, Cuthbert AP, Newbold RF, Wang J, Chevrette M, Brown GK, Brown RM und Shoubridge EA.** (1998). *SURF1*, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome *c* oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat. Genet.* 20(4):337-343.
- Zimmerman WC, Blanchette RA, Burnes TA und Farrel RL.** (1995). Melanin and perithecial development in *Ophiostoma piliferum*. *Mycology.* 87:857-863.

## B. Zitierte Examensarbeiten

- Brachmann A.** (2001). Die frühe Infektionsphase von *Ustilago maydis*: Genregulation durch das bW/bE-Heterodimer, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Stephan O.** (1999). Molekulare Grundlagen der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. J.W. Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Tudzynski PW.** (1978). Untersuchungen zur Genetik und Physiologie der Seneszenz des Ascomyceten *Podospora anserina*. Ruhr-Universität, Bochum.

## 9 Publikationsliste

Basse CW, Stumpferl S und Kahmann R. (2000). Characterization of a *Ustilago maydis* gene specifically induced during the biotrophic phase: evidence for negative as well as positive regulation. *Mol. Cell. Biol.* 20(1):329-339.

Osiewacz HD und Stumpferl SW. (2001). Metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Arch. Gerontol. Geriatr.* 32(3):185-197.

Stumpferl SW, Stephan O und Osiewacz HD. (2004). Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. *Eukaryot. Cell.* 3(1):200-211.

Torreblanca J, Stumpferl S und Basse CW. (2003). Histone deacetylase Hda1 acts as repressor of the *Ustilago maydis* biotrophic marker gene *mig1*. *Fungal Genet. Biol.* 38(1):22-32.

## 10 Abkürzungen und Fachbegriffe

Abb. Abbildung	Ac Acetat
ad "zum Endvolumen auffüllen"	Amp <sup>R</sup> Ampicillin-Resistenz
AS Aminosäure(reste)	ATP Desoxy-Adenosin-Triphosphat
BCS 3 Amino-Bathocuproindisulfonsäure	Bp Basenpaar(e)
BRK Bleocin-Resistenz-Kassette	ca. cirka
cDNA reverses Transkript der Boten-Ribonukleinsäure	
cm Zentimeter	COX Cytochrom-c-Oxidase
d Tag	DCFDA Dichloro-Dihydro-Fluorescein
d. h. das heißt	DMPC Dimethylpyrocarbonat
DNA Desoxyribonukleinsäure	dCTP (C) Desoxycytidintriphosphat
dGTP (G) Desoxyguanosintriphosphat	dNTP (N) Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP (T) Desoxythymidintriphosphat	ds doppelsträngig
ED <sub>50</sub> Erfolgsdosis 50%	EtBr Ethidium-Bromid
g Gramm	GTC Guanidinthiocyanat
h Stunde(n)	HRK Hygromycin B-Resistenz-Kassette
kBp Kilobasenpaare = 1000 Bp	L Liter
LD50 Letale Dosis 50%	M Molar
MBp Megabasenpaare = 1000 kBp	mm Millimeter
mM Millimolar	MOPS 3-(N-Morpholino)propansulphonat
mRNA Boten-RNA	mtDNA mitochondriale DNA
OD Optische Dichte	OD <sub>600</sub> Optische Dichte bei 600 nm
ORF Offener Leserahmen	P <sub>i</sub> anorganisches Phosphat
PCR Polymerase Kettenreaktion	PEG Polyethylenglycol
Phleo <sup>R</sup> Phleomycin/Bleocin-Resistenz	RNA Ribonukleinsäure
RNase Ribonuklease	rRNA ribosomale RNA
s. siehe	SDS Natriumdodecylsulfat
Sek. Sekunde(n)	SHAM Salicyl-Hydroxamsäure
s. o. siehe oben	s. u. siehe unten
Tab. Tabelle	TEMED N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
Tris Trishydroxy-methyl-aminomethan	U Unit (Enzymaktivitätseinheit)
Upm Umdrehungen pro Minute	UV ultraviolettes Licht
V Volt	z. B. zum Beispiel

## 11 Danksagung

Vor allen anderen will ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern **Erna** und **Wilhelm Stumpferl** bedanken, die mir sowohl Schulbildung, als auch Hochschulbildung ermöglichten. Sie unterstützten mich stets mit jeder erdenklichen Hilfe.

Besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. H. D. Osiewacz**, der mir nicht nur Thema und Arbeitsplatz zur Verfügung stellte, sondern mich auch stets mit seiner ehrlichen und direkten Art auf dem rechten Weg führte, so daß die Arbeit und daraus resultierende Publikationen erfolgreich abgeschlossen werden konnten.

Meinen Kollegen will ich ebenfalls meinen Dank aussprechen: Aline Bender für ihre aufmunternden Worte und ihre stete Hilfsbereitschaft; Dr. Corina Borghouts für zündende Ideen gelungener Experimente; Dr. Ricardo Gredilla für interessante Gespräche um das Thema Kupfer; ebenso Jürgen Grief für den produktiven Gedankenaustausch über *PaCox17* und *PaScol*; Dr. Andrea Hamann für ihre reichhaltige Hilfe bei wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen und die Durchsicht dieser Arbeit; Karin Jezek für ihre aufheiternde Art, neue Ideen und Gedanken; Oliver Kemmet für interessanten, fachübergreifenden Gedankenaustausch, Birgit Kunstmann für ihre freundliche Art und ihre Hilfsbereitschaft, Sascha Ludwig für seine großartige Arbeit im Praktikum und permanent gutes Teamwork; Christian Scheckhuber für seine stete Hilfsbereitschaft und seine außerordentlich positive Einstellung, Gabriele Seelbach für praktische Tips und Tricks, Ali Tinazli für seinen trockenen, abwechslungsreichen Humor und schließlich Alexandra Werner für die Einführung ins Laborleben am Beginn meiner Promotion, für ihre Hilfestellung bei sensiblen Methoden und gute Ratschläge im Laboralltag.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Bonn-Bad Godesberg, für die im Rahmen meiner Promotion gewährten finanziellen Hilfe.



## 12 Lebenslauf

Geburtsdatum: 12.07.1970  
Geburtsort: München  
Eltern: Wilhelm und Erna Stumpferl geb. Pollinger

### Schulbildung:

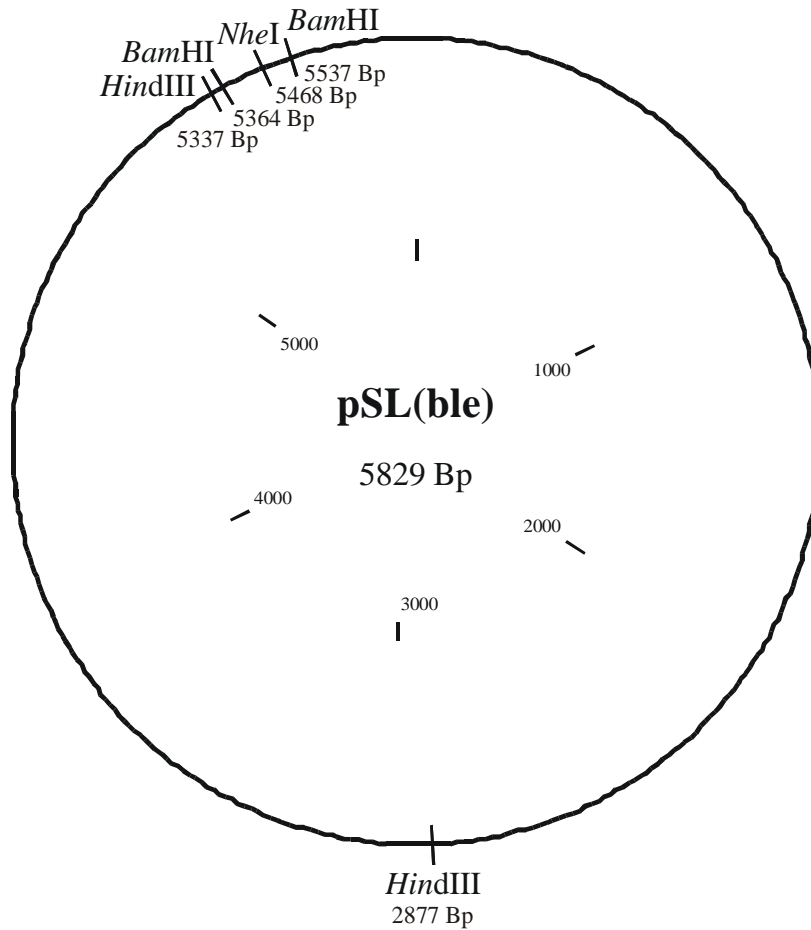
1977 – 1981 Grundschole, München.  
1981 – 1988 IGS, München Nord.  
1988 – 1991 Willy-Graf-Gymnasium, München. Abitur-relevante Leistungskurse:  
Biologie und Mathematik.

### Hochschulbildung:

1992 – 1994 Grundstudium der Biologie an der Technischen Universität München.  
1994 – 1997 Hauptstudium der Biologie an der Ludwig-Maximilian Universität München.  
1998 Abschluss des Biologiestudiums durch das Anfertigen einer Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchung der Regulation des *Ustilago maydis* Gens *uum1*“ an der Ludwig-Maximilian Universität München, AK Prof. Dr. R. Kahmann.  
1999 – 2004 Anfertigen einer experimentellen Doktorarbeit an der J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main, AK Prof. Dr. H.D. Osiewacz.  
1999 – 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im DFG-Forschungsprojekt zum Thema: „Molekulare Grundlagen des Kupfermetabolismus bei dem Ascomyceten *Podospora anserina*: Die Bedeutung von Kupfer für mitochondriale Funktionen“

# Anhang

## Plasmid-Karte pSL(ble)



### IUPAC DNA-Kode

B = C, G oder T

D = A, G oder T

H = A, C oder T

K = G oder T

M = A oder C

N = A, C, G oder T

R = A, G

S = C oder G

V = A, C oder G

W = A oder T

Y = C oder T

**Tabelle 23: Vergleich von Wild-Stämmen und PaCox17::ble-Stämmen.** 60 Stämme PaCox17::ble (32 mit Paarungstyp „plus“, 28 mit Paarungstyp „minus“) und 20 Wild-Stämme s (11 mit Paarungstyp „plus“, neun mit Paarungstyp „minus“) wurden in Rennrohren auf BMM kultiviert. Neben der Sporenummer des Stamms und dem Paarungstyp, sind die Lebensspanne in Tagen, die Wuchsstrecke in cm, und die Wuchsrate in mm/Tag angegeben.

**60 Stämme PaCox17::ble**

Stamm	Typ	Lebensspanne	Wuchsstrecke	Wuchsrate	Stamm	Typ	Lebensspanne	Wuchsstrecke	Wuchsrate
38322	+	506	163,0	3,78	38750	-	810	287,1	3,90
38323	-	392	128,6	3,60	38760	+	280	105,6	3,86
38331	+	246	89,8	3,80	38770	+	315	116,8	3,85
38350	+	84	29,0	3,70	38780	+	356	134,4	3,85
38360	-	388	134,3	3,70	38781	-	573	217,7	3,90
38371	+	166	62,4	3,90	38790	+	256	102,6	4,10
38380	+	422	153,9	3,80	38791	+	275	107,2	4,10
38383	+	413	155,7	4,00	38792	-	355	125,2	3,75
38540	+	259	96,6	3,90	38803	+	161	56,7	3,55
38541	-	335	123,6	3,83	38804	+	359	130,8	3,70
38550	-	574	202,2	3,90	38810	+	314	118,6	3,90
38560	-	>876	>328,2	3,82	38821	-	323	125,0	3,90
38570	+	375	126,5	3,90	38831	-	651	244,3	3,84
38580	+	243	95,5	4,10	38840	+	341	130,9	3,94
38590	+	252	95,3	3,90	38860	+	336	125,2	3,82
38594	-	805	309,4	3,90	38861	-	625	213,0	3,72
38611	-	>903	>346,9	3,95	38864	+	346	127,3	3,92
38620	-	674	208,2	3,75	38867	-	555	198,7	3,70
38630	-	>903	>335,8	3,78	38871	+	264	96,2	3,72
38632	-	>903	>329,1	3,71	38901	-	312	100,8	3,70
38633	+	368	137,7	4,10	38911	+	372	125,2	3,85
38671	-	719	240,3	3,70	38920	-	829	286,2	3,70
38680	-	>900	>325,0	3,70	38940	-	630	238,1	3,85
38711	-	625	233,1	3,80	38951	-	812	277,4	3,90
38721	+	334	130,9	4,20	38961	+	194	76,3	4,05
38731	+	289	116,2	4,15	38971	+	266	105,1	4,10
38733	-	646	241,8	3,90	38980	+	394	152,1	4,10
38740	-	>877	>319,7	3,83	38981	+	258	94,5	3,83
38741	+	276	108,1	4,10	38990	-	376	148,3	4,10
38742	+	410	152,0	3,90	38993	-	509	196,0	4,00

**20 Wild-Stämme s**

Stamm	Typ	Lebensspanne	Wuchsstrecke	Wuchsrate	Stamm	Typ	Lebensspanne	Wuchsstrecke	Wuchsrate
38320	+	81	56,7	7,10	38593	-	87	50,0	6,00
38321	+	93	63,6	7,20	38600	-	30	20,7	7,10
38330	-	39	23,6	6,20	38610	+	50	35,7	7,15
38341	-	48	27,5	5,80	38621	+	76	48,0	6,20
38361	+	72	48,5	6,80	38641	-	32	19,8	6,40
38370	-	35	21,2	6,20	38670	+	87	50,5	5,90
38561	+	78	54,9	7,10	38681	+	97	58,1	5,90
38571	-	54	37,6	6,60	38921	+	27	18,3	7,30
38581	-	67	40,7	6,10	38931	-	58	33,3	5,90
38591	+	69	43,7	6,80	38941	+	34	22,4	6,90