Die Rolle der Superoxid-Dismutasen in Entwicklungs- und Alterungsprozessen des Ascomyceten *Podospora anserina*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Carolin Grimm
aus Groß-Umstadt

Frankfurt am Main 2015
(D 30)

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. M. Piepenbring

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

2. Gutachter: Prof. Dr. A. Reichert

Datum der Disputation: 16. Oktober 2015

Konventionen

In der vorliegenden Dissertation werden Gene kursiv (z. B. *PaSod1*) und Proteine mit Großbuchstaben (z. B. PaSOD1) benannt. Die Bezeichnung von Stämmen, welche eine Deletion oder Überexpression eines Gens aufweisen, erfolgt mit „Δ“ vor bzw. mit „_OEx“ hinter dem Gennamen (z. B. Δ*PaSod1*, *PaSod1*_OEx).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Der Alterungsprozess und die „freie Radikal-Theorie“ 1

1.2 Die mitochondriale Atmungskette und die Entstehung von ROS 2

1.3 Einfluss von ROS auf den Alterungsprozess 5

1.4 Detoxifizierung von ROS 5

1.4.1 Superoxid-Dismutasen (SODs) 6

1.4.2 Katalasen (CATs) und Peroxidasen 8

1.4.3 Peroxiredoxin (PRX) 9

1.5 Die Rolle von Mangan in der Zelle 9

1.6 *Podospora anserina* als Alternsmodell 13

1.6.1 Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* 14

1.7 Problemstellung 15

2. Material 16

2.1 Geräte 16

2.2 Stoffe und Chemikalien 17

2.3 Sonstige Materialien 19

2.4 Anzuchtmedien 20

2.5 Lösungen und Puffer 21

2.6 Kits 23

2.7 Größenstandards 24

2.8 Oligonukleotide 24

2.9 Plasmide und Cosmide 24

2.10 Sonden 25

2.11 Enzyme 25

2.12 Antikörper 26

2.13 Stämme 26

2.14 Computerprogramme 28

3. Methoden 29

3.1 DNA-spezifische Methoden 29

3.2 RNA-spezifische Methoden 32

3.3 Protein-spezifische Methoden 34
3.4 *P. anserina*-spezifische Methoden 43
3.5 *S. cerevisiae*-spezifische Methoden 47
3.6 *E. coli*-spezifische Methoden 48
4. Ergebnisse 49
4.1 Co-Regulation der Superoxid-Dismutasen 49
4.1.1 Analyse der PaSOD-Proteinmengen in *PaSod*-Mutantenstämmen 50
4.1.2 Untersuchung der PaSOD-Aktivitäten in *PaSod*-Mutantenstämmen 53
4.1.3 Gemeinsame Regulation der ScSOD-Aktivitäten in *S. cerevisiae* 56
4.2 Die putativen SODs Pa_1_10620, Pa_1_10630 und Pa_1_6300 58
4.2.1 Identifizierung von Pa_1_10620 59
4.2.2 Analyse der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme 60
4.2.3 Bioinformatische Charakterisierung von Pa_1_10630 und Pa_1_6300 64
4.3 Charakterisierung der *PaSod3*-Stämme 66
4.3.1 Einfluss von Paraquat auf die Lebensspanne 66
4.3.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Lebensspanne 69
4.3.3 Kompensation des Verlustes der PaSOD3 71
4.4 Die Wirkung von Mangan auf *PaSod3*-Mutantenstämme 75
4.4.1 Einfluss auf Wuchsverhalten, Fertilität und Stressresistenz 75
4.4.2 Beeinflussung der Lebensspanne 81
4.4.3 Einfluss von Mangan auf die PaSOD-Aktivität 82
4.4.4 Die Rolle von Mangan bei der Regulation der Wasserstoffperoxid-Menge 83
4.4.5 Veränderung der Mitochondrienmorphologie 87
4.4.6 Untersuchung der Atmung und der Atmungskettenkomplexe 89
4.4.7 Veränderte Prozessierung mitochondrialer Proteine 91
4.4.8 *PaSod3*_OEx-Stämme als Modell für intrazellulären Wasserstoffperoxid-Stress 94
5. Diskussion 97
5.1 MnSOD und Cu/ZnSOD zeigen eine gemeinsame Regulation 97
5.2 Es wurde kein weiteres Protein mit SOD-Aktivität gefunden 102
5.3 Oxidativer Stress beeinflusst die Lebensspannen der *PaSod3*-Mutanten 106
5.4 Energie-abhängige Prozesse kompensieren den Verlust der PaSOD3 109
5.5 Mangan ist wichtig für die Detoxifizierung von ROS 110
6. Ausblick 119

7. Zusammenfassung 121

8. Literaturverzeichnis 123

9. Anhang 136

9.1 Überprüfung der *S. cerevisiae*-Deletionsstämme 136

9.2 Southern Blot-Analysen 137

9.3 Quantifizierung der PaSOD-Mengen in *PaSod*-Mutantenstämmen 139

9.4 Western Blot-Analyse zum Nachweis von Pa_1_10620 139

9.5 Lebensspannenanalysen 140

9.6 Western Blot-Analyse zur Bestimmung der PaSOD1-Menge 142

9.7 Transkriptomanalysen des Wildtyps und des Δ*PaSod3*-Stammes 142

9.8 „GO-enrichment“ Analyse des Wildtyps und des Δ*PaSod3*-Stammes 143

9.9 Wuchsraten von *PaSod3*-Mutanten bei $MnCl_2$-Supplementation 146

9.10 Abkürzungsverzeichnis 146

9.11 Abbildungsverzeichnis 147

9.12 Tabellenverzeichnis 149

10. Publikationsliste 151

1. Einleitung

1.1 Der Alterungsprozess und die „freie Radikal-Theorie“

Die Alternsforschung, auch Gerontologie genannt (gr.: „géron“ Greis, „logos“ Lehre), beschäftigt sich mit den biologischen und physiologischen Ursachen des Alterns. Dabei kann das Altern in den meisten Organismen als ein unumkehrbarer dynamischer Prozess beschrieben werden, bei dem es mit fortschreitender Zeit zu der Akkumulation degenerativer Veränderungen kommt, welche zu der Abnahme der physiologischen Funktionen und schlussendlich zum Tode führen (Kirkwood und Austad 2000). Die Entstehung und Anhäufung von degenerativen Schäden ist dabei auf die individuelle Einwirkung verschiedener endogener (u. a. genetische Veranlagung, oxidativer Stress, Stoffwechselvorgänge) und exogener Faktoren (u. a. Strahlungsexposition, Nahrungsangebot, Aussetzung toxischer Substanzen) zurückzuführen. Da das Altern zu dem natürlichen Kreislauf des Lebens gehört, ist das primäre Ziel der Gerontologie nicht das Altern zu bekämpfen, sondern ein „gesundes Altern“ zu ermöglichen.

Bezüglich des Alterns gibt es viele verschiedene Theorien, von denen jedoch keine eigenständig den Vorgang des Alterns vollständig erklären kann (Medvedev 1990). Die ursprünglichste und vermutlich am meisten untersuchteste Theorie ist die „freie Radikal-Theorie des Alterns“ („free radical theory of aging“, FRTA), die 1956 von Harman publiziert wurde. Diese Veröffentlichung besagt, dass die mit dem Altern verbundenen negativen Effekte, wie ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen oder eine geringere Fertilität, auf die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) zurückzuführen sind (Harman 1956). Neben der schädlichen Wirkung werden aber beispielsweise geringe Mengen an ROS wie Wasserstoffperoxid auch als Signalgeber innerhalb der Zelle benötigt (Hamanaka und Chandel 2010). Im weiteren Verlauf verfeinerte Harman die FRTA zu der MFRTA, der „mitochondrialen freien Radikal-Theorie des Alterns“. Diese spezifiziert die zuerst publizierte Theorie indem davon ausgegangen wird, dass die entstehenden Schäden hauptsächlich auf die ROS-Entstehung in den Mitochondrien zurückzuführen ist (Harman 1972). In jüngerer Zeit gibt es jedoch immer mehr Kritiker der FRTA bzw. der MFRTA wie beispielsweise Pérez, Hekimi und Gladyshev (Gladyshev 2014, Lapointe und Hekimi 2010, Pérez et al. 2009). Eine Studie die 18 Gene in Mäusen untersuchte, welche an der antioxidativen Abwehr beteiligt sind, konnte nur für die Superoxid-Dismutase SOD1 (Cu/ZnSOD) den laut der freien Radikal-Theorie vorhergesagten Effekt nachweisen – die Lebensverkürzung bei einer Deletion des entsprechenden Gens. Hingegen zeigte die Deletion der für eine Mangan-abhängige Superoxid-Dismutase (SOD2, MnSOD), verschiedene Glutathion-Peroxidasen (GPX1, GPX4), eine Methionin Sulfid-Reduktase (MSRA) oder das Thioredoxin 2 (TRX2) kodierenden Genen keine Auswirkungen auf die Lebensspannen. Dies führte dazu, dass Pérez die FRTA in Frage stellte (Pérez et al. 2009). Hekimi und Lapointe sowie

Gladyshev gehen davon aus, dass die von Harman publizierte Theorie nicht vollständig ist. Zwar seien ROS, wie von Harman beschrieben, eine wichtige Komponente, die für das Altern eines Organismus mitverantwortlich sei, jedoch spielen weitere Prozesse (z. B. eine fehlerfreie Transkription und Translation) ebenso eine bedeutende Rolle – sie postulierten, wie auch bereits in früheren Arbeiten geschehen, eine Schadenstheorie (Gladyshev 2014, Orgel 1963, Silar und Picard 1994). Letztere besagt, dass jeder in einer Zelle auftretende Fehler unweigerlich zu einer Akkumulation an weiteren Fehlern führt, eine Art „Teufelskreis“ bildet und so den Alterungsprozess vorantreibt. Dabei sind oxidative Schäden nur eine Art von möglichen Beeinträchtigungen. Aufgrund der Tatsache, dass biologische Prozesse nicht perfekt und fehlerfrei durchgeführt werden, können aus jedem in der Zelle ablaufenden Vorgang, wie der Replikation, Transkription, Translation, post-translationalen Modifikation, Proteinfaltung etc. fehlerhafte Produkte resultieren. Ferner dürfen genetische Faktoren wie Mutationen, welche auch durch ROS entstehen können, nicht außer Acht gelassen werden. So führt etwa eine fehlerhafte Transkription zu einem fehlerhaften Transkript, dies wiederum zu einem möglicherweise nicht voll funktionsfähigen Protein, welches folglich seine Aufgabe in der Zelle nicht vollends erfüllen kann. Da kein biologischer Prozess vollkommen fehlerlos abläuft und es zu einer altersabhängigen Akkumulation von oxidativen Schäden kommt, führt laut Hekimi, Lapointe und Gladyshev die Gesamtheit aller Beeinträchtigungen zu dem Alternsprozess (Gladyshev 2014, Lapointe und Hekimi 2010). Somit basierte die Kritik an der von Harman postulierten FRTA auf der Einfachheit Letzterer.

1.2 Die mitochondriale Atmungskette und die Entstehung von ROS

Mitochondrien stellen die komplexesten Organellen der Zelle dar. Sie sind von zwei Membranen umgeben, welche das Mitochondrium in den Intermembranraum und die Matrix unterteilen, und spielen u. a. eine Schlüsselrolle bei dem Energiemetabolismus, der Kalzium-Homöostase, bei metabolischen Prozessen (z. B. Häm-Synthese), dem programmierten Zelltod, der Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern und der Alterung vieler biologischer Systeme (Ames et al. 2005, Fischer et al. 2012, McBride et al. 2006, West et al. 2011). Die meisten der etwa 1500 in diesen Organellen benötigten Proteine werden im Nukleus kodiert, im Cytoplasma synthetisiert und in die Mitochondrien eintransportiert; jedoch werden auch einige wenige Proteine von der mitochondrialen DNA (mtDNA) kodiert und direkt in den Mitochondrien synthetisiert (im Menschen sind es 13 Proteine) (Bonawitz et al. 2006, Schmidt et al. 2010). Dies setzt eine erfolgreiche Koordination zwischen dem nukleären und dem mitochondrialen Genom voraus.

Der in den Mitochondrien ablaufende Energiemetabolismus wird durch den Citrat-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung in der Atmungskette bewerkstelligt. Die Atmungskette besteht aus fünf hintereinander geschalteten Komplexen, welche Elektronen aufnehmen und anschließend wieder abgeben: NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Cytochrom c-Reduktase (Komplex III), Cytochrom c-Oxidase (Komplex IV) und ATP-Synthase

(Komplex V) (Abbildung 1). U. a. NADH liefert der Atmungskette Elektronen. Diese werden durch Ubichinon von Komplex I und Komplex II zu Komplex III transportiert, während dies zwischen Komplex III und Komplex IV durch Cytochrom c bewerkstelligt wird. Letztlich werden die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen, welcher zusammen mit zwei Protonen ein Molekül Wasser bildet. Neben der Aufnahme und Abgabe von Elektronen sind die Komplexe I - IV für den Transport von Protonen (H^+) aus der Matrix in den mitochondrialen Intermembranraum verantwortlich. Dies führt zu dem Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten. Die in diesem Protonengradienten enthaltene Energie wird genutzt um Adenosindiphosphat (ADP) und ein anorganisches Phosphat (P_i) in Adenosintriphosphat (ATP) umzuwandeln, welches ein für den Organismus nutzbares Energiedepot darstellt.

Neben der ATP-Bildung entstehen als Nebenprodukte der Elektronentransportkette aufgrund fehlerhafter Elektronenübertragungen allerdings auch reaktive Sauerstoffspezies. Im Speziellen kommt es zu der Bildung von Superoxidanionen, kurz Superoxid, an Komplex I und III. Komplex I führt lediglich zu der Superoxid-Entstehung in der mitochondrialen Matrix. Komplex III kann hingegen sowohl zur Bildung von Superoxid im Intermembranraum als auch in der Matrix der Mitochondrien beitragen. Aufgrund der negativen Ladung kann das Superoxid Biomembranen nicht passieren und ist somit auf den Entstehungsort begrenzt (Imlay 2008, Mao und Poznansky 1992, Muller et al. 2004). Eine Ausnahme bildet dabei das im Intermembranraum gebildete Superoxid, welches die Mitochondrien vermutlich über spannungsabhängige Anionenkanäle der äußeren Mitochondrienmembran wie VDACs („voltage dependent anion channels“) oder den TOM („translocase of the outer membrane“)-Komplex verlassen kann (Budzińska et al. 2009, Han et al. 2003).

Aufgrund der räumlichen Nähe der mitochondrialen Proteine zu den in diesem Kompartiment entstehenden ROS zählen etwa die Atmungskettenkomplexe zu den primären Zielen von Schäden durch diese ROS (Melov et al. 1999). Ein Faktor, welcher die mitochondriale ROS-Entstehung beeinflusst, ist die Organisation der Atmungskette, welche seit vielen Jahren diskutiert wird. Zurzeit gibt es immer mehr experimentelle Beweise dafür, dass sich mehrere Atmungskettenkomplexe zu so genannten Atmungskettensuperkomplexen (Superkomplexen) anordnen können (Krause et al. 2004, Schägger et al. 2004, Schägger und Pfeiffer 2000) oder aber, dass diese individuell vorliegen. Es scheint, je nach Bedarf der Zelle, dabei eine Balance zwischen beiden Formen zu existieren, welche in dem „plasticity“ Modell zusammengefasst sind (Acín-Pérez und Enriquez 2014, Acín-Pérez et al. 2008). Bezüglich der Funktion der Superkomplexe wird vermutet, dass diese eine höhere Aktivität, einen besseren Elektronenfluss und eine geringere ROS-Generierung aufweisen als die individuell vorliegenden Atmungskettenkomplexe (Maranzana et al. 2013, Schägger und Pfeiffer 2000). Wie die Verteilung und Organisation der Atmungskettenkomplexe reguliert wird, ist jedoch nicht geklärt.

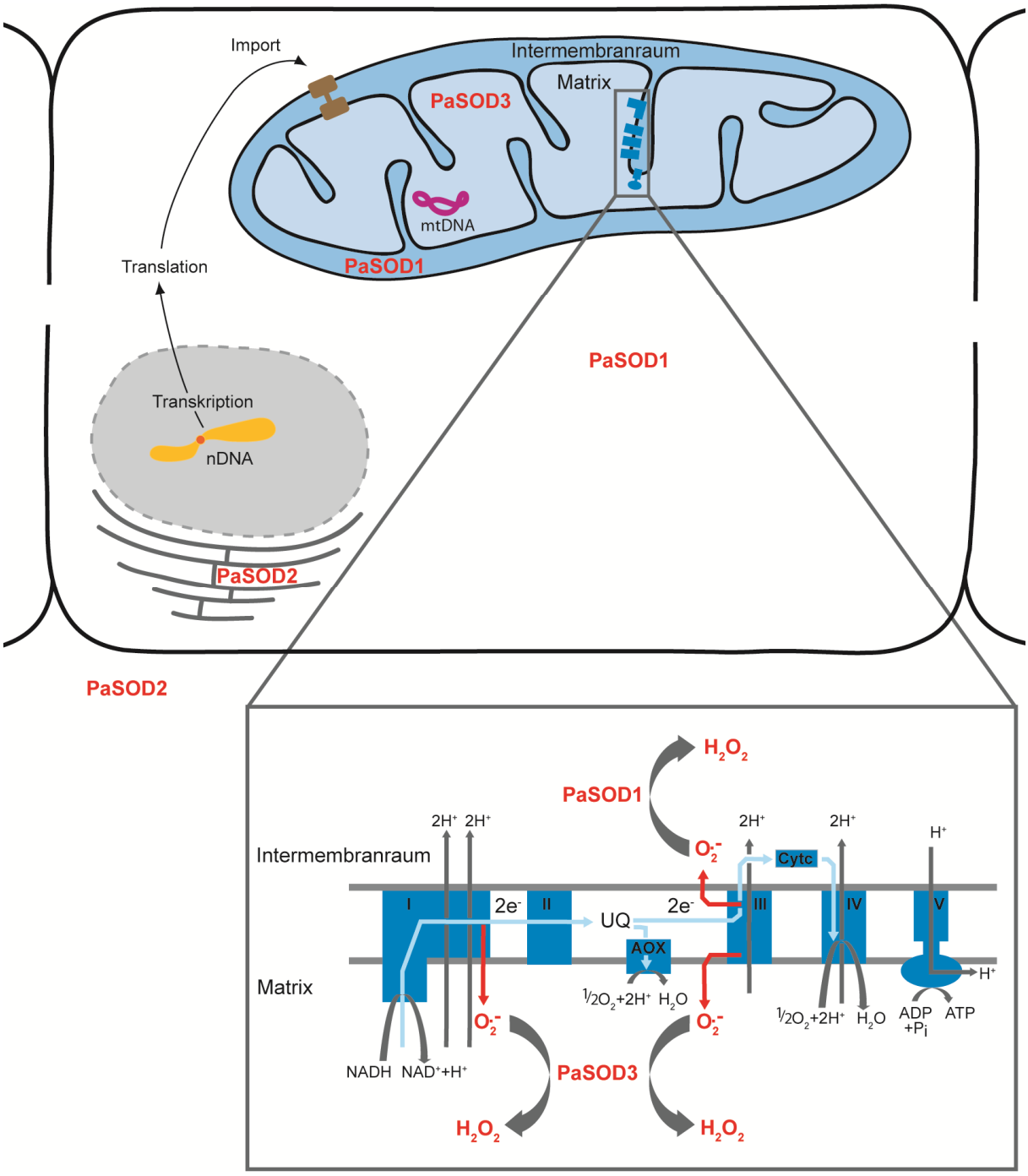


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Hyphenabschnitts sowie dem Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette von *Podospora anserina*. Es sind die fünf Komplexe (I - V) der Atmungskette sowie die alternative Oxidase (AOX) dargestellt, welche in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) entsteht durch die fehlerhafte Elektronenübertragung an Komplex I und III der Atmungskette. Dabei wird Superoxid von beiden Komplexen in der Matrix gebildet. Superoxid im Intermembranraum entstammt ausschließlich Komplex III. Durch den Transport von Protonen in den Intermembranraum (Komplex I, III und IV) wird ein Protonengradient aufgebaut, der zur Bildung von ATP an Komplex V genutzt wird. ADP: Adenosindiphosphat, ATP: Adenosintriphosphat, Cytc: Cytochrom c, Komplex I: NADH-Dehydrogenase, Komplex II: Succinat-Dehydrogenase, Komplex III: Cytochrom c-Reduktase, Komplex IV: Cytochrom c-Oxidase (COX), Komplex V: ATP-Synthase, mtDNA: mitochondriale DNA, NAD: Nicotinamidadenindinukleotid, nDNA: nukleäre DNA, PaSOD1: cytoplasmatisch lokalisierte Cu/ZnSOD die auch im Intermembranraum der Mitochondrien gefunden wird (Zintel et al. 2010), PaSOD2: sekretiere MnSOD, PaSOD3: mitochondrial lokalisierte MnSOD, P_i: anorganisches Phosphat, UQ: Ubichinon.

1.3 Einfluss von ROS auf den Alterungsprozess

Bei ROS handelt es sich um hoch reaktive Sauerstoffmoleküle oder Sauerstoffverbindungen. Diese ROS können entweder als Radikale, also Atome, Moleküle oder Ionen die ein oder mehrere ungepaarte(s) Elektron(en) tragen (Kubik 2005) und daher eine hohe Reaktivität aufweisen, oder aber in stabileren Verbindungen vorliegen. Zu den Radikalen zählen u. a. das Hydroxylradikal (·OH) und das Peroxylradikal (·OOR). Das Superoxid ($O_2{\cdot}^-$) wird aufgrund seiner geladenen Form den Radikal-Ionen zugeordnet. Neben diesen Radikalen zählen beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Ozon (O_3) oder Hydroperoxid (ROOH) zu den ROS. Die wichtigsten Vertreter sind laut Elmadfa und Leitzmann das Superoxid, das Wasserstoffperoxid und das hoch reaktive Hydroxylradikal (Elmadfa und Leitzmann 2004).

> Schädliche Formen des Sauerstoffs werden als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet. Zu diesen gehören u. a. das Superoxid ($O_2{\cdot}^-$), Hydroxylradikal (·OH), Alkoxyradikal (·OR), Peroxylradikal (·OOR), Perhydroxylradikal (·OOH), Hydroperoxid (ROOH) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Im Vergleich zu den bereits genannten instabilen Sauerstoffverbindungen, gibt es auch stabilere sauerstoffhaltige Oxidantien, wie der singulette Sauerstoff ($^1O_2$) oder das Ozon (O_3). Insgesamt stellt das Hydroxylradikal die reaktivste Verbindung dar (Baud und Ardaillou 1986).

In Organismen kommt es zu einer zeit- bzw. altersabhängigen Akkumulation von ROS, welche zunächst in Schäden an molekularen Komponenten wie DNA, Lipiden und Proteinen resultieren. Im Weiteren können diese Schäden zu Beeinträchtigungen in verschiedenen Reaktionswegen der Zelle führen. Der daraus entstehende „Teufelskreis“ resultiert in geschädigten Proteinen, die ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr vollständig fehlerfrei erfüllen können, was wiederum in einer gesteigerten ROS-Entstehung und letztendlich in weiteren Schäden resultiert. Schlussendlich führt dies zum Tod. Die Akkumulation der Schäden und der dadurch bedingten Veränderung der zellulären Prozesse werden generell als Grund für das Altern eines Organismus gesehen (Harman 1956, Kirkwood und Austadt 2000).

1.4 Detoxifizierung von ROS

Im Laufe der Evolution haben sich in biologischen Systemen Schutzmechanismen etabliert, die den zellulären Schäden durch ROS entgegenwirken. Dabei können die enzymatische und die nicht-enzymatische Entgiftung unterschieden werden. Für die sehr effektive enzymatische Umwandlung schädlicher Sauerstoffspezies in unschädliche Produkte wie Wasser und Sauerstoff ist das kontrollierte Zusammenspiel verschiedener Enzyme notwendig. Diese können zu einem Detoxifizierungsnetzwerk zusammengefasst werden und beinhalten beispielsweise Superoxid-Dismutasen (SODs, siehe Kapitel 1.4.1), Katalasen (CATs, siehe Kapitel 1.4.2), Peroxidasen (siehe Kapitel 1.4.2) und Mitglieder der Peroxiredoxin-Familie (PRXs, siehe Kapitel 1.4.3) (Abbildung 2).

Die nicht-enzymatische Entgiftung durch so genannte Antioxidantien, welche als Radikalfänger in der Zelle dienen und so die ROS-Konzentration reduzieren, ist hingegen weniger effektiv. Zu den

Antioxidantien zählen u. a. L-Ascorbinsäure, die reduzierte Form von Vitamin C (Georgiou und Petropoulou 2001), Vitamin E (Emri et al. 2004), Proline (Chen und Dickman 2005), Carotinoide (Mandelli et al. 2012) und Flavonoide (Cos et al. 1998).

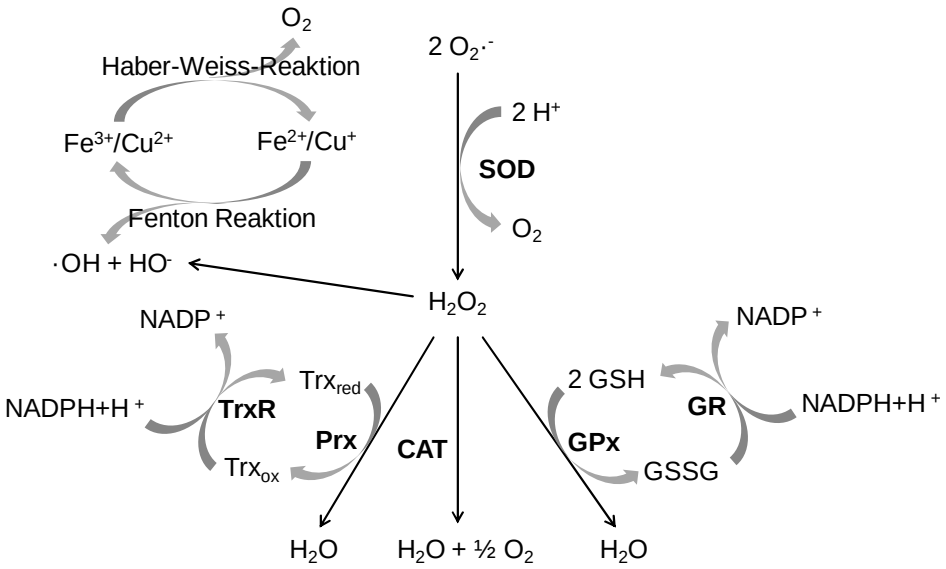


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Detoxifizierungsnetzwerkes. Das primär entstehende Superoxid ($O_2 \cdot^-$) wird durch Superoxid-Dismutasen (SODs) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) dismutiert. Letzteres kann durch verschiedene Reaktionswege in unschädliches Wasser (H_2O) bzw. Wasser und molekularen Sauerstoff (O_2) umgewandelt werden. Daran sind Glutathion-Peroxidasen (GPx), Glutathion-Reduktasen (GR), Katalasen (CAT) sowie Peroxiredoxine (PRX) und Thioredoxin-Reduktasen (TRXR) beteiligt. Bei der Umwandlung von Wasserstoffperoxid entstehende Zwischenprodukte sind Glutathion-Disulfid (GSSG), Glutathion (GSH) sowie reduziertes und oxidiertes Thioredoxin (TRX_{ox}, TRX_{red}). Neben dem unschädlichen Wasser kann jedoch auch das sehr reaktive Hydroxylradikal ($\cdot OH$) aus der Haber-Weiss-Reaktion in Kombination mit der Fenton-Reaktion entstehen. Dabei werden in der Haber-Weiss-Reaktion Eisen- oder Kupfer-Ionen durch Superoxid reduziert (Haber und Weiss 1932). Diese reduzierten Ionen (Fe^{2+}/Cu^{+}) können anschließend mit Wasserstoffperoxid in der Fenton-Reaktion das Hydroxylradikal bilden (Fenton 1894, Kwan und Voelker 2003) (Abbildung modifiziert nach Wiemer et al., angenommen).

1.4.1 Superoxid-Dismutasen (SODs)

Superoxid entsteht hauptsächlich durch eine fehlerhafte Elektronenübertragung an Komplex I und III der Atmungskette, kann aber auch aktiv durch Enzyme wie NADPH-Oxidasen oder Xanthin-Oxidase generiert werden (Bedard und Krause 2007, Brieger et al. 2012, Cross et al. 1984, Krause 2007, Vignais 2002). Die Detoxifizierung von Superoxid wird durch die Enzymklasse der Superoxid-Dismutasen katalysiert. Da keine weiteren Enzyme diese Reaktion übernehmen können, erfüllen SODs eine essentielle Rolle bei der Entgiftung von ROS. In den unterschiedlichen Spezies werden verschiedene SODs kodiert (Tabelle 1).

Neben der Klassifizierung nach ihrer Lokalisation können SODs auch nach dem benötigten Co-Faktor eingeteilt werden. Während cytoplasmatische SODs Cu- und Zn-Ionen in ihrem aktiven Zentrum binden, benötigen mitochondriale SODs Mn-Ionen. Sekretierte SODs sind überwiegend den Cu/ZnSODs zuzuordnen, wobei in den Ascomyceten *Oidiodendron maius* und *Podospora anserina* auch sekretierte MnSODs gefunden wurden (Martino et al. 2002, Zintel et al. 2010). Ferner wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit in *Candida albicans* eine extrazelluläre SOD entdeckt, welche ausschließlich Kupfer bindet (Gleason et al. 2014). Aus Prokaryoten sind zudem

Eisen- (FeSOD) sowie Nickel-abhängige (NiSOD) Superoxid-Dismutasen bekannt (Culotta et al. 2006, Yost und Fridovich 1973, Youn et al. 1996).

Tabelle 1: Bezeichnung, Lokalisation und Co-Faktoren der SODs ausgewählter Organismen.

Spezies	Bezeichnung	Lokalisation	Co-Faktor	Referenz
Escherichia coli	sodA	intrazellulär	Mangan	Keele et al. 1970
	sodB	intrazellulär	Eisen	Yost und Fridovich 1973
	sodC	periplasmatisch	Kupfer/Zink	Benov und Fridovich 1994
Saccharomyces cerevisiae	SOD1	cytoplasmatisch, Intermembranraum der Mitochondrien, Nukleus	Kupfer/Zink	Bermingham-McDonogh et al. 1988, Sturtz et al. 2001, Tsang et al. 2014
	SOD2	mitochondriale Matrix	Mangan	Ravindranath und Fridovich 1975
Candida albicans	SOD1	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Hwang et al. 1999
	SOD2	mitochondriale Matrix	Mangan	Rhie et al. 1999
	SOD3	cytoplasmatisch	Mangan	Lamarre et al. 2001
	SOD4	extrazellulär	Kupfer/Zink	Gleason et al. 2014
	SOD5	extrazellulär	Kupfer	Gleason et al. 2014
	SOD6	extrazellulär	Kupfer/Zink	Gleason et al. 2014
Podospora anserina	SOD1	cytoplasmatisch, Intermembranraum der Mitochondrien	Kupfer/Zink	Zintel et al. 2010
	SOD2	extrazellulär	Mangan	Zintel et al. 2010
	SOD3	mitochondriale Matrix	Mangan	Zintel et al. 2010
Caenorhabditis elegans	SOD-1	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Anderson 1982, Larsen 1993
	SOD-2	mitochondriale Matrix	Mangan	Hunter et al. 1997
	SOD-3	mitochondriale Matrix	Mangan	Hunter et al. 1997
	SOD-4	extrazellulär	Kupfer/Zink	Fujii et al. 1998
	SOD-5	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Jensen und Culotta 2005
Drosophila melanogaster	SOD1	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Lee et al. 1981
	SOD2	mitochondriale Matrix	Mangan	Choudhary et al. 1992, Duttaroy et al. 1994, Duttaroy et al. 1997
	SOD3	extrazellulär	Kupfer/Zink	Jung et al. 2011
Mus musculus	SOD1	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Bewley 1988
	SOD2	mitochondriale Matrix	Mangan	Creagan et al. 1973
	SOD3	extrazellulär	Kupfer/Zink	Chun et al. 1994
Homo sapiens	SOD1	cytoplasmatisch	Kupfer/Zink	Levanon et al. 1985
	SOD2	mitochondriale Matrix	Mangan	Ho und Crapo 1988
	SOD3	extrazellulär	Kupfer/Zink	Marklund 1982 und 1984

Da SODs die einzige Enzymklasse darstellen, welche Superoxid detoxifizieren kann, wurde zunächst die Hypothese aufgestellt, dass die Deletion einer oder mehrerer *Sods* eine negative und die Überexpression eine positive Wirkung auf den entsprechenden Organismus haben würden. Beispielsweise in der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, deren Genom für zwei Superoxid-Dismutasen kodiert, führt eine Deletion des Gens, welches die cytoplasmatische ScSOD1 oder die mitochondriale ScSOD2 kodiert, zu einer verkürzten replikativen Lebensspanne (Unlu und Koc 2007). Die Überexpression von *Sod1* oder *ScSod2* resultiert hingegen in einer moderaten, aber signifikant verlängerten chronologischen Lebensspanne (Fabrizio et al. 2003). Bei einer gleichzeitigen Überexpression beider in der Hefe vorhandenen SODs ist der Effekt deutlicher: Die chronologische Lebensspanne ist um 30 % verlängert (Fabrizio et al. 2003).

Bei Betrachtung der Lebensspannen von *S. cerevisiae* müssen zwei Formen der Alterung unterschieden werden: Die chronologische Lebensspanne, welche die Zeit des Überlebens einer Kultur in der stationären Phase beschreibt, bestimmt die post-mitotische Alterung. Die replikative Lebensspanne, welche sich anhand der Anzahl an Tochterzellen, die eine Mutterzelle bilden kann, definiert, bestimmt die mitotisch aktive Alterung (Jazwinski 1996, Sinclair et al. 1998, Steffen et al. 2009).

In der Literatur werden aber teilweise auch sehr widersprüchliche Auswirkungen auf verschiedene Organismen diskutiert, wenn in diesen künstlich eine oder mehrere *Sods* deletiert oder überexprimiert wurden. Für *Drosophila* wird angenommen, dass die gesteigerte Expression der mitochondrialen *Sod* mit einer Lebensverlängerung und einer höheren Resistenz gegenüber oxidativem Stress in Verbindung steht (Lin et al. 2011, Sun et al. 2002). In dem Fadenwurm *C. elegans* resultiert die Deletion einer der zwei mitochondrialen *Sods* zwar in einer verlängerten Lebensspanne, zeigt aber auch eine erhöhte Paraquat-Sensitivität sowie einen Anstieg der oxidativ geschädigten Proteine (van Raamsdonk und Hekimi 2009). Erstaunlicherweise sind Fadenwürmer, welchen alle fünf *Sods* deletiert wurden, lebensfähig und zeigen keine veränderte Lebensspanne, obwohl die Mutanten eine Sensitivität gegenüber diversen Stressoren aufweisen (van Raamsdonk und Hekimi 2012). Bei Mäusen führt die Deletion der mitochondrialen *MnSod* zu einer mitochondrialen Dysfunktion, erhöhten oxidativen Schäden in den Mitochondrien und einer hohen postnatalen Sterberate (Li et al. 1995, Melov et al. 1999, Wenzel et al. 2008). In dem Ascomyceten *P. anserina* führt die Deletion der einzigen mitochondrialen *Sod*, *PaSod3*, zu keiner Veränderung der Lebensspanne. Während auch die Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid unbeeinflusst bleibt, resultiert die Anzucht auf Medium mit Paraquat, welches Superoxid-Stress induziert, in einer reduzierten Wuchsrate. Die Überexpression von *PaSod3* wirkt sich hingegen durchweg negativ aus: Neben einer verkürzten Lebensspanne unter Standardbedingungen und einer erhöhten Sensitivität gegenüber oxidativem Stress (Paraquat und Wasserstoffperoxid) zeigen sich auch veränderte Proteinmengen und -muster von beispielsweise Proteasen und dem am Wasserstoffperoxid-Abbau beteiligten Peroxiredoxin (Zintel et al. 2010).

Paraquat, eine quartäre Ammoniumverbindung, wird verwendet, um intrazellulären oxidativen Stress zu generieren, denn das Paraquat-Kation kann in einer reversiblen Reaktion Elektronen aufnehmen und wieder abgeben. Damit trägt es zur Bildung von intrazellulärem Superoxid bei. Der primäre Entstehungsort von Superoxid durch Paraquat ist dabei an Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette (Cochemé und Murphy 2008).

Die verschiedenen Befunde von *Sod*-Mutanten zeigen, dass die Modulation der SOD-Mengen zu unterschiedlichsten Ergebnissen führen. Dies ist dadurch bedingt, dass die Manipulation der SOD-Mengen auch einen Einfluss auf das gesamte verbleibende Detoxifizierungsnetzwerk haben. Es dürfen demnach auch andere bei der Umwandlung von Superoxid entstehende ROS nicht außer Acht gelassen werden.

1.4.2 Katalasen (CATs) und Peroxidasen

Bei der Entgiftung von Superoxid durch SODs entsteht zwangsläufig eine weitere reaktive Sauerstoffspezies als Produkt dieser Reaktion; das Wasserstoffperoxid. Im Gegensatz zu

Superoxid ist Wasserstoffperoxid ungeladen und membrangängig und kann daher den Entstehungsort verlassen. Um zelluläre Schäden durch Wasserstoffperoxid zu minimieren, muss dieses ebenfalls detoxifiziert werden. Neben den durch Wasserstoffperoxid selbst verursachten Beeinträchtigungen ist Letzteres auch die Basis für die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion (Abbildung 2). In Anwesenheit von Cu(I) oder Fe(II) führen diese zu der Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals, für welches keine detoxifizierenden Enzyme existieren (Fenton 1894, Haber und Weiss 1932, Pryor 1986). Die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in unschädliche Produkte kann beispielsweise durch Katalasen und Peroxidasen katalysiert werden. Während Katalasen auf Wasserstoffperoxid als Substrat beschränkt sind, können Peroxidasen neben Wasserstoffperoxid auch Hydroperoxide und Peroxynitrit als Substrat nutzen (Gebicka und Gebicki 2000). Neben NADH-Peroxidasen gibt es auch Haloperoxidasen, Cytochrom c-Peroxidasen und Glutathion-Peroxidasen (GPx). Letztere stellen die bekanntesten Vertreter der Peroxidasen dar. Diese Selenocystein-enthaltenden Enzyme koppeln die Reduktion ihres Substrats zu Wasser mit der Oxidation von Glutathion (GSH) zu Glutathion-Disulfid (GSSG) (Abbildung 2).

1.4.3 Peroxiredoxin (PRX)

Neben Katalasen und Peroxidasen können auch die Mitglieder der Peroxiredoxin-Familie Wasserstoffperoxid, Hydroperoxide und Peroxynitrit umwandeln. Peroxiredoxine sind Thiol-spezifische Enzyme, deren Aktivität von einem „aktiven“ Cystein, dem so genannten peroxidatischen Cystein, abhängen. Daher sind sie auch als Thioredoxin-Peroxidasen bekannt. Die Peroxiredoxine können in typische 2-Cys PRXs, atypische 2-Cys PRXs und 1-Cys PRXs unterteilt werden, wobei der erste Reaktionsschritt bei allen derselbe ist. In diesem ersten Schritt greift das peroxidatische Cystein das Peroxid an und wird oxidiert. Für das typische 2-Cys PRX sowie das atypische 2-Cys PRX folgt anschließend die Bildung einer stabilen Disulfid-Bindung des oxidierten Cysteins mit dem im Molekül verbleibenden Cystein. Der Zyklus wird dann durch die Reduktion des vorher oxidierten Cysteins durch Disulfid-Oxidoreduktasen abgeschlossen. Da das 1-Cys PRX lediglich ein Cystein enthält, das peroxidatischen Cystein, wird dieses durch einen Thiol- oder Glutathion-enthaltenen Donor reduziert (Wood et al. 2003).

1.5 Die Rolle von Mangan in der Zelle

Mangan (Mn) ist das fünfthäufigste Metall und das zwölfthäufigste Element der Erde (Chen et al. 2014). Es gilt wie Kupfer (Cu) und Zink (Zn) als essentielles Spurenelement. Ein Mangan-Mangel kann beim Menschen beispielsweise zu Geburtsdefekten, schlechter Knochenentwicklung und zu einer erhöhten Anfälligkeit für Krampfanfälle führen (Chen et al. 2014). Bereits geringste Konzentrationen (nM - µM Bereich) reichen aus, um die in der Zelle vorhandenen Enzyme mit den benötigten Co-Faktoren zu beladen. Diese Menge, die laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung bei einer täglichen Dosis von 2 - 5 mg Mangan liegt, nimmt der Mensch für gewöhnlich

in ausreichendem Umfang durch Lebensmittel mit hohem Mangan-Gehalt wie Reis, Avocado, Nüsse, Hülsenfrüchte und Tee auf (Aschner 2000, ATSDR 2012, Chen et al. 2014, Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung 2013). Zu den Mangan-bindenden Enzymen zählen u. a. Superoxid-Dismutasen (Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid), Peroxidasen (Detoxifizierung von Hydroperoxiden), DNA- und RNA-Polymerasen, Peptidasen (Spaltung von Peptidbindungen), Transferasen (Übertragung von Methylgruppen, Phosphatgruppen oder N-Acetyl-Glucosaminyl-Resten (Zucker)), Hydrolasen (hydrolytische Spaltung von Verbindungen, z. B. Peptiden oder Glykosiden), Arginasen (Harnstoff-Bildung), Pyruvat-Carboxylasen (Neubildung von Glucose) und Glutamin-Synthetasen (Detoxifizierung von Ammoniak und Produktion von Glutamin) (Chakraborty und Aschner 2012, Horsburgh et al. 2002, Jakubovics und Jenkinson 2001, Reddi et al. 2009, Wedler und Denman 1984, Yocum und Pecoraro 1999, Zidenberg-Cherr et al. 1983).

Mangan ist zwar ein essentielles Spurenelement, weist in hohen Konzentrationen aber auch eine toxische Wirkung auf (Chtourou et al. 2011). Diese, bei dem Menschen als Manganismus bekannte, Überdosierung kann zu Parkinson-ähnlichen Symptomen, wie einer geschwächten Muskulatur und Tremor führen (Chen et al. 2014, Lucchini et al. 2009). Ferner steht Mangan in Verdacht, bei amyotropher Lateralsklerose (ALS) und Alzheimer eine Rolle zu spielen (Benedetto et al. 2009). Vorwiegend sind Arbeiter im Bergbau, in Schweißereien und in schmelzenden Industrien hohen Mangan-Konzentrationen ausgesetzt, sodass bei diesen häufig Manganismus diagnostiziert wird (Criswell et al. 2012, Racette et al. 2012). Bei Pflanzen sind die ersten Zeichen zu hoher Mangan-Konzentrationen braune Pünktchen auf den Blättern, auf welche Chlorosen (partielle Gelbfärbung der Blätter aufgrund von Chlorophyll-Mangel), Nekrosen (Tod der Zelle aufgrund von Schädigungen der Zellstruktur) und schließlich das Abfallen der Blätter folgen (Führs et al. 2008).

Kommt es hingegen zu einem Mangan-Mangel in der Zelle, kann dies dazu führen, dass Enzyme nicht mehr mit ihrem Co-Faktor beladen werden können und folglich inaktiv vorliegen. Um dies zu verhindern, kann etwa *Borrelia burgdorferi* sehr hohe Mangan-Konzentrationen in der Zelle akkumulieren, da diese für die Beladung der MnSOD (SodA) benötigt werden (Aguirre et al. 2013).

Um zu niedrige oder zu hohe Konzentrationen in der Zelle zu verhindern, gibt es spezifische Import- und Exportwege, die in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* gut untersucht sind (Abbildung 3). Die Hochaffinitäts-Mangantransporter Smf1 bzw. Smf2 lokalisieren in der Plasmamembran bzw. in intrazellulären Golgi-ähnlichen Vesikeln. Letztere werden auch als Mangan-Speicher vermutet (Culotta et al. 2005, Portnoy et al. 2000, Supek et al. 1996). Ferner wird Smf3 als ein Transporter für Mangan und Cadmium (Cd) beschrieben, welcher in der Vakuolenmembran lokalisiert (Portnoy et al. 2000, Yu et al. 2012). Neben Mangan können diese Transporter auch andere divalente Ionen mit geringerer Affinität transportieren. Zusätzlich kann Pho84, ein Phosphat-Transporter in der Plasmamembran, Mangan in Form von Phosphat-Verbindungen in die Zelle

importieren. Letzerer Prozess geschieht jedoch unabhängig von der in der Zelle vorliegenden Mangan-Konzentration (Jensen et al. 2003). Unter physiologischen Bedingungen (für *S. cerevisiae*: Medium mit 1 - 5 µM Mn) sowie bei Mangan-Überschuss (für *S. cerevisiae*: Medium mit ~ 10 - 100 µM Mn) sind Smf1 und Smf2 kaum in der Zelle vorhanden; sie werden von Bsd2 direkt zu der Vakuole dirigiert und dort abgebaut (Liu und Culotta 1999, Liu et al. 1997). Bei Mangan-Mangel hingegen (für *S. cerevisiae*: Medium mit < 1 µM Mn) verändert sich die post-transkriptionelle Regulation der Transporter: Anstatt von Bsd2 zu der Vakuole geleitet und dort abgebaut zu werden, werden sie stabilisiert. Durch diese Stabilisierung können die Transporter nun für die effektiv Aufnahme von Mangan aus der Umgebung der Zelle sorgen (Culotta et al. 2005, Liu und Culotta 1999). Pmr1, eine Ca^{2+}- und Mn^{2+}-transportierende ATPase die im Golgi-Apparat lokalisiert ist, versorgt den sekretorischen Weg mit Mangan und Kalzium, um die Sortierung und Prozessierung der Proteine sowie den Transport ebendieser zu gewährleisten. Ist ein Mangan-Überschuss in Hefezellen vorhanden, kann das akkumulierte Metall über Pmr1 eliminiert werden. Es wird vermutet, dass das in den Golgi-Apparat transportierte Mangan die Zelle über Vesikel des sekretorischen Wegs verlässt und in die Umgebung abgesondert wird (Culotta et al. 2005). In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass ECA1, eine am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Ca^{2+}/Mn^{2+}-Pumpe Mangan-Toleranz vermittelt (Wu et al. 2002).

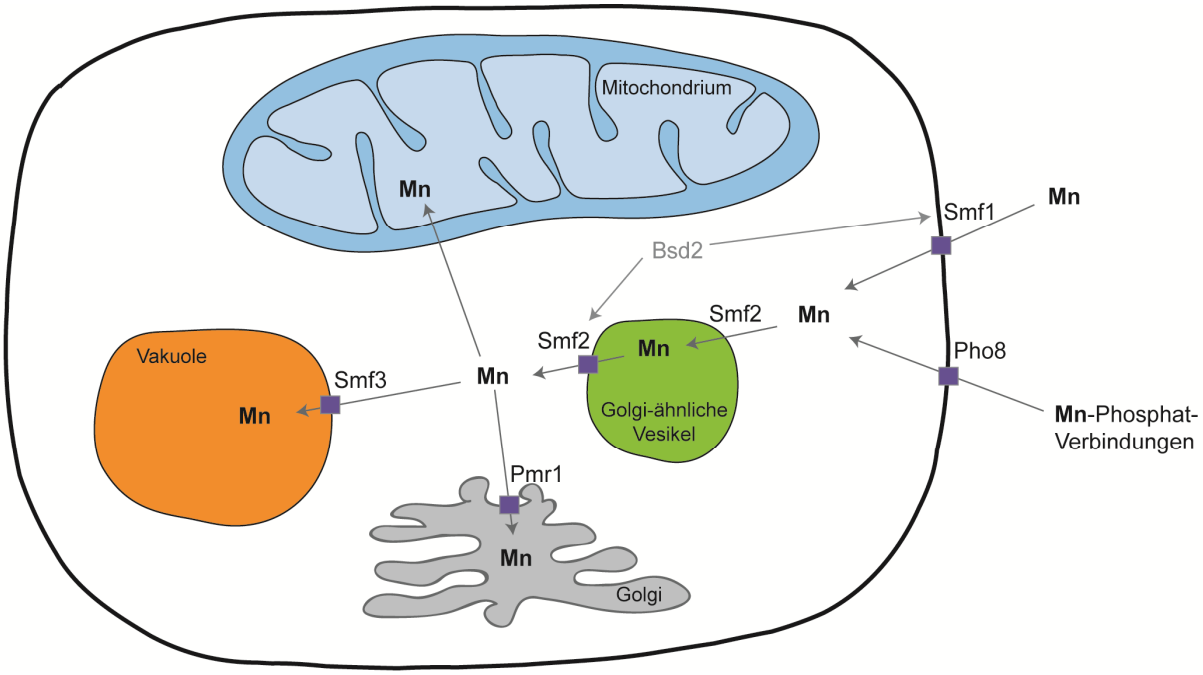


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aufnahmemechanismen von Mangan in *S. cerevisiae*. Der Hochaffinitäts-Mangantransporter Smf1 sowie der Phosphat-Transporter Pho84 können Mangan bzw. Mangan-Phosphat-Verbindungen in die Zelle transportieren. Von hier aus kann Mangan über Smf2 in Golgi-ähnliche Vesikel gelangen, in denen Mangan gelagert wird. Ferner kann Smf3 Mangan in die Vakuole und Pmr1 Mangan in den Golgi-Apparat transportieren. Auch die Mitochondrien erhalten Mangan. Bei Überschuss des Metalls in der Zelle werden die Transporter Smf1 und Smf2 durch Bsd2 zum Abbau zur Vakuole dirigiert.

Neben der Mangan-Menge ist für die Aktivität der MnSODs auch die Eisen-Menge entscheidend. Dies liegt daran, dass MnSODs sowohl Mangan als auch Eisen binden können, jedoch nur mit

gebundenem Mangan aktiv sind. Eine Bindung von Eisen im aktiven Zentrum führt hingegen zu einem inaktiven Protein (Ose und Fridovich 1976). Ähnliches gilt auch für FeSODs, welche Mangan und Eisen binden können, aber lediglich in ihrer eisenhaltigen Form Aktivität aufweisen (Vance und Miller 1998). Zum Schutz vor Inaktivierung der MnSOD durch Eisen wurden im Laufe der Evolution Schutzmechanismen entwickelt. Die MnSOD von *S. cerevisiae* ist beispielsweise noch in der Lage selektiv Mangan in ihrem aktiven Zentrum zu binden, wenn ein 50-facher Überschuss an Eisen im Vergleich zu Mangan vorliegt (Naranuntarat et al. 2009, Yang et al. 2006).
Mangan ist jedoch nicht nur als Spurenelement und Co-Faktor bekannt. Es gibt auch Hinweise darauf, dass es die Superoxid- bzw. Wasserstoffperoxid-Menge reduzieren, eine antioxidative Wirkung aufweisen oder Superoxid-Dismutasen in ihrer Funktion ersetzten könnte (Archibald und Fridovich 1981, Archibald und Fridovich 1982, Bielsk und Chan 1978, Chang und Kosman 1989, Koppenol et al. 1986). Zum Beispiel können in *S. cerevisiae* die bei aerobem Wachstum auftretenden Defizite einer *ScSod1*-Deletion (erhöhte Mutationsrate, Auxotrophie für Lysin und Methionin, verändertes Wuchsverhalten) durch hohe Konzentrationen an Mangan im Medium reduziert werden (Chang und Kosman 1989). Für *Lactobacillus plantarum,* welcher für keine funktionelle SOD kodiert, wurde gezeigt, dass die Anzucht auf Medium mit hohen Mangan-Konzentrationen zu einer starken Akkumulation dieses Spurenelements innerhalb der Zelle führt (~9 µg Mangan pro mg Protein). Zudem konnte für diese Proteinextrakte nachgewiesen werden, dass sie Superoxid abfangen. Die Reduktion des Superoxids beruht hierbei vermutlich auf der Oxidation von Mangan (Archibald und Fridovich 1981).

> Archibald und andere postulierten, dass Mn(II) durch Superoxid oxidiert wird und so die Konzentration dieser ROS reduzieren kann. In Abwesenheit eines stabilisierenden Chelators kommt es vermutlich zu der Bildung von MnO_2^+, oder, in Anwesenheit von Pyrophosphat, zu einer stabilen Mn(III)-Pyrophosphat-Verbindung (Archibald und Fridovich 1981, Bielsk und Chan 1978, Kono et al. 1976).

In verschiedenen Publikationen wird beschrieben, dass die positive Wirkung von Mangan bei der Detoxifizierung von ROS abhängig von der Bindung an einen Liganden oder der Ausbildung eines nicht-proteinhaltigen Komplexes ist (Berlett et al. 1990, Culotta und Daly 2013, Gray und Carmichael 1992, Horsburgh et al. 2002). In *in vitro* Analysen konnte eine EDTA-inhibierbare SOD-Aktivität festgestellt werden, welche nicht auf Superoxid-Dismutasen zurückzuführen war, sondern vermutlich auf Mn(II) in Verbindung mit zellulären Liganden wie Phosphaten, Orthophosphaten oder Laktaten (Archibald und Fridovich 1982, Barnese et al. 2008, Horsburgh et al. 2002, Reddi und Culotta 2011). Diese Mangan-Verbindungen weisen in verschiedenen Organismen eine antioxidative Eigenschaft auf (Barnese et al. 2008, McNaughton et al. 2010). Jedoch ist auch die detoxifizierende Wirkung von Mangan, gebunden an einen Liganden, weit entfernt von der Aktivität/Kapazität der Mangan-abhängigen Enzyme (Anjem et al. 2009, Imlay und Fridovich 1991).
Es wird auch spekuliert, dass Mangan eine antioxidative Wirkung haben könnte, ohne direkt mit Proteinen zu interagieren (Aguirre et al. 2013). Neuere Studien deuten darauf hin, dass die

schützende Wirkung primär darauf zurückzuführen ist, dass Mangan Eisen-Ionen in mononukleären Metalloenzymen ersetzt (Anjem et al. 2009). So resultierte in *C. elegans* eine Behandlung mit Mangansulfat in einer verlängerten Lebensspanne und einer gesteigerten Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Lin et al. 2006). Chae und Mitarbeiter verwendeten Mn-TBAP (ein SOD-Mimetikum), Mangansulfat sowie Manganchlorid, um Unterschiede in deren Wirkung auf HeLa-Zellen zu untersuchen. Allerdings war lediglich Mn-TBAP in der Lage die Zellen vor einem induzierten Zelltod zu schützen (Chae et al. 2004).

> Mn-TBAP (Mangan(III)-tetrakis-(4-benzoesäure)-porphyrin-chlorid), ein synthetisches Metalloporphyrin, ist ein membranpermeables Mitochondrien-spezifisches SOD-Mimetikum (gr.: „mímesis“ Nachahmung) (Faulkner et al. 1994).

Friedel veröffentlichte 2012 Messungen, bei denen verschiedenste putative Mangan-Mimetika auf ihre katalytische Aktivität hin untersucht wurden. Während Mangansulfat nicht analysiert wurde, konnte für Manganchlorid in Phosphatpuffer eine Aktivität nachgewiesen werden, die in HEPES-Puffer nicht mehr detektierbar war (Friedel et al. 2012). Dies stimmt mit anderen widersprüchliche Ergebnissen für Manganchlorid überein (Barnese et al. 2008, Spasojević et al. 2001, Weiss et al. 1993). Demnach scheint Mangan nicht generell als Antioxidant zu wirken. Die positive Wirkung ist u. a. von der Mangan-Verbindung, dem pH-Wert und Organismus-spezifischen Reaktionen abhängig. Zwar gibt es bisher in der Literatur viele Spekulationen und verschiedene Ideen, wie Mangan in der Zelle positiv wirken könnte, ein genauer Wirkmechanismus ist aber nicht bekannt (Lin et al. 2006).

1.6 *Podospora anserina* als Alternsmodell

Zur Untersuchung des Alterungsprozesses werden adäquate Modellorganismen benötigt, welche sich durch eine kurze, definierte Lebensspanne und der genetischen Zugänglichkeit auszeichnen. Solche Modellorganismen sind beispielsweise die Maus *M. musculus*, der Fadenwurm *C. elegans*, die Bäckerhefe *S. cerevisiae* sowie der Ascomycet *P. anserina*. Im Vergleich zu den meisten anderen bekannten Hyphenpilzen hat der *P. anserina*-Wildstamm eine begrenzte Lebensspanne von etwa 25 Tagen (Tudzynski und Esser 1997). Neben seiner Kultivierbarkeit auf verschiedenen Medien im Labor, der genetischen Manipulierbarkeit und einem kurzen, definierten Entwicklungszyklus ist das Genom von *P. anserina* nahezu vollständig sequenziert sowie annotiert (*P. anserina*-Genomprojekt: http://podospora.igmors.u-psud.fr).
P. anserina gehört zu den filamentösen Ascomyceten (Schlauchpilze) und kommt natürlicherweise auf Ausscheidungen von pflanzenfressenden Tieren vor.
Bei der sexuellen Vermehrung von *P. anserina* (Abbildung 4) kommt es zu der Befruchtung von weiblichen Gametangien durch männliche Spermatien. Dies resultiert in der Bildung von Fruchtkörpern, den so genannten Perithezien, welche zahlreiche Asci enthalten (Esser 1986). Letztere beinhalten in den allermeisten Fällen vier dikaryotische Ascosporen. In seltenen Fällen,

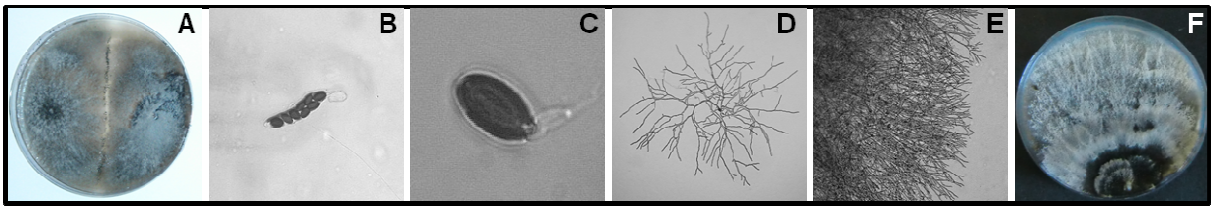


Abbildung 4: Gewinnung von monokaryotischen Sporen von *P. anserina* durch „Konfrontations-kreuzung". A: Zwei Stämme entgegengesetzten Paarungstyps werden auf einer Agarplatte ca. 5 cm entfernt voneinander angeimpft. Trifft das Myzel aufeinander kommt es zur Befruchtung der weiblichen Gametangien durch die männlichen Spermatien. Dies führt zur Bildung von Perithezien, welche Asci enthalten. **B:** Ein typischer Ascus enthält vier, jeweils dikaryotische, Ascosporen. Für die genetische Untersuchung von *P. anserina* werden jedoch monokaryotische Ascosporen benötigt. Diese einkernigen Sporen entstehen durch eine fehlerhafte Lage des Spindelapparates. Dabei können Asci entstehen, die mehr als vier Sporen enthalten (hier: ein achtkerniger Ascus). **C:** Für genetische Untersuchungen werden monokaryotische Ascosporen isoliert. **D - F:** Nach der Auskeimung der separierten Ascosporen wächst das Myzel aus, welches für anschließende Analysen verwendet werden kann.

z. B. durch eine falsche Lage des Spindelapparates, kommt es jedoch zu der Bildung von monokaryotischen Ascosporen, welche für die genetische Manipulation von *P. anserina* eine zentrale Rolle spielen (Abbildung 4 B). Die auskeimenden Sporen führen schließlich erneut zu der Bildung von Myzel (Abbildung 4 D - F). Kommt es zu keiner sexuellen Fortpflanzung wächst das Myzel linear bis es nach etwa 25 Tagen, abhängig vom Kultivierungsmedium, abstirbt. Bereits kurz vor dem Absterben können charakteristische Veränderungen des Myzels, wie eine stärkere Pigmentierung an der Wuchsfront sowie ein langsameres Wachstum, beobachtet werden (Esser und Tudzynski 1980). Es ist bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass der Alterungsprozess in *P. anserina* stark im Zusammenhang mit veränderten mitochondrialen Prozessen sowie mit der Anhäufung von ROS steht. So kommt es beispielsweise zu der Umorganisation der mtDNA (Cummings et al. 1979, Stahl et al. 1978), einer geänderten mitochondrialen Dynamik (Scheckhuber et al. 2007), bestehend aus Fusions- und Fissionsereignissen, sowie einer Veränderung bei der Entstehung und dem Abfangen von ROS (Borghouts et al. 2002, Gredilla et al. 2006). Daher erscheint es auch nicht überraschend, dass die genetische Modulation der mitochondrialen PaSOD3-Menge zu Veränderungen in *P. anserina* führen (Zintel et al. 2010).

1.6.1 Superoxid-Dismutasen in *P. anserina*

Das Genom von *P. anserina* kodiert zum Schutz vor Superoxid-induzierten Schäden für drei verifizierte Superoxid-Dismutasen. Dabei repräsentiert PaSOD1 die einzige Cu/ZnSOD, welche vorwiegend im Cytoplasma, aber in geringen Mengen auch im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. PaSOD2 und PaSOD3 tragen jeweils ein Mn-Bindemotiv und werden daher den MnSODs zugeordnet. Zudem enthält PaSOD3 als einzige SOD eine mitochondriale Lokalisationssequenz und lokalisiert in der Matrix der Mitochondrien (Zintel et al. 2010).

1.7 Problemstellung

Die Rolle der SODs als Detoxifizierungsenzyme wurde bereits in vielen verschiedenen Organismen untersucht. Nach der „freien Radikal-Theorie des Alterns“ (Harman 1956) wäre davon auszugehen, dass die Überexpression eines *Sod*-Gens zur Reduktion von schädlichem Superoxid führt und folglich einen positiven Effekt auf den entsprechenden Organismus ausübt. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch mehr und mehr, dass der Prozess nicht als so trivial angesehen werden kann. Zwar wirkt die reduzierte Superoxid-Menge überwiegend positiv auf den Organismus, allerdings muss auch der, aus der erhöhten SOD-Aktivität resultierenden gesteigerten Wasserstoffperoxid-Menge, und weiteren daraus hervorgehenden ROS Beachtung geschenkt werden (van Raamsdonk und Hekimi 2009, Zintel et al. 2010). Auch eine gesteigerte Wasserstoffperoxid-Menge kann zu starken Schäden in der gesamten Zelle führen und sich sowohl negativ auf zelluläre Prozesse als auch auf die Lebensspanne auswirken.
Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war, die Rolle der SODs in *P. anserina* und deren Einflüsse auf das gesamte ROS-Detoxifizierungsnetzwerk genauer zu untersuchen. Der Ursprung für die durchgeführten Studien war der unerwartete Befund, dass die Manipulation einer *Sod* in *P. anserina* nicht nur diese SOD selber, sondern auch andere in dem Organismus vorliegenden SODs beeinflussen könnte (Zintel 2012). Solch eine mögliche Co-Regulation der SODs – die veränderte Proteinmenge oder Aktivität einer SOD in Abhängigkeit von der Modifikation eines anderen *Sod*-Gens – muss für die Interpretation der Ergebnisse von *PaSod*-Mutanten unbedingt berücksichtigt werden.

Aufgrund der Datenlage sollten in dieser Arbeit folgende Aspekte detailliert analysiert werden:

1. Zunächst stand die experimentelle Überprüfung einer möglichen Co-Regulation der SODs in *P. anserina* im Vordergrund. Ebenfalls konnte *S. cerevisiae* bezüglich einer denkbaren gemeinsamen Regulation der SODs untersucht werden.
2. Darüber hinaus sollten die im Verlauf der vorliegenden Doktorarbeit aufgetauchten, zuvor unbekannten, putativen PaSODs auf ihre mögliche Funktion als aktive SODs hin analysiert werden.
3. Ein weiterer Fokus lag auf der detaillierten Charakterisierung der *PaSod3*-Mutanten, welche eine Modifikation des Gens aufweisen, das für die einzige mitochondrial lokalisierte, aktive PaSOD kodiert. Dabei war es auch nötig, mögliche Kompensations-mechanismen zu analysieren, die dazu führen, dass der Δ*PaSod3*-Stamm keine verkürzte Lebensspanne aufweist (Zintel et al. 2010).
4. Schließlich sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die negativen Auswirkungen der *PaSod3*_OEx-Stämme zu revertieren, um so die in diesem Stamm veränderten Mechanismen charakterisieren zu können.

2. Material

2.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	GE 446 EC-1	Getinge
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	Kelvitron Rubarth Hannover Binder	Heraeus Heraeus Binder
Brutschrankschüttler	KF-4 Infors HT	Binder
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
Crosslinker	UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Einschweißgerät	-	Petra
Eismaschine	AF103	Scotsman
Elektrophoresekammern DNA	Mini-Sub DNA Cell Wide-Mini-Sub DNA Cell	BioRad BioRad
Elektrophoresekammern Protein	Mini-Protean® II Cell Mini-Protean® 3 Cell Mini-Protean® Tetra Cell Protean® II	BioRad BioRad BioRad BioRad
Feinwaage	CP64	Sartorius
Filmentwickler	Protec 45 compact	Protec
Fluoreszenzmikroskope	TCS SP5	Leica
Geldokumentationsgerät	E-Box	peqLab
Gradientenmischer	Econo Pump Ep-1 700	BioRad
Heizblöcke	Thermomixer 5436 91D1100	Eppendorf peqLab
Heiz-Magnetrührer	RTC-basic MSH Basic	IKA Labortechnik Roth
Homogenisatoren	Bead-Beater Disruptor Genie Waring-Blendor	Roth Scientific Industries Waring
Hybridisierungsofen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham Biosciences
Infrarotscanner	Odyssey Infrared Imaging System	Li.Cor Biosciences
Lichtquelle für Binokular	KL750	Leica
Mikrowelle	Micro-Chef FM B935	Moulinex
Multipetten (50 µl, 25 µl)	40050-22 40025-22	Hamilton Hamilton
NanoDrop® Spectrometer	ND-1000	peqLab
PCR-Geräte	T Gradient 96 T1 Thermocycler 96	Biometra Biometra
pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Photometer	Ultrospec 2100 pro Safire 2	Amersham Biosciences Tecan
Pipetten (5000 µl, 1000 µl, 200 µl, 20 µl, 10 µl, 2 µl)	Pipetman	Gilson
Proteinfokussierungskammer	Protean IEF Cell Ettan IGPhor IEF Unit	BioRad GE Healthcare
Proteintransfer	Mini Trans-Blot® Cell	BioRad
Real-Time-PCR Gerät	My iQ	BioRad
Sauerstoffelektrode	Oroboros Oxygraph-2k	Oroboros
Scanner	Scanject 2400 GF-800 Calibrated Densitometer	HP BioRad

Gerät	Modell	Hersteller
Schüttelplattform	Duomax 2030 Promax 1020 Rocking Plattform	Heidolph Heidolph Biometra
Spannungsgeber	EV 243 EV 202 PowerPac 3000 Protean IEF Cell	Pharmacia Biotech peqLab BioRad BioRad
Sterilbänke	Clean Air CLF 460 EC Clean Air DLF/REC 6 KL 2A	Clean Air Clean Air
Thermomixer	S436	Eppendorf
Thoma-Zählkammer	-	Brand
Trockenschrank	TKE 117	Ehret
Ultraschallbad	Sonorex Digitec DT 31 H	Bandelin
Vakuum-Transferapparatur	LKB VacuGene XL	Pharmacia LKB
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Waage	LC 82 PB303	Sartorius Mettler Tolendo
Wasseraufbereitung	Milli-Q Reference	Millipore
Wasserbäder	1083 MP U3	GLF Julabo
Zentrifugen	5415 C mit F-45-18-11 5417 R mit FA-45-24-11 5804 R mit A-4-44 Sorvall RC5B mit Super-Lite Sorvall GSA SLA-1500 Sorvall SS34 Sorvall WX Ultra Rotor TH 641	Eppendorf Eppendorf Eppendorf DuPont DuPont DuPont Thermo Scientific Thermo Scientific

2.2 Stoffe und Chemikalien

Die in Tabelle 3 aufgeführten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p. A.-Qualität verwendet.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
Acrylamid	Roth	10675
Agar	Invitrogen	30391-049
Agarose	Invitrogen	15510-027
Ammoniumazetat	Merck	1116.1000
Ammoniumchlorid	Merck	1.01145.5000
Ampicillin	Roth	K029.2
Antifoam	Sigma	A5758
APS	Sigma	A3678
BCIP	Roche	11383221001
Bio-Lyte 3-10 Ampholyt	BioRad	163-2094
Biomalz	Roth	X976.1
Biotin	Serva	15060
Bisacrylamid	Serva	29195
Blockierungsreagenz	Roche	14545800
Blocking-Puffer	Li.Cor Biosciences	927-40000
Bromphenolblau	Merck	1.11746.0005
BSA	Sigma	A6003
$CaCl_2$	Merck	1.02378.0500
Casaminosäuren	Difco	0231-01-0
CHAPS	Roth	A1479.1
Chloroform	Merck	1.02445.2500
Citrat x H_2O	Sigma	C0759
Coomassie Blue G250	Roth	9598.2

Chemikalie	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
$CsCl_2$	Invitrogen	15507-023
CSPD	Roche	11759035001
$CuSO_4$ x 5 H_2O	Merck	2790.1000
DAB	Sigma	D8001
Dextrin (gelbes)	Roth	6777.1
Dimethylformamid	Sigma	D4254
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma	D5520
dNTPs	Thermo	R0181
DTT	Roth	6908.4
EDTA	Merck	1.08418.1000
Essigsäure	Roth	3738.5
Ethanol	Roth	9065.2
Ethidiumbromidlösung (0,5 %)	Roth	HP46.1
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ x 6 H_2O	Merck	203505
$FeCl_2$ x 4 H_2O	Merck	1.03861.0250
$FeCl_3$ x 6 H_2O	Merck	1.03943.0250
$FeSO_4$ x 7 H_2O	Merck	1.03965.0500
Glucanex	Novozymes	L1412
Glucose Monohydrat	Roth	6780.2
Glycerin	Roth	4043.3
Glycin	Roth	3908.2
Guanidiniumthiocyanat	Sigma	G9277
H_2O_2 (30 %)	Roth	8070.2
H_3BO_4	Merck	100165.5000
H_3PO_4	Roth	6366.1
Harnstoff	Merck	1.08487.0500
HCl	Merck	1.00319.2500
Hefeextrakt	Difco	291940
HEPES	Serva	25245
Heringssperma-DNA	Serva	18580
Hexanukleotide	Roche	11277081001
Hygromycin B	Calbiochem	400051
Imidazol	Roth	3899.2
Iodoacetamid	BioRad	163-2109
Isoamylalkohol	Merck	979.2500
Isopropanol	Roth	6752.4
K_2HPO_4	Roth	P749.1
K_2HPO_4 x 3 H_2O	Merck	5099.1000
$K_3[Fe(CN)_6]$	Sigma	P-3667
KCl	Merck	1.04936.1000
KCN	Fluka	60178
KH_2PO_4	Merck	1.0483.1000
KOH	Merck	5033.1000
L-Ascorbinsäure	Sigma	A7506
Maismehl	Aurora	-
Maleinsäure	Merck	800380
Methanol	Roth	4627.5
$MgCl_2$-Lösung (für PCR) (25 mM)	Bio&Sell	M2232
$MgSO_4$ x 7 H_2O	Merck	1.05886.0500
Mineralöl	BioRad	163-2129
Mitotracker Red	Molecular Probes	1.05963.0100
Mn(II)SO_4 x H_2O	Merck	1.05963.0100
$MnCl_2$	Merck	5934.0100
Na_2HPO_4	Merck	1.06345.1000
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	Serva	30207
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma	A7250
NaCl	Roth	3957.2
NaOH	Roth	6771.1
Natriumazetat	Merck	1.06268.1000
Natriumcitrat	Roth	3580.2

Chemikalie	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
Natriumthiosulfat x 5 H_2O	Roth	P034.1
NBT	Sigma	N6876
NH_4Cl	Merck	1.01145.5000
N-Lauroylsarkosin	Sigma	L5125
Paraquat	Sigma	856177
PCR-Puffer (-MgCl)	Invitrogen	1266273
PEG4000	Serva	33136
Pepton	Difco	211677
Phenol für DNA-Isolation	Roth	0038.2
Phenol für RNA-Isolation	Roth	A980.1
Phleomycin	Genaxxon	M3429
Protease-Inhibitor Cocktail IV	Calbiochem	539136
Riboflavin	Sigma	R4500
Roti-Acrylamidmix 30 %	Roth	3029.1
Roti-Acrylamidmix 40 %	Roth	A525.2
Roti-Nanoquant	Roth	K880.1
Saccharose (D(+))	Roth	4621.2
SDS	Merck	1.13760.0100
SHAM	Sigma	S44796-028
Sorbit	Serva	35230
TEMED	Roth	2367.1
Thiamin	Serva	36020
Thioharnstoff	Roth	9531.3
Tricin	Roth	6977.2
Tris	Roth	4855.3
Triton X-100	Serva	37240
Trypton	Difco	211701
Tween20	Sigma	P2287
Xylencyanol	Serva	38505
$ZnSO_4$ x 7 H_2O	Merck	8883.0100
β-Mercaptoethanol	Sigma	M-6250
ε-Aminocapronsäuren	Roth	3113.2

2.3 Sonstige Materialien

In Tabelle 4 sind weitere in dieser Arbeit verwendete Materialien angegeben.

Tabelle 4: Sonstige verwendete Materialien.

Material	Modell	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
Cellophan	583 Gel Dryer	BioRad	165-1745
Filterpapier	3 MM	Whatman	10426693
Glasperlen	0,5 mm	Roth	N030.1
Hybridisierungsmembran	Hybond-N	GE Healthcare	RPN 303-N
Hybridisierungsröhren	Hybridisierungsröhren	GE Healthcare	-
Immobilisierter pH-Gradient (IPG)	Immobiline ReadyStrips pH 3-10 NL	BioRad	163-2002
PVDF-Membran	Millipore Immobilon-P	Roth	IPFL00010
Röntgenfilm	Super RX	Fujifilm	4741019236
Röntgenfilmkassette	Suprema	Dr. Goos	-

2.4 Anzuchtmedien

Ammoniumazetat-Medium
4,6 g Ammoniumazetat
ad 1 l BMM-Medium
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

BMM-Medium
250 g Maismehl/5 l Wasser
über Nacht bei 60 °C quellen
über Handtuch filtrieren
8 g Biomalz/l
pH 6,5
ad 5 l mit H_2O
autoklavieren
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

CM-Medium
1 g KH_2PO_4
0,5 g KCl
0,5 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
10 g Glucose Monohydrat
3,7 g NH_4Cl
2 g Trypton
2 g Hefeextrakt
1 ml Stammlösung A
ad 1 l mit H_2O
pH 6,5
autoklavieren

LB-Medium
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
pH 7,2
Festmedium: 2 % (w/v) Agar
autoklavieren

M2-Medium
0,25 g KH_2PO_4
0,3 g K_2HPO_4
0,25 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
0,5 g Harnstoff
10 g Dextrin (gelbes)
ad 1 l mit H_2O
2 % (w/v) Agar
nach dem Autoklavieren zugeben:
50 µl Biotin (0,05 mg/ml)
200 µl Thiamin (250 mg/ml)
100 µl Spurenelementlösung

PASM-Medium
10 g Glucose Monohydrat
0,5 g KH_2PO_4
0,6 g K_2HPO_4
1 g Harnstoff
ad 1 l mit H_2O
2 % (w/v) Agar
nach dem Autoklavieren zugeben:
50 µl Biotin (0,05 mg/ml)
200 µl Thiamin (250 mg/ml)
100 µl Spurenelementlösung

Spurenelementlösung
5 g Citrat x 1 H_2O
5 g $ZnSO_4$ x 7 H_2O
1 g $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2$ x 6 H_2O
0,25 g $CuSO_4$ x 5 H_2O
0,05 g $MnSO_4$ x 1 H_2O
0,05 g Na_2MoO_4 x 2 H_2O
0,05 g H_3BO_4
ad 100 ml mit H_2O
sterilfiltrieren

Stammlösung A (für CM-Medium)
1 g $ZnSO_4$
1 g $FeCl_2$
1 g $MnCl_2$
ad 1 l mit H_2O
autoklavieren

Stammlösung 1 (für Transformationsmedium)
7,5 g KH_2PO_4
2,5 g KCl
2,7 g $MgSO_4$ x 7 H_2O
ad 100 ml mit H_2O
autoklavieren

Stammlösung 2 (für Transformationsmedium)
5 mg $ZnSO_4$ x 7 H_2O
5 mg $FeSO_4$ x 7 H_2O
5 mg $CuSO_4$ x 5 H_2O
5 mg $MnSO_4$ x 1 H_2O
ad 100 ml mit H_2O
autoklavieren

Transformationsmedium
3,7 g Ammoniumchlorid
2,0 g Trypton
1,0 g Hefeextrakt
10,0 g Glucose Monohydrat
342,3 g Saccharose
20 ml Stammlösung 1
20 ml Stammlösung 2
ad 1 l mit H_2O
pH 6,0
für Phleomycin-Medium pH 7,5
Festmedium: 1,2 % (w/v) Agar
Überschichtungsmedium: 0,5 % (w/v) Agar
autoklavieren

Überschichtungsmedium für IPG-Streifen
0,5 % Agarose
in 1 x SDS-Laufpuffer aufkochen

YPD- Medium
20 g Glucose Monohydrat
10 g Hefeextrakt
20 g Bacto Pepton
2 % (w/v) Agar
ad 1 l mit H_2O
autoklavieren

Antibiotika (Endkonzentrationen im Medium)

E. coli:	Ampicillin: 100 µg/ml
P. anserina:	Hygromycin: 100 µg/ml
	Phleomycin: 6 µg/ml

2.5 Lösungen und Puffer

Ampicillinlösung
100 mg/ml Ampicillin
in H_2O lösen
sterilfiltrieren

Anodenpuffer (für BN-PAGE)
25 mM Imidazol
pH 7,0

Antikörper-Puffer
0,1 % (v/v) Tween20
in 10 ml Odyssey Blocking-Puffer

Äquilibrierungspuffer (für 2D-Gele)
6 M Harnstoff
0,375 M Tris
2 % (w/v) SDS
20 % (v/v) Glycerin
pH 8,8
frisch zugeben:
2 % (w/v) DTT oder 2,5 % (w/v) Iodoacetamid

Biotin-Stammlösung
0,05 mg/ml Biotin
ad 100 ml H_2O
sterilfiltrieren

Blocking-Puffer
0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz
in 6 x SSC

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

3 x BNP-Puffer (für BN-PAGE)
1,5 M ε-Aminocapronsäuren
75 mM Imidazol
pH 7,0

Chloroform / Isoamylalkohol (24 : 1)
96 % (v/v) Chloroform
4 % (v/v) Isoamylalkohol

5 % Coomassie (für BN-PAGE)
0,005 g Coomassie Blue G250
in 100 µl mM ε-Aminocapronsäuren

$CsCl_2$-Lösung
5,7 M $CsCl_2$
0,1 M EDTA, pH 7,4

DAB-Färbelösung (für „In-Gel“ Peroxidase-Aktivitätsfärbung)
2,5 mM Diaminobenzidin
0,02 mg/ml Meerrettichperoxidase
in 0,1 M Tris/HCl, pH 6,9

DAB-Lösung (für Wasserstoffperoxid-Ausstoß-Färbung auf Platte)
2,5 mM Diaminobenzidin
in 0,1 M Tris/HCl, pH 6,9

Denaturierungslösung
1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
autoklavieren

DIG-Hybridisierungspuffer („high”-SDS)
7 % (w/v) SDS
5 x SSC
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin
2 % (w/v) Blockierungsreagenz
50 mM Na_2HPO_4, pH 7,0

DIG-Puffer 1
0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
pH 7,5
autoklavieren

DIG-Puffer 2
0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz
in DIG-Puffer 1 bei 60 °C lösen

DIG-Puffer 3
0,1 M Tris/HCl, pH 9,5
0,14 M NaCl
autoklavieren

DIG-Waschpuffer
0,3 % (v/v) Tween20
in DIG-Puffer 1

10 % Digitonin (für BN-PAGE)
10 mg Digitonin
ad 100 µl H_2O
bei 95 °C lösen
bei 4 °C abkühlen, ggfs. bei -20 °C lagern

DMCP-H_2O
1 ml DMPC
99 ml 50 % Ethanol
ad 1 l mit H_2O

6 x DNA-Ladepuffer
0,25 % (w/v) Bromphenolblau
0,25 % (w/v) Xylencyanol
50 % (w/v) Saccharose
0,1 M EDTA

DTT
1 M DTT
in 0,01 M NaAc, pH 5,2
sterilfiltrieren

Görg-Coomassie-Entfärbelösung
20 mM $CuSO_4$ x 5 H_2O
25 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure
65 % (v/v) H_2O

Görg-Coomassie-Färbelösung
20 mM $CuSO_4$ x 5 H_2O
45 % (v/v) Methanol
45 % (v/v) H_2O
10 % (v/v) Essigsäure
0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250

GTC-Puffer
5,5 M Guanidiniumthiocyanat
25 mM Natriumcitrat
0,5 % N-Lauroylsarkosin
0,2 M β-Mercaptoethanol
pH 7,0

Heringssperma DNA
20 mg/ml Heringssperma DNA in H_2O
1 h bei 60 °C lösen
mehrere Stunden bei RT lagern und immer wieder vortexen
15 min Ultraschallbad

IEF-Puffer (für 2D-Gele)
7 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
2 % (w/v) CHAPS
ad 100 ml mit H_2O
frisch zugeben:
1 % Bio-Lyte 3-10
18 mM DTT

Kaliumphosphatpuffer (für „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbung)
13,2 mM K_2HPO_4
86,8 mM KH_2PO_4
pH 7,8

Kaliumphosphatpuffer (für Wasserstoffperoxid-Abbaurate)
1,32 mM K_2HPO_4
8,68 mM KH_2PO_4
pH 7,0

Katalase-Färbelösung (für „In-Gel“ Katalase-Aktivitätsfärbung)
2 % (w/v) $FeCl_3$
2 % (w/v) $K_4[Fe(CN)_6]$

Kathodenpuffer (für BN-PAGE)
50 mM Tricin
7,5 mM Imidazol
pH ~7,0 (nicht einstellen)
ggfs. 0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250
oder 0,002 % (w/v) Coomassie Blue G250

10 x Laufpuffer
250 mM Tris
1,92 M Glycin
autoklavieren

Mitochondrien-Isolationspuffer 1
10 mM Tris
1 mM EDTA
0,33 M Saccharose
pH 7,5

Mitochondrien-Isolationspuffer 2
10 mM Tris
1 mM EDTA
0,33 M Saccharose
0,2 % BSA
pH 7,5

$MnSO_4$ x H_2O-Stammlösung
250 mM $MnSO_4$ x H_2O
in H_2O lösen
sterilfiltrieren

nativer Stopper (6 x)
7,5 ml Glycerin
9,375 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 7,0)
1 % (w/v) Bromphenolblau
ad 25 ml mit H_2O

NBT-Lösung (für „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbung)
50 mg/ml Nitroblautetrazolium
in 70 % Dimethylformamid

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

Neutralisierungslösung
2 M NaCl
1 M Tris
pH 5,5
autoklavieren

10 x PBS
1,4 M NaCl
0,1 M KCl
0,027 M Na_2HPO_4
0,018 M KH_2PO_4
autoklavieren

PEG-Lösung
60 % (w/v) PEG4000
50 mM $CaCl_2$
10 mM Tris
pH 7,5
autoklavieren

Phleomycinlösung
10 mg/ml Phleomycin in H_2O lösen
sterilfiltrieren

Proteinextraktionspuffer
100 mM NaCl
50 mM HEPES
pH 7,4
autoklavieren
frisch zugeben:
50 mM DTT
1 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail

Riboflavin-Lösung
1 mg/ml Riboflavin
100 mM Kaliumphosphatpuffer
0,1 % TEMED

RNase A-Lösung
10 mg/ml RNase A
0,01 M NaAc (pH 5,2)
15 min aufkochen
langsam auf RT abkühlen lassen
10 % (v/v) 1 M Tris/HCl (pH 7,4)

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

5 x SDS-Ladepuffer
6,25 ml 1 M Tris
2 g SDS
1 ml ß-Mercaptoethanol
7,5 ml Glycerin
1 % (w/v) Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer
25 mM Tris
1,92 M Glycin
pH 8,3
autoklavieren
frisch zugeben:
1 % (v/v) SDS

Solubilisierungspuffer (für BN-PAGE)
50 mM NaCl
50 mM Imidazol
2 mM ε-Aminocapronsäuren (frisch zugeben)
1 mM EDTA
pH 7,0

20 x SSC
3 M NaCl
0,3 M Na_3Citrat
pH 7,0
autoklavieren

STC-Lösung
1 M Sorbit
10 mM Tris
50 mM $CaCl_2$
pH 7,5
autoklavieren

TAE (50 x)
2 M Tris
57,1 ml Essigsäure
50 mM EDTA
ad 1 l H_2O
autoklavieren

TENS-Puffer
10 mM Tris
1 mM EDTA
100 mM NaCl
pH 8,0
autoklavieren
frisch zugeben:
2 % (w/v) SDS

Thiamin-Stammlösung
0,25 g/ml Thiamin
ad 100 ml mit H_2O

TPS
0,8 M Saccharose
45 mM KH_2PO_4
5 mM Na_2HPO_4
pH 5,5 (H_3PO_4)
autoklavieren

Trenngel-Puffer (4 x)
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
0,4 % SDS

Überschichtungslösung für IPG-Streifen
0,5 % Agarose
in 1 x SDS-Laufpuffer
aufkochen

2.6 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits (Tabelle 5) wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits.

Bezeichnung des Kits	Hersteller	Bestell-Nr.
DIG-DNA labeling and detection Kit	Roche	11175033910
iQ™ SYBR® Green Supermix	BioRad	1708882
iScript™ cDNA Synthesis	BioRad	170-8890
Midi Plasmid Purification	Qiagen	12145
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel	740609
NucleoSpin® RNA Plant	Macherey-Nagel	740949
NucleoSpin® RNA-Clean-Up	Macherey-Nagel	740948
RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase	Thermo	EP0441
SOD Determination Kit	Sigma	19160-1KT-F

2.7 Größenstandards

Zur Größenbestimmung von Nukleinsäuren oder Proteinen wurden die in Tabelle 6 aufgeführten Größenstandards verwendet.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Größenstandards.

Größenstandard	Hersteller	Bestell-Nr.
DNA-Größenstandards:		
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas	SM0321
Lambda DNA / HindIII Marker	MBI Fermentas	SM0101
Lambda DNA / HindIII Marker, DIG-markiert	MBI Fermentas	SM0101
Lambda DNA / HindIII / EcoRI Marker, DIG-markiert	Boehringer Mannheim	1218603
Protein-Größenstandards:		
PageRuler Prestained Protein Ladder #SM26616	MBI Fermentas	00134526
PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0441	MBI Fermentas	00001921
NativeMark™ Unstained Protein Standard	Novex®	LC0725

2.8 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 7 aufgelistet. Angegeben ist jeweils die Basensequenz in 5´ → 3´-Richtung und die Verwendung.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Basensequenz (5´ → 3´)	Information
K1-A	GGATGTATGGGCTAAATGTACG	bindet ca. 200 bp nach dem 5'-Ende der Kanamycinresistenz (K1-A) bzw. ca. 200 bp vor dem 3'-Ende der Kanamycinresistenz (K2-A); zur Überprüfung von *ScSod*-Mutantenstämmen verwendet
K2-A	CATCATCTGCCCAGATGCG	
Porin-RT-for	TCTCCTCCGGCAGCCTTG	zur Überprüfung der cDNA (Produkt cDNA: 201 bp, Produkt gDNA: 431 bp) und für die Real-Time-PCR
Porin-RT-rev	CGGAGGCGGACTTGTGAC	
RT Sod4_for	GCCTACAGGTCATCATAC	zur Überprüfung der cDNA (Produkt cDNA: 192 bp, Produkt gDNA: 257 bp) und für die Real-Time-PCR
RT Sod4_rev	GCTGTCGTTGTTGGTTTC	
ScSod1_for	GGAAGTACAGAACCCGCTC	binden ca. 200 bp vor bzw. 200 bp nach *ScSod1*; zur Überprüfung von *ScSod1*-Mutantenstämmen verwendet
ScSod1_rev	GCCATCCATACTACGTGGG	
ScSod2_for	GCCGAACCACTAGCTTCGC	binden ca. 200 bp vor bzw. 200 bp nach *ScSod2*; zur Überprüfung von *ScSod2*-Mutantenstämmen verwendet
ScSod2_rev	GGAATGTAGTGCACAGGCG	
SOD1-1	GCTTGATGAGGTTGTCGG	binden im *PaSod1*-Gen; zur Herstellung der *PaSod1*-Sonde verwendet
SOD1-2	GCTTGATGAGGTTGTCGG	
SOD3-1	CAGCACCAGCTTCGTTCG	binden im *PaSod3*-Gen; zur Herstellung der *PaSod3*-Sonde verwendet
SOD3-2	AGTCACCCTTCTCCTCGG	
Sod4_for	AGGTCAATCGACGGGTTC	binden im *Pa_1_10620*-Gen; zur Herstellung der *Pa_1_10620*-Sonde verwendet
Sod4_rev	TAAGGCGAGCCAGACAAG	

2.9 Plasmide und Cosmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und Cosmide sowie deren Verwendung können Tabelle 8 und Tabelle 9 entnommen werden.

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Name des Plasmids	Verwendung	Referenz
pAN7-1	enthält eine *Hygromycin*-Resistenzkassette; als Positivkontrolle für *P. anserina* Transformationen verwendet	Punt et al. 1987

Name des Plasmids	Verwendung	Referenz
pExMTS-HyPer	Plasmid kodiert das mitochondrial lokalisierte HyPer-Protein; zur Herstellung der *hph*-Sonde verwendet	Zintel 2012
phph-1	als Negativkontrolle für *P. anserina* Transformationen genutzt	Roche
pKO4	Plasmid kodiert für eine *Phleomycin*-Resistenzkassette; zur Herstellung der *Phleomycin*-Sonde verwendet	Grief 2007
pPorin2	Positivkontrolle für PCR	Gabe von Frau Dr. Hamann (AK Osiewacz)
pSod4OEx2 Klon2	*Pa_1_10620*-Überexpressionsplasmid	Böhl 2013

Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Cosmide.

Name des Cosmids	Verwendung	Referenz
20B4	Cosmid enthält das *PaSod1*-Gen; zur Herstellung der *PaSod1*-Sonde verwendet	Schwitalla 2007
8F5	Cosmid enthält das *PaSod3*-Gen; zur Herstellung der *PaSod3*-Sonde verwendet	Schwitalla 2007
8F9	Cosmid enthält das *Pa_1_10620*-Gen; zur Herstellung der *Pa_1_10620*-Sonde verwendet	Böhl 2013

2.10 Sonden

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und verwendeten DIG-markierten DNA-Sonden sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der verwendeten DIG-markierten DNA-Sonden.

Name der Sonde	verwendeter DNA-Abschnitt
Hygromycin-Sonde	Verdau des pExMTS-HyPer Plasmids mit EcoRI und NdeI. Aufreinigung des 825 bp großen DNA-Fragments und anschließende DIG-Markierung.
Phleomycin-Sonde	Verdau des pKO4 Plasmids mit NcoI und XbaI sowie Aufreinigung des 1454 bp großen DNA-Fragments und anschließende DIG-Markierung.
PaSod1-Sonde	Amplifikation, Aufreinigung sowie DIG-Markierung eines das zweite Intron von *PaSod1* überspannenden Bereiches (~ 300 bp) aus Cosmid-DNA (20B4) mit den Oligonukleotiden SOD1-1 und SOD1-2.
PaSod3-Sonde	Amplifikation, Aufreinigung sowie DIG-Markierung eines das erste Intron von *PaSod3* überspannenden Bereiches (~ 300 bp) aus Cosmid-DNA (8F5) mit den Oligonukleotiden SOD3-1 und SOD3-2.
Pa_1_10620-Sonde	Amplifikation, Aufreinigung sowie DIG-Markierung eines 499 bp großen Fragments aus Cosmid-DNA (8F9) mit den Oligonukleotiden Sod4_For und Sod4_Rev.

2.11 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 11 aufgeführt und wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 11: Liste der verwendeten Enzyme.

Enzyme	Hersteller	Bestell-Nr.
Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase	Roche	11093274910
Meerrettichperoxidase	Sigma	P8250
rDNase	Macherey-Nagel	D0801R
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas	-
Rinder Cu/ZnSOD	Sigma	S7571
RNaseA	Serva	34390
Taq DNA-Polymerase	Bio&Sell	F1060

2.12 Antikörper

Die Bezeichnung, Beschreibung und der Hersteller der für die Western Blot-Analysen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind Tabelle 12 und Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primärantikörper.

Primär-antikörper	Beschreibung	Organismus	Hersteller	Bestell-Nr.
α-Cu/Zn-SOD (PaSOD1)	monoklonaler Antikörper, der PaSOD1 (Cytoplasma und Intermembranraum der Mitochondrien) erkennt	Kaninchen	Biomol / Stressgene	SOD-100
α-Mn-SOD (PaSOD3)	monoklonaler Antikörper, der PaSOD3 in der mitochondrialen Matrix erkennt	Kaninchen	Biomol / Stressgene	SOD-111
α-PaCATB	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal) gegen die sekretierte Katalase B ([Ac]-CRYLGRFPVDEGAE -[OH], Zintel et al. 2011)	Kaninchen	Sigma (NEP)	n. a.
α-PaCYPD (224-237)	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal), der den C-Terminus von PaCYPD erkennt ([Ac]-CGLKKPTIEDSGEIN-[OH])	Kaninchen	Sigma (NEP)	n. a.
α-PaIDI-1	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal) gegen das sekretierte Protein PaIDI-1	Kaninchen	Sigma (NEP)	n. a.
α-PaPOR	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal), der PaPORIN (äußeren Mitochondrienmembran) erkennt; gerichtet gegen das Volllängenprotein PaPORIN (Luce und Osiewacz 2009)	Kaninchen	Sigma	n. a.
α-PaPRE3	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal), der die ß1-Untereinheit des Proteasoms erkennt ([H]-LYLPDTDYKVRHEN-[OH])	Kaninchen	Sigma	n. a.
α-PaPRX1	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal) gerichtet gegen PaPRX1 (Mitochondrien) ([Ac]-LHESSPGNKVNLADC-[NH2], Zintel et al. 2010)	Kaninchen	Sigma (NEP)	n. a.
α-PaSOD2	spezifischer Peptidantikörper (polyklonal), der PaSOD2 (Cytoplasma, sekretiert) erkennt ([Ac]-CERFLGTSEATKL[OH], Zintel et al. 2010)	Kaninchen	Sigma	n. a.

Tabelle 13: Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Sekundärantikörper	Beschreibung	Hersteller	Bestell-Nr.
IRDye 680LT α-rabbit IgG	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen	Li.Cor Biosciences	926-68021
IRDye 800CW α-rabbit IgG	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen	Li.Cor Biosciences	926-32211

2.13 Stämme

2.13.1 *Podospora anserina*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *P. anserina*-Stämme sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *P. anserina*-Stämme.

Stamm	Referenz
Wildtyp „s“	Rizet 1953
PaSod1	
*PaSod1*_OEx1 T11, $^{+}$F88210	Schwitalla 2007
*PaSod1*_OEx1 T11, $^{-}$F88271	Schwitalla 2007
*PaSod1*_OEx2 T57, $^{+}$F99671	Zintel 2012
*PaSod1*_OEx2 T57, $^{-}$F99660	Zintel 2012
*PaSod1*_OEx3 T76, $^{-}$F101820	Zintel 2012
*PaSod1*_OEx3 T76, $^{-}$F101661	Zintel 2012
Δ*PaSod1* T4-41, $^{+}$F96970	Zintel 2012

Stamm	Referenz
Δ*PaSod1* T4-50, $^{-}$F99153	Zintel 2012
PaSod2	
*PaSod2*_OEx1 T34, $^{+}$F101381	Zintel 2012
*PaSod2*_OEx1 T34, $^{-}$F101360	Zintel 2012
*PaSod2*_OEx2 T2-6, $^{+}$F119430	Zintel 2012
*PaSod2*_OEx2 T2-6, $^{-}$F119471	Zintel 2012
*PaSod2*_OEx4 T2-20, $^{+}$F119641	Zintel 2012
*PaSod2*_OEx4 T2-20, $^{-}$F119640	Zintel 2012
Δ*PaSod2* T78, $^{+}$F88531	Schwitalla 2007
Δ*PaSod2* T78, $^{-}$F88520	Schwitalla 2007
PaSod3	
*PaSod3*_OEx1 T27, $^{-}$F101900	Zintel 2012
*PaSod3*_OEx1 T27, $^{-}$F101891	Zintel 2012
*PaSod3*_OEx3 T72, $^{-}$F88000	Schwitalla 2007
*PaSod3*_OEx3 T72, $^{+}$F69441	Schwitalla 2007
Δ*PaSod3* T8-28, $^{+}$F96161	Zintel 2012
Δ*PaSod3* T8-28, $^{-}$F96121	Zintel 2012
Pa_1_10620	
*Pa_1_10620*_OEx1 B25	Böhl 2013
*Pa_1_10620*_OEx1 B25, $^{-}$F177972	diese Arbeit
*Pa_1_10620*_OEx1 B25, $^{+}$F177973	diese Arbeit
*Pa_1_10620*_OEx1 B44	diese Arbeit
*Pa_1_10620*_OEx2 B44, $^{-}$F189340	diese Arbeit
*Pa_1_10620*_OEx2 B44, $^{+}$F189380	diese Arbeit
PaSod1/2	
Δ*PaSod1*(T4-6)-*PaSod2*_OEx2(T2-6), $^{-}$F177600	diese Arbeit
Δ*PaSod1*(T4-6)-*PaSod2*_OEx2(T2-6), $^{-}$F177602	diese Arbeit
PaSod3/Pa_1_10620	
Δ*PaSod3*(T8-28^{-})-*Pa_1_10620*_OEx2(B44), $^{-}$F189910	diese Arbeit
Δ*PaSod3*(T8-28^{-})-*Pa_1_10620*_OEx2(B44), $^{+}$F189920	diese Arbeit
Δ*PaSod3*(T8-28^{-})-*Pa_1_10620*_OEx2(B44), $^{+}$F189940	diese Arbeit
Δ*PaSod3*(T8-28^{-})-*Pa_1_10620*_OEx2(B44), $^{-}$F189961	diese Arbeit
PaCypD	
*PaCypD*_Ex T6^{-}, Primärtransformante	Brust 2011
PaMth1	
Δ*PaMth1* T2-1, $^{+}$F50750	Kunstmann 2009
Δ*PaMth1* T2-1, $^{-}$F50751	Kunstmann 2009

2.13.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme.

Stamm	Referenz
Wildstamm BY4742	Brachmann et al. 1998
Δ*ScSod1*	pers. Mitteilung Prof. Dr. A. Reichert
Δ*ScSod2*	pers. Mitteilung Prof. Dr. A. Reichert
Wildstamm EG103 (yMW761-1)	pers. Mitteilung Prof. Dr. V. D. Longo
*ScSod1*_OEx (yMW604)	pers. Mitteilung Prof. Dr. V. D. Longo
*ScSod2*_OEx (yMW606)	pers. Mitteilung Prof. Dr. V. D. Longo

2.13.3 *Escherichia coli*

Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm ist Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Liste des in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stammes.

Stamm	Referenz
XL1 Blue	Stratagene

2.14 Computerprogramme

Die zur Erstellung dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme sind in Tabelle 17 genannt.

Tabelle 17: Liste der verwendeten Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Referenz / Quelle
BLAST	Homologievergleiche	www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi
Bowtie2	Auswertung von Transkriptomdaten	Langmead et al. 2009
Boxshade	Darstellung von Homologievergleichen	www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
Clone Professional Manager Suite 8	Erstellung von Oligonukleotiden	SciEd
Clustal W	Vergleiche von Aminosäuresequenzen sowie Berechnung von Sequenz-Identitäten	Larkin et al. 2007
Conserved Domain Architecture Retrieval Tool	Domänenvergleiche	www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/lexington/lexington.cgi
DatLab 4	Oroboros-Auswertungen	Oroboros
Domänensuche	Domänensuche	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
Excel	Tabellenkalkulationen, statistische Auswertungen	Microsoft
Illustrator	Bildbearbeitung	Adobe
MitoProtII	Identifizierung von mitochondrialen Lokalisierungssequenzen	Claros und Vincens 2004
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
PhyML	Erstellung phylogenetischer Bäume	www.phylogeny.fr/ Dereeper et al. 2008
Powerpoint	Bildbearbeitung	Microsoft
Protein Molecular Weight Calculator	Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen	www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm
PSORTII	Lokalisationsvorhersage von Proteinen	Horten und Nakai 1997
Quantity One	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	BioRad
SPSS 19.0.0 (Statistical Package for Social Science)	statistische Auswertungen	SPSS Inc.
T-Test	statistische Auswertungen	studentsttest.com

3. Methoden

3.1 DNA-spezifische Methoden

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

Für die zu untersuchenden Stämme wurde jeweils eine BMM-Platte mit Myzelstückchen auf Cellophanfolie für vier Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Das Myzel musste anschließend von der Platte abgekratzt, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und dessen Deckel mit einer Kanüle durchstochen werden. Nach Zugabe von 1 ml frisch angesetztem TENS-Puffer wurden folgende Schritte dreimal wiederholt: Reaktionsgefäß 30 sec vortexen, 30 sec in flüssigem Stickstoff inkubieren und ca. 5 min (ggfs. so lange bis die gesamte Probe aufgetaut ist) in einem Heizblock bei 70 °C schütteln. Es schloss sich eine Zentrifugation für 10 min bei 14.000 Upm und RT an, bevor der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol vermischt werden konnte. Nach 5 min bei 6.000 Upm und RT wurde die obere Phase mit 1 Vol. Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) versetzt, gemischt und erneut zentrifugiert (5 min, 6.000 Upm, RT). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol vermischt. Nach Zentrifugation (5 min, 6.000 Upm, RT) musste die obere Phase erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Nach Zugabe von 1 Vol. Isopropanol wurde die Probe mehrmals invertiert und anschließend pelletiert (20 min, 15.000 Upm, 4 °C). Das entstandene Pellet wurde ca. 10 min luftgetrocknet und danach in 90 µl H_2O mit 10 µl 3 M Natriumazetat pH 5,2 bei 37 °C schüttelnd rückgelöst. Nach Zugabe von 2 Vol. Ethanol (abs., -20 °C) wurde die DNA für 15 min bei -80 °C gefällt, bei 15.000 Upm für 20 min (4 °C) pelletiert und in 200 µl 70 % Ethanol gewaschen (15.000 Upm, 10 min, 4 °C). Nach Lufttrocknen des Pellets konnte dieses in 30 - 50 µl H_2O rückgelöst werden. Es folgte die Kontrolle und Konzentrationsbestimmung von 1 µl gelöster DNA in einem Agarose-Gel. Anschließend wurde die DNA bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Isolation von DNA aus *S. cerevisiae* für PCR-Reaktionen

Es wurde eine stecknadelgroße Menge des zu untersuchenden Hefestammes von einer YPD-Platte in 200 µl sterilem H_2O gelöst und 10 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend konnte 1 µl dieser Lösung für PCR-Reaktionen eingesetzt werden.

3.1.3 Isolation von Plasmiden aus *E. coli* („Midi"-Plasmidpräparation)

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in hoher Qualität aus *E. coli* wurde das „Plasmid Purification Kit" von Qiagen verwendet. Die nach Anleitung angezogene 150 ml LBA-Hauptkultur wurde nach Herstellerangaben behandelt und das erhaltene DNA-Sediment in 50 µl H_2O resuspendiert.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden

Die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (Thermo Scientific). Die Messungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Konzentration jedes Oligonukleotids wurde durch die Absorption einer verdünnten Probe bei 260 nm bestimmt und in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{Konzentration}\left(\frac{\text{mol}}{\text{l}}\right) = \frac{\text{Absorption 260 nm}}{\text{Em}}$$

$$\text{Em (Oligonukleotid)} = \text{A} * 16000 + \text{T} * 9600 - \text{G} * 12000 + \text{C} * 7000$$

Em = molarer Extinktionskoeffizient, A = Adenin, T = Tyrosin, G = Guanin, C = Cytosin

3.1.5 Amplifikation von DNA (Polymerase Kettenreaktion (PCR))

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten bzw. Kolonie-PCRs als Nachweisreaktionen erfolgten mit der *Taq*-Polymerase. Die benötigten Komponenten sowie die PCR-Programme sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 18: Komponenten der PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase.

Komponente	Konzentration für PCR	Konzentration für Kolonie-PCR
Puffer (10 x)	1 x	1 x
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM	0,2 mM
Oligonukleotid (for)	12,5 pmol	12,5 pmol
Oligonukleotid (rev)	12,5 pmol	12,5 pmol
DNA-Matrize	2,5 - 5 ng genomische DNA	1 µl DNA-Lösung (siehe 3.1.2)
Taq-Polymerase	0,05 U/µl	0,05 U/µl
H_2O	ad 25 µl	ad 25 µl

Tabelle 19: Verwendete PCR-Programme.

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Dauer
1 x	95 °C	5 min
35 x	95 °C	1 min
	55 - 65 °C	1 min
	72 °C	1 min/kbp
1 x	72 °C	6 min
1 x	4 °C	∞

3.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die gelelektrophoretische Auftrennung kann DNA der Größe nach separiert werden. Die zu untersuchenden DNA-Fragmente musste zunächst mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt werden. Anschließend wurden die Proben auf ein 0,8 - 2 % iges TAE-Agarosegel, welches in einer ionischen Pufferlösung (TAE-Puffer) lag, aufgetragen und unter Einfluss eines elektrischen Feldes aufgetrennt (1,5 h, 80 V). Zur Ermittlung der Fragmentgrößen diente ein ebenfalls auf das Gel aufgetragener Größenstandard (Tabelle 6). Das Gel wurde dann für 10 - 20 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml EtBr in H_2O) gefärbt. Anschließend konnten die DNA-Banden durch UV-Strahlung sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

3.1.7 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen sowie die Elution und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem „NucleoSpin® Extract II-Kit“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Zur Elution wurden 15 - 50 µl Elutionspuffer oder H_2O verwendet.

3.1.8 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA sowie von genomischer DNA wurde die zu untersuchende DNA-Probe mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen und dem entsprechenden Puffer nach Herstellerangaben ü. N. bei 37 °C inkubiert. Für 1 µg DNA wurden standardmäßig 5 U der Restriktionsendonukleasen verwendet.

3.1.9 Herstellung von DNA-Sonden

Das als DNA-Sonde zu verwendende DNA-Fragment wurde mittels PCR amplifiziert oder mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen aus dem entsprechenden Plasmid ausgeschnitten (Tabelle 10). Der Ansatz musste dann gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem „NucleoSpin® Extract II-Kit“ (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben eluiert und aufgereinigt werden. Die anschließende Markierung des Fragments erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling-Kit“ nach Angaben des Herstellers.

3.1.10 Überprüfung der Sondenmarkierungseffizienz

Zur Überprüfung der DIG-markierten Sonde wurde je 1 µl DIG-markierte Kontroll-DNA (Roche) der Konzentrationen 1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl, 1 pg/µl und 0,1 pg/µl auf eine Nylonmembran aufgetragen. Von der hergestellten DIG-markierten Sonde wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe von 1 ng/µl - 0,1 pg/µl erstellt und auf die Nylonmembran pipettiert. Das Crosslinken der Membran von beiden Seiten erfolgte im „UV-Stratalinker 1800“ mit 1200 µJoule x 100. Es folgte die Detektion wie bei einem Southern Blot, jedoch mit NBT/X-Phosphat als Farbsubstrat (Inkubation 1 - 3 h oder ü. N. im Dunkeln). Die Bestimmung der Konzentration an DIG-markierter Sonde geschah im Vergleich zur Stärke der Färbung der DIG-markierten Kontroll-DNA.

3.1.11 DNA-Übertragung via Southern Transfer

Die zu analysierende DNA (500 ng - 1 µg) wurde ü. N. mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Es schloss sich eine gelelektrophoretische Auftrennung der DNA in einem 1 % igen Agarosegel sowie der Southern Transfer auf eine Nylonmembran an. Als Größenstandard dienten 2,5 µl DIG-markierter λ-HindIII-Marker oder DIG-markierter λ-HindIII/EcoRI-Marker. Die Übertragung erfolgte abweichend vom Originalprotokoll (Southern 1975) mit Hilfe einer Vakuumapparatur nach Herstellerangaben. Nach dem Transfer wurde die Membran

luftgetrocknet. Zur Fixierung der DNA an die Membran wurde Letztere beidseitig mit dem „UV-Stratalinker 1800“ mit 1200 µJoule x 100 behandelt.

3.1.12 Hybridisierung und Detektion von DNA

Die bei dem Southern Transfer (siehe 3.1.11) erhaltene Membran musste für 1 h in 6 x SSC mit 0,5 % Blocking-Reagenz bei RT in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungsofen inkubiert werden. Es folgte eine Prähybridisierung der Membran für 3 h in 20 ml „high“-SDS versetzt mit 1 % (v/v) denaturierter Heringssperma-DNA bei 55 °C. Danach schloss sich eine Inkubation mit 15 ml „high“-SDS versetzt mit 1 % (v/v) denaturierter Heringssperma-DNA und 5 - 25 ng denaturierter Sonden-DNA/ml „high“-SDS bei 55 °C ü. N. an. Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal je 5 min in 2 x SSC mit 0,1 % SDS bei RT gewaschen und anschließend zweimal 15 min in 0,1 x SSC mit 0,1 % SDS bei 68 °C behandelt. Es folgten 5 min in DIG-Waschpuffer und 20 min in DIG-Puffer 2 bei RT. Die Membran wurde danach 30 min in DIG-Puffer 2, versetzt mit 1 : 10.000 DIG-Antikörper-Konjugat (Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase), inkubiert, sowie drei mal je 10 min in DIG-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran 5 min in DIG-Puffer 3 inkubiert, mit 500 µl CSPD-Lösung (0,25 mM CSPD in DIG-Puffer 3) benetzt, nach Ausstreichen von überschüssigem CSPD-Substrat in eine transparente Folie eingeschweißt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte das Einkleben der eingeschweißten Membran in eine Filmkassette sowie das Auflegen eines Röntgenfilms. Nach 15 min - 3 h bei RT konnte der Film entwickelt werden.

3.1.13 Abwaschen der DNA-Sonde

Um die mit einer DNA-Sonde behandelte Membran nochmals mit einer anderen DNA-Sonde hybridisieren zu können, musste die zuerst verwendete DNA-Sonde abgewaschen werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 5 min mit H_2O bei RT in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungsofen behandelt. Es folgten zwei Schritte für jeweils 10 min bei 37 °C in 0,2 M NaOH versetzt mit 0,1 % SDS. Nach der zweimaligen Inkubation der Membran für 15 min bei 37 °C in 2 x SSC schloss sich erneut die Hybridisierung und Detektion (siehe 3.1.12) mit einer neuen DNA-Sonde an.

3.2 RNA-spezifische Methoden

3.2.1 Isolation von Gesamt-RNA aus *P. anserina*

Zur Gewinnung von RNA wurden zunächst BMM-Platten mit Cellophan mit mehreren Myzelstückchen des zu untersuchenden Stammes hergestellt und für drei Tage bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Anschließend musste das Myzel von den Platten abgekratzt und in flüssigem Stickstoff gemörsert werden. Die Gesamt-RNA wurde mit dem „Nucleo Spin® RNA-Clean-Up Kit“ (Macherey Nagel) isoliert. Der hierbei inbegriffene rDNase-Verdau erfolgte in einem Eppendorf-

Gefäß und nicht wie vom Hersteller empfohlen in der Reinigungs-Kolonne. Der übrige Reaktionsverlauf erfolgte nach dem vom Hersteller angegebenen Standardprotokoll.

3.2.2 Isolation von Gesamt-RNA für Transkriptomanalysen

Drei Tage gekeimte Sporen wurden 2 - 15 Tage auf M2-Medium, überschichtet mit Cellophanfolie, kultiviert. Anschließend wurde die RNA mittels $CsCl_2$ isoliert, wie bereits in Borghouts et al. 2001 beschrieben. Dazu wurden 10 g Myzel in flüssigem Stickstoff gemörstert, das Myzelpulver in 30 ml vorgewärmten (60 °C) GTC-Puffer überführt, gemischt und 10 min bei 60 °C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 10 min bei 10.000 Upm und RT. Der Überstand wurde auf 3 ml $CsCl_2$-Lösung (Brechnungsindex von 1.400) in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert. Die RNA wurde bei 34.000 Upm für 18 h bei 20 °C zentrifugiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, in DMPC-H_2O gelöst und im Weiteren für Transkriptomanalysen (siehe 3.4.11) verwendet.

3.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA (siehe 3.2.1) von *P. anserina* erfolgte mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ (BioRad) nach Herstellerangaben. Hierzu wurde 1 µg RNA, 4 µl „iScript™ Reaction Mix“ und 1 µl „iScript™ Reverse Transkriptase“ mit H_2O auf 15 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte in einem Thermo-Zykler nach Herstellerangaben.

Alternativ konnte auch das “RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase Kit” (MBI Fermentas) verwendet werden. Hierzu wurde ebenfalls 1 µg RNA eingesetzt. Diese musste mit 1 µl Oligo$(dT)_{18}$ versetzt, auf 12,5 µl mit H_2O aufgefüllt und für 5 min bei 65 °C inkubiert werden. Anschließend wurden 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 0,5 µl RNase-Inhibitor, 2 µl dNTPs und 1 µl Reverse Transkriptase zugegeben. Es folgte die Inkubation für 1 h bei 42 °C und für 10 min bei 70 °C.

3.2.4 Quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR)

Zur relativen Quantifizierung von Transkriptmengen wurde eine quantitative „Real-Time“-Reverse Transkriptase PCR mit cDNA im Thermocycler My iQ (BioRad) durchgeführt. Das entsprechende PCR-Programm kann Tabelle 20 entnommen werden. Dazu wurde der „iQ™ SYBR® Green Supermix“ von BioRad nach Herstellerangaben verwendet. Die Messung der relativen Menge eines spezifischen Transkripts beruht dabei auf einer normalen PCR-Reaktion. In dem verwendeten „iQ™ SYBR® Green Supermix“ ist der Fluoreszenzfarbstoff „SYBR® Green“ enthalten. Dieser interkaliert mit doppelsträngiger DNA und führt zu der Bildung eines Farbstoff-DNA-Komplexes, der Licht bei λ_{max} = 498 nm absorbiert und bei λ_{max} = 522 nm emittiert. Durch eine optische Emissions-Auslesung wird nach jedem Elongationszyklus der PCR die amplifizierte DNA-Menge quantifiziert. Die Produktmenge korreliert dabei mit dem Ct-Wert, der angibt, in welchem Zyklus des PCR-Programms die gemessene Polymerase-Reaktion in den Bereich des

linearen Produktzuwachses gekommen ist. Vor der eigentlichen qRT-PCR wurde für jedes zu verwendende Oligonukleotidpaar die optimale Anlagerungstemperatur sowie die Effizienz dieses Oligonukleotidpaares nach Pfaffl (2001) ermittelt (Tabelle 21).

Tabelle 20: Standardprogramm der qRT-PCR.

Funktion	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	1 x	95 °C	3 min
Denaturierung	40 x	95 °C	30 sec
Anlagerung		60 °C bzw. 61 °C	30 sec
Elongation		72 °C	30 sec
Fluoreszenzermittlung		72 °C	-
Schmelzkurve	1 x	95 °C	-
Lagerung	1 x	4 °C	∞

Tabelle 21: Aufstellung der optimalen Anlagerungstemperaturen, Oligonukleotidkonzentrationen sowie Effizienzen für die verwendeten Oligonukleotidpaare.

Oligonukleotide	optimale Temperatur [°C]	optimale Oligonukleotid-Konzentration [nM]	ermittelte Effizienz
Porin-RT-for, Porin-RT-rev	60	900	2,03
RT Sod4_for, RT Sod4_rev	61	500	2,3

Für die Vergleichbarkeit der Transkriptmengen aus verschiedenen Proben musste die cDNA-Gesamtmenge normalisiert werden. Dazu wurde das *P. anserina*-Gen *Porin* (Housekeeping Gen) gewählt. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung, um den experimentellen Fehler innerhalb einer Probe zu minimieren. Zur Berechnung des Expressionsverhältnisses wurden die Ct-Werte des Zielgens (*Pa_1_10620* (*PaSod4*)) und des Referenzgens (*PaPorin*) sowie die Effizienzen der jeweiligen Oligonukleotidpaare in folgende Formel von Pfaffl (2001) eingesetzt:

$$\text{Ratio} = \frac{(\text{E}_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}\ (\text{Kontrolle}-\text{Behandelt})}}{(\text{E}_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}}\ (\text{Kontrolle}-\text{Behandelt})}}$$

E = Effizienz; ΔCP = Ct Kontrolle - Ct Behandlung

3.3 Protein-spezifische Methoden

3.3.1 Isolation von nativem Gesamtproteinextrakt aus *P. anserina*

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakten wurden je Probe zwei M2-Platten mit Cellophanfolie überschichtet und mit etwa 20 Myzelstückchen bei Dauerlicht und 27 °C im Brutschrank inkubiert. Nach drei Tagen Inkubation folgte die Überführung des Myzels von den Platten in Weithalskolben mit 200 ml flüssigem CM-Medium. Das Myzel wurde nach erneuter dreitägiger Inkubation bei 27 °C unter Schütteln und Dauerlicht über dreilagigen Mull filtriert, in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend gewogen. Es erfolgte die Zugabe von 50 µl Proteinextraktionspuffer mit 50 mM DTT und 1 % Protease-Inhibitor Cocktail zu je 100 mg Myzelpulver sowie eine schüttelnde Inkubation für 10 min bei RT. Bei der Proteinisolation für zweidimensionale Gele wurde das Myzelpulver in IEF-Puffer mit 1 % Bio-Lyten gelöst. Durch einen Zentrifugationsschritt

für 10 min bei 4 °C und 15.000 Upm wurden die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand mit dem enthaltenen Gesamtprotein wurde aliquotiert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 3.3.4) bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Isolation von nativem Gesamtproteinextrakt aus *S. cerevisiae*

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakten aus *S. cerevisiae* wurden zunächst die zu untersuchenden Stämme (Wildtyp und *ScSod*-Deletionsmutanten) auf YPD-Platten frisch ausgestrichen. Von diesen Platten wurde eine 20 ml YPD-Kultur angesetzt und ü. N. bei 30 °C und 200 Upm inkubiert. Am folgenden Tag mussten die Zellen durch Zentrifugation in einem 15 ml Reaktionsgefäß geerntet (3.500 Upm, 5 min, 4 °C) und mit 4 ml kaltem Proteinextraktionspuffer gewaschen werden (3.500 Upm, 5 min, 4 °C). Während der gesamten Isolation verblieben die Proben auf Eis. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das so erhaltene Pulver wurde mit 400 µl Proteinextraktionspuffer mit 50 mM DTT und 1 % Protease-Inhibitor Cocktail versetzt und gründlich gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (15.000 Upm, 10 min, 4 °C) konnte der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert werden (15.000 Upm, 30 min, 4 °C). Der erhaltene Überstand kam in ein neues Reaktionsgefäß. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Alternativ wurden Gesamtproteinextrakte aus den *ScSod*-Überexpressionsstämmen von Platte isoliert, um die Stämme dauerhaft auf Selektionsmedium (-URA3 bzw. -LEU2) kultivieren zu können. Dazu war es erforderlich, die gewachsenen Hefen von jeweils drei Platten (Inkubation für 2 - 3 Tage bei 30 °C) abzukratzen, in flüssigem Stickstoff zu mörsern und mit 100 - 200 µl Proteinextraktionspuffer mit 50 mM DTT und 1 % Protease-Inhibitor Cocktail zu versetzen sowie gründlich zu mischen. Nach einer Zentrifugation (15.000 Upm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und erneut zentrifugiert (15.000 Upm, 30 min, 4 °C). Der so erhaltene Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.3.3 Isolation von mitochondrialen Proteinextrakten aus *P. anserina*

Für die Isolation von mitochondrialen Proteinextrakten wurden mehrere Myzelstückchen der zu analysierenden Stämme auf 8 - 10 M2-Platten mit Cellophanfolie für drei Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Das Myzel von je zwei Platten wurde in einen Weithalskolben mit 200 ml flüssiges CM-Medium überführt und für weitere drei Tage bei 27 °C und Dauerlicht im Schüttelinkubator angezogen. Nach Abfiltern des Myzels über vierlagigen Mull kam das Myzel in ein Becherglas, gefüllt mit kaltem Mitochondrien-Isolationspuffer 2 auf Eis. Die sich anschließende Isolation erfolgte bei 4 °C im Kühlraum. Zunächst musste das Myzel mit Hilfe eines „Bead-Beater™“-Homogenisators (Roth) homogenisiert werden. Dazu wurde der Behälter zu 1/3 mit sterilen Glasperlen, etwa 5 g Myzel und Mitochondrien-Isolationspuffer 2 gefüllt. Um Luftblasen auf der Oberfläche zu entfernen wurden 3 - 4 Tropfen Antifoam-Lösung (1 : 5 Verdünnung) zugegeben. Das Myzel wurde zweimal für je 20 sec mechanisch zerkleinert;

dazwischen lag 1 min Pause. Anschließend wurde das Homogenisat über ein Nesseltuch gefiltert, auf zwei GSA-Becher verteilt und für 10 min bei 2.500 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde über Glaswolle abgefiltert und bei 11.000 Upm für 20 min bei 4 °C in GSA-Bechern zentrifugiert. Vom Überstand, dem Cytoplasma, konnten 10 ml abgenommen und für spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert werden. Das Pellet, in dem sich Mitochondrien und Vakuolen befanden, wurde in etwa 1 ml Mitochondrien-Isolationspuffer 1 resuspendiert und das rückgelöste Pellet in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 2 - 3 min wurde der erhaltene Überstand in ein SS34-Röhrchen überführt, mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 zu 2/3 gefüllt und zentrifugiert (11.500 Upm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in etwa 1 ml Mitochondrien-Isolationspuffer 1 ohne Luftblasen resuspendiert. Zur Vorbereitung des Saccharosegradienten mussten vorsichtig 4 ml einer 50 % igen, 4 ml einer 36 % igen und 2 ml einer 20 % igen Saccharoselösung in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert werden, um ein Vermischen der einzelnen Saccharoseschichten zu vermeiden. Das resuspendierte Pellet wurde dann auf diesen Saccharosegradient pipettiert. Durch einen Ultrazentrifugationsschritt (60 min, 25.000 Upm, 4 °C) wurden intakte Mitochondrien von Vakuolen und zerstörten Mitochondrien getrennt. Die intakte Mitochondrien-Bande konnte mit einer Pipette abgenommen, in ein SS34-Röhrchen überführt und dieses zu 2/3 mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 aufgefüllt werden. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei 13.000 Upm, 20 min und 4 °C an. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in max. 300 µl Mitochondrien-Isolationspuffer 1 rückgelöst, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinen basierte auf der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit Hilfe des Roti-Nanoquant Reagenzes. Für die Erstellung einer Eichgerade wurden 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl und 40 µl BSA (1 µg/µl) mit 10 µl des entsprechenden Puffers versetzt und mit Wasser auf 1600 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 400 µl Roti-Nanoquant Reagenz und Mischen der Probe erfolgte in einem Photometer die Bestimmung der Absorption bei 450 nm und 590 nm. Die lineare Regression durch den Quotienten beider Messwerte ergab die Eichgerade.

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 2 µl der zu testenden Probe mit 8 µl entsprechenden Puffers versetzt, mit Wasser auf 1600 µl aufgefüllt und 400 µl Roti-Nanoquant zugegeben. Anhand des ermittelten Quotienten und dem Vergleich mit der zuvor erstellten Eichgerade wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

3.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden 12 - 16 % ige SDS-Polyacrylamidgele sowie das Mini-Protean System (BioRad) verwendet. Ein Pipettierschema für jeweils zwei denaturierende Polyacrylamidgele ist in Tabelle 22 aufgeführt.

Tabelle 22: Pipettierschema für je zwei SDS-Polyacrylamidgele.

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (16 %)
40 % Acrylamid	500 µl	3 ml	4 ml
4 x Sammelgel- / Trenngelpuffer	1 ml	2,5 ml	2,5 ml
H_2O	2,4 ml	4,5 ml	3,5 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl

Die aufzutrennenden Proteinproben mussten in 1 x SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 10 min aufgekocht und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert werden. Als Laufpuffer diente der 1 x Laufpuffer versetzt mit SDS. Es folgte das Beladen der Geltaschen mit den Proteinproben sowie mit 1,5 µl des Protein-Größenstandards (Tabelle 6). In der Regel wurden je 50 - 100 µg mitochondriale Proteinextrakte oder 100 µg Gesamtproteinextrakte aufgetragen. Es schloss sich die Gelelektrophorese bei 100 V an, bis die Blau-Front des Ladepuffers aus dem Gel ausgetreten war.

Der Transfer von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran erfolgte mit Hilfe der „Mini Protean® II“ Apparatur mit Tank-Blot-Zubehör (BioRad) nach Angaben des Herstellers. Eine PVDF-Membran, zugeschnitten auf die Größe des Polyacrylamidgels, musste für 30 sec in 100 % Methanol aktiviert, kurz in H_2O gewaschen und für 5 - 15 min in Blotting-Puffer inkubiert werden. Parallel dazu wurde das zu blottende SDS-Gel für 15 min in Blotting-Puffer inkubiert. Die Blotting-Apparatur wurde nach Herstellerangaben aufgebaut und der Proteintransfer in Blotting-Puffer erfolgte für 70 min bei 100 V und 4 °C. Anschließend wurde die Membran für 1 min in 100 % Methanol fixiert, für 1 min in H_2O rehydriert und kurz in 1 x PBS inkubiert. Vor der Immunodetektion der Proteine folgte die Absättigung der Membran für 1 h bei RT in Blocking-Buffer (Li.Cor Biosciences).

3.3.6 Immunodetektion von Proteinen

Die vorbereitete Membran wurde ü. N. bei 4 °C oder für 1 h bei RT mit 10 ml einer Primärantikörperlösung (verdünnt in Odyssey Blocking-Puffer mit 0,1 % Tween20) geschwenkt. Daraufhin wurde 4 x 5 min mit 1 x PBS, 0,1 % Tween20 bei RT gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation im Dunkeln mit einem gegen den Produktionsorganismus des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper (verdünnt in Odyssey Blocking-Puffer mit 0,1 % Tween20 und 0,02 % SDS). Zur Entfernung von ungebundenem Antikörper wurde die Membran erneut 4 x 5 min mit 1 x PBS, 0,1 % Tween20 gewaschen. Es schloss sich die Detektion am „Odyssey Infrared Imager“ (Li.Cor Biosciences) gemäß Herstellerangaben an. Kurzzeitiges Lagern erfolgte im Dunkeln in 1 x PBS bei 4 °C.

3.3.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von nativen Proteinen erfolgte in 10 % igen Acrylamidgelen. Dabei fanden Mini-Protean Systeme (BioRad) Verwendung, die nach Herstellerangaben

verwendet wurden. Ein Pipettierschema für jeweils zwei native Polyacrylamidgele ist Tabelle 23 zu entnehmen.

Tabelle 23: Pipettierschema für zwei native Polyacrylamidgele.

Komponente	Sammelgel (5 %)	Trenngel (10 %)
30 % Acrylamid	850 µl	3,3 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8,9	850 µl	2,2 ml
H_2O	3,3 ml	4,5 ml
TEMED	5 µl	16,7 µl
10 % APS	50 µl	50 µl

Die Vorbereitung der Proteinproben erfolgte, indem mit dem entsprechenden Puffer und 6 x nativem Ladepuffer die gewünschte Proteinkonzentration eingestellt wurde. Für die Superoxid-Dismutase Aktivitätsgele verlief die Elektrophorese für etwa 2 h (bis die Blau-Front aus dem Gel ausgetreten war) bei 100 V. Für Katalase- und Peroxidase-Aktivitätsgele verlief die Elektrophorese für etwa 16 h bei 70 V und 4 °C. Als Laufpuffer diente der 1 x Laufpuffer ohne SDS.

3.3.8 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Das Färben eines Polyacrylamidgels erfolgte durch 30 - 60 minütige Inkubation in Görg-Coomassie-Färbelösung, woraufhin über mehrere Stunden überschüssiges Coomassie in dem Gel mittels Wasser oder Görg-Coomassie-Entfärber entfernt wurde.

3.3.9 Elution von Proteinen aus nativen Gelen

Um die genaue Lokalisation der zu untersuchenden Proteine im nativen Gel zu ermitteln, mussten die Proben doppelt auf demselben Gel aufgetragen werden. Nach der Elektrophorese wurde das Gel geteilt und eine Hälfte des Gels wurde einer Färbung (beispielsweise „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbung) unterzogen. Nach der Färbung wurden beide Gelhälften nebeneinander gelegt. Aus der unbehandelten Hälfte des Gels wurde der Bereich ausgeschnitten, in dem sich das zu untersuchende Protein befand (Abschätzung anhand des Vergleichs von gefärbtem und unbehandeltem Gel). Dieses Gelfragment musste in kleine Stücke geteilt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 200 µl Proteinextraktionspuffer überschichtet und ü. N. bei 30 °C schüttelnd inkubiert werden. Anschließend konnten die Gelstücke durch Zentrifugation (10 min, 10.000 Upm) sedimentiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dessen Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.3.10 „In-Gel“ Superoxid-Dismutase Aktivitätsfärbung

Zur Bestimmung der Aktivität von Superoxid-Dismutasen in Proben nativen Gesamtproteins oder mitochondrialer Extrakte kamen „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen zum Einsatz. Dafür wurden 100 µg Proteinextrakte je Probe elektrophoretisch auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Anschließend wurde ein Gel mit Görg-Coomassie-Färbelösung gefärbt und das andere Gel für die SOD-Aktivitätsfärbung verwendet. Dazu wurde Letzteres für 20 min in 10 ml

Kaliumphosphatpuffer mit 400 µl NBT-Lösung (2 mg/ml) im Dunkeln geschwenkt. Die Lösung konnte anschließend abgeschüttet und das Gel wiederum für 20 min im Dunkeln in 10 ml Phosphatpuffer mit 200 µl Riboflavin und 10 µl TEMED schüttelnd inkubiert werden. Dann wurde das Gel über einem Leuchttisch geschwenkt, bis nach 2 - 15 min helle Banden erschienen, welche die SOD-Aktivitäten zeigten. Zur Dokumentation wurde das Gel gescannt.

> In Verbindung mit Licht führen Riboflavin und TEMED zu der Bildung von Superoxid. Dieses ist zum einen das Substrat der SODs, kann aber auch mit im Gel vorliegendem NBT reagieren und zu der Bildung von NBT-Diformazan führen. Das Diformazan bildet einen violetten Niederschlag im Gel. Lediglich in den Bereichen, in denen SODs in dem nativen Gel aktiv sind, wird das Superoxid detoxifiziert, sodass es zu keiner violetten Färbung kommt. Somit zeigen farblose Banden SOD-Aktivität an.

Zur selektiven Inaktivierung von Cu/ZnSODs konnte das native Gel nach der Gelelektrophorese für 1 h in Kaliumphosphatpuffer mit 5 mM H_2O_2 inkubiert werden (Troxell et al. 2012), bevor die Färbung wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

3.3.11 *In vitro* SOD-Aktivitätsmessung mittels SOD-Kit

Zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivität einer Probe wurde das „SOD Determination Kit“ (Sigma) nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden jeweils 1 µg Gesamtproteinextrakte oder 2 µg isolierte mitochondriale Proteinextrakte pro Ansatz eingesetzt.

3.3.12 „In-Gel“ Katalase- und Peroxidase-Aktivitätsgele

Zur qualitativen Katalase- und Peroxidase-Aktivitätsbestimmung wurden je 30 µg native Proteinextrakte auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen für 14 - 18 h bei 70 V und 4 °C elektrophoretisch aufgetrennt. In der Zwischenzeit konnten pro Gel 30 mg DAB in 1 x PBS (pH 7,4) bei 50 °C auf dem Heiz-Magnetrührer gelöst und anschließend für 10 min bei 4 °C gelagert werden. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde ein Gel für die Katalase- und das andere für die Peroxidase-Aktivitätsfärbung verwendet.

Für die Katalase-Aktivitätsfärbung wurde das Gel dreimal für 10 min mit H_2O gewaschen. Darauf folgte eine Inkubation in 30 ml H_2O mit 3 µl 30 % Wasserstoffperoxid für 30 min sowie dreimaliges waschen mit H_2O und eine anschließende Inkubation in 10 ml Katalaseaktivitätsgel-Färbelösung. Diese Färbelösung wurde unmittelbar vor der Färbung angesetzt. Dazu wurden 1 g $FeCl_3$ in 5 ml H_2O und 0,6 g $K_4[Fe(CN)_6]$ in 5 ml H_2O gelöst, beide Lösungen miteinander gemischt und auf das Gel gegeben. Die Komponenten der Färbelösung reagierten miteinander und bildeten im Gel einen homogen verteilten Niederschlag. Das Gel konnte auf einer Lichtquelle leicht geschwenkt werden bis nach etwa 5 - 10 min farblose Banden sichtbar wurden. Die farblosen Banden entstanden an den Stellen im Gel, an denen Katalase-Aktivität vorhanden war, da an diesen Stellen H_2O_2 abgebaut wurde. Das Gel wurde aus der Färbelösung entnommen, gründlich mit H_2O gewaschen und gescannt.

Für die Peroxidase-Aktivitätsfärbung wurde das Gel dreimal für 10 min in 1 x PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 20 min in 30 ml 1 x PBS mit 30 mg DAB und 3 µl 30 % H_2O_2 auf einer Schüttelplattform bis braune Banden zu erkennen waren. Die braunen Banden entstanden an Stellen, an denen eine Peroxidase-Aktivität vorlag. Das Gel wurde anschließend zweimal mit H_2O gewaschen und zur Dokumentation gescannt.

3.3.13 Messung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes

Diese Messung beruht auf der Methode von Munkres (1990) und wurde modifiziert nach Kowald et al. (2012) durchgeführt. Zur quantitativen Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes mussten die benötigten Stämme für vier Tage auf M2-Medium (ggfs. mit $MnSO_4$ Supplementation) bei 27 °C und Dauerlicht angezogen werden. Anschließend wurde je ein Agarblock mit einer 200 µl Pipettenspitze ausgestochen und in ein Well einer 96 Well Platte überführt. Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung, um den experimentellen Fehler innerhalb einer Probe zu minimieren. Zudem wurden fünf Agarblöcke ausgestanzt und für die Trockengewichtbestimmung in ein zuvor gewogenes Eppendorf-Gefäß überführt. Die Agarblöcke in der 96 Well Platte wurden mit jeweils 200 µl DAB-Färbelösung überschichtet und für 3 h bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Um die Werte nach der Messung auf eine bekannte Wasserstoffperoxid-Menge beziehen zu können, war es erforderlich, eine Eichgerade mit verschiedenen H_2O_2-Konzentrationen ohne Myzel zu erstellt. Letztere wurde auch mit 200 µl DAB-Färbelösung vermischt. Nach der Inkubation mussten 100 µl Lösung je Well abgenommen und in eine neue 96 Well Platte überführt werden. Diese wurde im Photometer (Tecan, Safire 2) bei 471 nm analysiert. Um die Ergebnisse mit dem Trockengewicht des Myzels verrechnen zu können, wurden die ausgestanzten Agarblöcke für 90 sec in einem Becherglas mit H_2O gekocht, gefiltert, trocknen gelassen und anschließend das Trockengewicht bestimmt.

3.3.14 Quantitative photometrische Wasserstoffperoxid-Abbaurate

Zur quantitativen Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Abbaurate erfolgte eine photometrische Messung. Dabei kamen Kristallglasküvetten mit einem Gesamtvolumen von 1 ml zum Einsatz. Der Wasserstoffperoxid-Abbau wurde bei 240 nm in Intervallen von 2 sec über einen Zeitraum von 2 min gemessen. Zunächst wurde die Küvetten mit 300 µl 0,01 M Kaliumphosphatpuffer befüllt und 100 µl einer 300 mM H_2O_2-Lösung (gelöst in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0) zugegeben. Nachdem sich eine konstante Absorption eingestellt hatte, wurden 100 µl einer Proteinlösung (Gesamtproteinextrakte) zugegeben. Diese hatte eine Konzentration von 1 µg/µl Protein gelöst in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer. Alternativ konnte die Wasserstoffperoxid-Abbaurate von 50 µg isolierten Mitochondrien (Isolation über Saccharosegradient), gelöst in 50 µl Kaliumphosphatpuffer pH 8,0, gemessen werden. Die Abbaurate errechnete sich aus der Absorptionsabnahme bei 240 nm pro Zeit und der eingesetzten Proteinmenge. Da die verwendete Proteinmenge in allen Ansätzen konstant war, konnte dieser Faktor vernachlässigt

werden (Wasserstoffperoxid-Abbaurate $= \Delta \frac{240\ \mathrm{nm}}{\mathrm{min}}$). Die Absorptionsabnahme bei 240 nm pro Zeit wurde aus dem linearen Bereich der Absorptionsabnahme nach Zugabe der Proteinlösung errechnet. Die Absorptionsabnahme musste von jeder Probe durch drei unabhängige Messungen ermittelt werden.

3.3.15 Zweidimensionale- (2D-) Gelelektrophorese

Zur isoelektrischen Fokussierung wurden 7 cm lange immobilisierte pH-Gradienten-Streifen („ReadyStrip“, IPG-Streifen, pH 3 - 10, nicht linear) von BioRad nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 450 µg Proteinextrakte (jeweils gepoolt aus vier verschiedenen Individuen desselben Stammes) in 95 µl IEF-Puffer gelöst. Diese Proteinlösung musste zur Rehydrierung des IPG-Streifen in eine Fokussierungsschale pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten darauf gelegt werden bis das Volumen von dem Gelstreifen aufgenommen war. Im Folgenden wurden 30 µl IEF-Puffer unter den Gelstreifen gegeben und es erfolgte eine weitere Inkubation bis das Volumen aufgesogen war. Nach der Rehydrierung war das Proteingemisch gleichmäßig im Gel des IPG-Streifens verteilt. Es folgte die isoelektrische Fokussierung (Protean IEF cell, BioRad). Zunächst wurden die Elektroden mit in 5 µl H_2O getränkten Filterpapierstücken bedeckt, um den Kontakt zwischen Gel und Elektrode zu gewährleisten. Der rehydrierte IPG-Streifen wurden nun mit der Gelseite nach unten auf die Filterpapierstücke gelegt. Dabei war es wichtig auf die Orientierung zu achten: Niedriger pH zu „+“ und hoher pH zu „-“. Zur Vermeidung einer Austrocknung oder Oxidation während der Fokussierung wurde der IPG-Streifen mit 1,5 ml Mineralöl überschichtet. Für die Fokussierung der Proteine wurde eine Stromstärke von 50 µA je IPG-Streifen und folgendes Programm verwendet: Die Fokussierung verlief für 15 min bei 250 V (schneller Spannungsanstieg). Dann erhöhte sich die Spannung für 1 h auf 4.000 V (linearer Spannungsanstieg). Schließlich wurde diese Spannung bis zum Erreichen von 20.000 Vh beibehalten. Die Temperatur betrug während der gesamten Fokussierung 20 °C. Nach der Fokussierung musste der Marker vorbereitet werden, indem 7 µl Proteinmarker (siehe Tabelle 6) auf ein Filterpapierstück geträufelt und dieses anschließend bei 60 °C getrocknet wurde. Zu Äquilibrierung der fokussierten Proteine wurde der IPG-Streifen zunächst für 15 min in Äquilibrierungspuffer mit 2 % DTT und anschließend für 15 min in Äquilibrierungspuffer mit 2,5 % Iodoacetamid inkubiert. Durch die erste Inkubation wurden Disulfidbindungen reduziert, wobei Thiol-Gruppen entstanden, durch die zweite Inkubation konnten die zuvor entstandenen Thiol-Gruppen alkyliert werden. Zudem wurden die Proteine durch das im Äquilibrierungspuffer enthaltene SDS denaturiert. Zur Auftrennung der Proteine in der zweiten Dimension wurde der IPG-Streifen auf ein 10 % iges denaturierendes Polyacrylamidgel (ohne Trenngel) gelegt. Daneben wurde ein vorbereitetes Filterpapier mit Proteinmarker platziert. Um IPG-Streifen und Filterpapier dort zu fixieren, konnten sie mit Überschichtungslösung für IPG-Streifen, angefärbt mit 2 % iger Bromphenolblaulösung, fixiert werden. Nachdem die Lösung ausgehärtet war, wurde die Elektrophorese im Elektrophorese-System „Mini-Protean® II“ (BioRad) gestartet. Letztere

verlief bei 200 V bis zum Austreten der Bromphenolblau-Front aus dem Gel. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt.

3.3.16 Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Die BN-PAGE dient der Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe. Dazu mussten 4 - 13 % ige Gradientengele (Trenngel) mit einem Gradientenmischer bei RT gegossen und nach der Polymerisation mit einem 3,5 % igen Sammelgel überschichtet werden (Tabelle 24).

Tabelle 24: Pipettierschema für ein 3,5 - 14 % iges blau-natives Polyacrylamidgele.

Komponente	Trenngel (4 %)	Trenngel (13 %)	Sammelgel (3,5 %)
86 % Glycerin	-	2,96 g	-
30 % Acrylamid	1,92 ml	713,6 ml	1,7 ml
40 % Acrylamid/ Bisacrylamid (29 : 1)	-	4,28 ml	-
2 % Bisacrylamid	889 µl	-	787,5 µl
3 x BNP-Puffer	4,94 ml	4,94 ml	5 ml
H_2O	7 ml	ad 15 ml	7,585 ml
10 % APS	68 µl	41 µl	119 µl
TEMED	6,8 µl	4,1 µl	11,9 µl

Bevor die mitochondrialen Proteinextrakte im Gel separiert werden konnten, mussten sie in 500 µl isotonischen Puffer gelöst, zentrifugiert (10 min, 15.000 Upm, 4 °C) und das mitochondriale Pellet mit einer Endkonzentration von 1 % Digitonin solubilisiert werden. Insgesamt wurden 100 µg Mitochondrienpellet pro Gelspur in 27 µl Solubilisierungspuffer mit Protease-Inhibitor Cocktail und 3 µl 10 % igem Digitonin gelöst, 30 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 15.000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand, der die solubilisierten Komplexe enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 3,5 µl 50 % igem Glycerin sowie 1,5 µl 5 % igem Coomassie versetzt, bevor das spülen der Geltaschen mit 1 x BNP-Puffer folgte. Anschließend wurden die mitochondrialen Proben sowie 7 µl eines nativen Markers (Tabelle 6) auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem „Protean® II“ Elektrophorese-System (BioRad) bei 4 °C. Als Kathodenpuffer wurde zuerst der Kathodenpuffer, versetzt mit 0,02 % Coomassie Blue G250, verwendet. Der Anodentank war die ganze Zeit mit 3 l Anodenpuffer befüllt. Die Auftrennung verlief für etwa 1,5 h bei 100 V und 10 mA je Gel. Sobald die Proben deutlich aus den Taschen gewandert waren, wurde die Spannung auf 500 V bei einer maximalen Stromstärke von 15 mA je Gel erhöht. Nachdem die Proben die Hälfte des Gels durchwandert hatten (etwa 2 h), wurde der Kathodenpuffer abgenommen und durch Kathodenpuffer, versetzt mit 0,002 % Coomassie Blue G250, ersetzt. Die Auftrennung konnte beendet werden, sobald die Coomassie-Front aus dem Gel austrat. Danach schloss sich die Coomassie-Färbung an. Dazu wurde das Gel nach dem Lauf kurz mit H_2O gespült und dann mehrere Stunden oder ü. N. in Görg-Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Das Entfärben erfolgte abwechselnd mit Görg-Coomassie-Entfärbelösung und H_2O. Zur Dokumentation wurde das Gel eingescannt.

3.4 *P. anserina*-spezifische Methoden

3.4.1 Kultivierung von *P. anserina*

Die Pilze wurden auf *P. anserina* synthetischem Medium (PASM) oder semi-synthetischem M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht angezogen. Um Kulturen eines bestimmten Alters zu erhalten wurde das Myzel frisch gekeimter Sporen auf einer Seite einer mit Medium gefüllten Petrischale platziert und die Wuchsfront alle 2 - 3 Tage markiert. Zur Lagerung von *P. anserina*-Stämmen wurden diese auf BMM-Platten angezogen und anschließend bei 4 °C gelagert.

3.4.2 Protoplastierung von Myzel

Für die Transformation von *P. anserina* musste zunächst die Zellwand des Pilzes partiell entfernt werden, um eine Aufnahme von Fremd-DNA zu ermöglichen. Die Protoplastierung des Myzels erfolgte mit Hilfe von Glucanex.

Zur Anzucht des zu transformierenden Pilzstammes wurden mehrere BMM-Platten (ohne Cellophan) mit je etwa 30 Myzelstückchen angeimpft. Nach zwei Tagen Wachstum bei 27 °C und Dauerlicht wurde das Myzel je einer Platte in einen Weithalskolben mit 200 ml CM-Medium überführt und für weitere zwei Tage bei 27 °C und Dauerlicht unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Myzel über zwei Lagen Mull abfiltriert, mit TPS-Puffer gespült und das Feuchtgewicht bestimmt. Pro g Myzel mussten 5 ml sterile Glucanexsuspension (20 mg/ml Glucanex in TPS) hergestellt und mit dem Myzel vermischt werden. Das Myzel-Glucanex-Gemisch wurde im Waring-Blendor (Waring) für 2 x 5 sec auf Stufe „low“ und für 2 x 5 sec auf Stufe „high“ zerkleinert, in einen Weithalskolben überführt und für 1,5 h bei 35 °C im Schüttelwasserbad inkubiert. Mittels einer mikroskopischen Kontrolle konnte der Fortschritt der Protoplastierung überprüft werden. Bei ausreichendem Fortschritt der Protoplastierung erfolgte das Abfiltern des Myzel-Glucanex-Gemisches über zwei Lagen Mull und durch einen Glaswolltrichter. Die filtrierte Lösung wurde in Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei RT und 4.000 Upm zentrifugiert. Das entstandene Protoplastenpellet wurde in 1 ml TPS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgten mehrere Waschschritte, um die Protoplastierung zu stoppen. Dafür wurde die Protoplastenlösungen abermals für 10 min bei RT und 4.000 Upm abzentrifugiert und das entstandene Protoplastenpellet erneut in 1 ml TPS resuspendiert. Dieser Vorgang musste insgesamt viermal durchgeführt werden. Nach dem letzten Waschschritt wurde eine 1 : 100 Verdünnung der Protoplastenlösung hergestellt und die Anzahl der Protoplasten mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Die Protoplasten konnten direkt für eine Transformation eingesetzt oder in Portionen à $5 \cdot 10^7$ Protoplasten bei -80 °C eingefroren werden.

3.4.3 Transformation von Protoplasten

Pro Transformationsansatz wurden $1 \cdot 10^7$ Protoplasten in 200 µl STC aufgenommen und auf Eis gehalten. Für die Transformation wurden 10 µg der zu transformierenden DNA eingesetzt. Als

Positivkontrolle dienten 10 µg des Plasmids pAN7-1 (vermittelt Hygromycin-Resistenz) und als Negativkontrolle 10 µg des Plasmids phph-1 (vermittelt keine Resistenz). Alle drei Ansätze wurden mit sterilem H_2O auf 40 µl aufgefüllt. Die Regenerationskontrolle enthielt lediglich 40 µl Wasser und diente zur Überprüfung der Regenerationsfähigkeit der Protoplasten.
Nach Zugabe der DNA bzw. des Wassers zu den Protoplasten wurden die Transformationsansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe sowie vorsichtiges Mischen von 50 µl PEG zu jedem Ansatz. Anschließend wurden die Proben erneut für 20 min auf Eis inkubiert. Danach konnten die Ansätze in Polypropylen-Röhrchen überführt und je Ansatz insgesamt 2 ml PEG in 500 µl-Schritten zugegeben und vorsichtig gemischt werden. Dazwischen wurden die Proben jeweils auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 30 min auf Eis, für 10 min bei RT und die Zugabe von 4 ml STC zu jedem Ansatz sowie vorsichtiges Mischen. Nach diesen Schritten wurde ausplattiert: Die drei Transformationsansätze (eigentliche Transformation, Positivkontrolle, Negativkontrolle) wurden in Portionen à 800 µl in je 4 ml Überschichtungsmedium mit Hygromycin gegeben und auf Hygromycin-haltigen Platten ausplattiert. Von der Regenerationskontrolle wurden zwei Verdünnungsreihen angelegt (10^{-1} bis 10^{-6} in STC bzw. Wasser) und je Verdünnungsstufe 1 ml in 4 ml Überschichtungsmedium ohne Hygromycin auf Platten ohne Hygromycin verteilt. Nach vier Tagen Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht erfolgte die Auswertung der Regenerationskontrolle, wodurch die Regenerationsrate (% der Protoplasten, welche nach der Transformation noch über die Fähigkeit verfügen, Myzel zu bilden) der Protoplasten ermittelt wurde. Die Auswertung der Transformationsansätze erfolgte nach 14 Tagen. Die Transformationseffizienz wurde ermittelt (Anzahl Transformanten pro µg eingesetzter DNA) und putative positive Transformanten zur Sicherung auf BMM-Platten überimpft.

3.4.4 Regeneration von *P. anserina*

Zur Kreuzung von *P. anserina*-Stämmen wurde je ein kleines Myzelstück zweier Stämme mit unterschiedlichem Kreuzungstyp im Abstand von ca. 5 cm auf einer M2-Platte angeimpft und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Nach 10 - 14 Tagen erfolgte die Isolation gewachsener Fruchtkörper (Perithezien). Mit Hilfe einer Präpariernadel konnten die Perithezien geöffnet werden. Die Fruchtkörper beinhalten die für Ascomyceten typischen dikaryotischen Ascosporen. Normalerweise sind vier Sporen zu einem Ascus zusammengefasst. Selten kommt es jedoch vor, dass irreguläre Asci mit mehr als vier Sporen gebildet werden, die auch monokaryotische Sporen enthalten. Aus den einkernigen Sporen der irregulären Asci kann homokaryotisches Myzel entstehen, das genetisch stabil bleibt, da es allein keine Fruchtkörper ausbilden kann. Für die durchgeführten Analysen wurden irreguläre Asci isoliert und ausschließlich die daraus resultierenden monokaryotischen Sporen verwendet. Die einkernigen Sporen wurden auf BMM-Platten mit 60 mM Ammoniumazetat überführt. Diese wurden für drei Tage bei 27 °C und Dunkelheit inkubiert. Diese juvenilen Stämme wurden für weitergehende Analysen verwendet.

3.4.5 Herstellung von Doppelmutanten

Zur Herstellung von Doppelmutanten mussten zwei Individuen unterschiedlichen Genotyps und unterschiedlichen Kreuzungstyps auf einer M2-Platte angeimpft und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert werden. Zum Erhalt von Doppelmutanten wurden aus den Fruchtkörpern der Kreuzung dikaryotische Sporen isoliert. Die gekeimten Sporen wurden anschließend auf Selektionsmarker getestet (Deletionsstämme: Phleomycin-Resistenz; Überexpressionsstämme sowie Stämme mit GFP-Konstrukte: Hygromycin-Resistenz). Ein Ascus mit Doppelmutanten wurde dann erhalten, wenn zwei der vier gekeimten Sporen die jeweiligen Selektionsmarker trugen während die beiden verbleibenden Sporen gegenüber dem Selektionsmarker sensitiv waren.

3.4.6 Bestimmung von Wuchsraten und Lebensspannen

Die Wuchsraten verschiedener monokaryotischer *P. anserina*-Stämme auf M2-Medium (ggfs. mit Zusätzen) wurde nach vier Tagen bei 27 °C (Platten ohne Zusatz sowie Platten mit Paraquat, $MnSO_4$, Ascorbinsäure und N-Acetyl-L-Cystein: Inkubation bei Dauerlicht; Platten mit Wasserstoffperoxid: Inkubation in Dunkelheit) bestimmt.

Zur Analyse der Lebensspannen von monokaryotischen *P. anserina*-Stämmen wurden drei Tage alte, auf BMM mit Ammoniumazetat gekeimte Stämme, auf M2- bzw. PASM-Platten (ggfs. mit Zusätzen) angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C und Licht. Die Wuchsfront des Myzels wurde alle 2 - 3 Tage auf den Platten markiert. Kam es zu keinem linearen Wachstum mehr, so wurde der entsprechende Stamm für tot erklärt. Zur Analyse der Lebensspannen von *P. anserina*-Stämmen auf Medium mit Wasserstoffperoxid wurden die entsprechenden Platten im Dunkeln inkubiert, da Wasserstoffperoxid bei Lichteinwirkung zerfällt. Alle 3 - 4 Tage mussten neue Wasserstoffperoxid-Platten gegossen und ein kleines Stück der vordersten Wuchsfront jedes Stammes auf eine neue Platte überführt werden.

3.4.7 Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes auf Platte (DAB-Färbung)

Zum Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes auf Platten wurden Petrischalen mit 30 ml M2-Medium gegossen und mit jeweils vier der zu testenden Stämme angeimpft. Diese wurden für 3 - 4 Tage bei 27 °C im Dunkeln angezogen, um die Pigmentierung zu verzögern. Anschließend wurden die bewachsenen Platten mit 5 ml DAB-Lösung überschichtet und 30 min bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Es folgte das Abgießen der Lösung sowie eine weitere Inkubation bei 27 °C im Dunkeln für 3 h bevor die Ergebnisse dokumentiert wurden.

3.4.8 Bestimmung der Fertilität

Zur Bestimmung der Fertilität wurde der zu untersuchende Stamm in der Mitte einer Platte (M2-Medium bzw. M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$) und ein Wildtyp mit entgegengesetztem Kreuzungstyp auf einer anderen Platte (M2-Medium bzw. M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$) angeimpft und für sieben Tage bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Anschließend wurden 5 ml

steriles H_2O auf eine Platte mit Myzel gegeben und leicht geschwenkt, um die Spermatien abzuschwemmen. Je 200 µl der Spermatienlösung wurden in je einem Tropfen auf das Myzel gegensätzlichen Kreuzungstyps pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurde der Tropfen vorsichtig abgenommen und die Platte erneut für sieben Tage bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Anschließend konnte die Zahl gebildeter Perithezien ausgezählt und ins Verhältnis zu einer Spermatisierung zweier kompatibler Wildtypen gesetzt werden.

3.4.9 Konfokale Laserscan Mikroskopie von *P. anserina*-Stämmen

Die zu untersuchenden Stämme wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit M2-Agar (ggfs. mit Zusätzen) gefüllt war, für einen Tage in einer Feuchtekammer bei 27 °C und Licht angezogen. Zum Anfärben von Mitochondrien wurden die Hyphen mit einer Mito Tracker Red-Lösung (1 : 2.000 Verdünnung) überschichtet. Nach einer kurzen Inkubation musste ein Deckglas auf den Muldenobjektträger gelegt, überschüssige Färbelösung entfernt und die Proben mikroskopiert (Leica TCS SP5) werden.

3.4.10 Sauerstoffverbrauchsmessungen

Die Messung des Sauerstoffverbrauchs wurde mit dem Respirometer Oxygraph-2k (Oroboros) durchgeführt. Dazu musste je eine Platten mit M2-Medium bzw. M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$ mit Cellophanfolie überschichtet und etwa 20 Myzelstückchen des zu untersuchenden Stammes darauf verteilt werden. Nach drei Tagen Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht wurde das Myzel in CM-Medium bzw. CM-Medium mit 80 µM $MnSO_4$ überführt und für weitere drei Tage schüttelnd bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Vor Beginn jeder Messung mussten die beiden Messkammern mit flüssigem CM-Medium befüllt und mit Sauerstoff gesättigt werden. Die Messungen erfolgten bei 27 °C. Daraufhin wurde je ein Myzelstück in eine Messkammer überführt, die Kammer verschlossen und der Sauerstoffverbrauch analysiert. Nach Beendigung der Messung musste das Myzelstück aus der Kammer abgekocht, filtriert, trocknen gelassen und anschließend das Trockengewicht bestimmt werden, um den Sauerstoffverbrauch mit dem Trockengewicht des untersuchten Myzelstücks verrechnen zu können.

Zur Ermittlung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs der alternativen Oxidase (AOX) und der Cytochrom c-Oxidase (COX) konnten die Inhibitoren SHAM (Inhibitor der AOX) und KCN (Inhibitor der COX) verwendet werden. Es wurde je ein Myzelstück in eine Kammer gegeben, diese luftdicht verschlossen und die Messung gestartet. Wenn sich ein konstanter Sauerstoffverbrauch eingestellt hatte, wurden 20 µl einer 100 mM KCN-Stammlösung zugegeben. Nachdem sich erneut ein konstanter Sauerstoffverbrauch eingestellt hatte, folgte die Zugabe von 80 µl einer 100 mM SHAM-Stammlösung. Sobald sich wiederholt ein konstanter Sauerstoffverbrauch zeigte, wurde die Messung beendet. Diese Inhibierung musste auch in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden. Die Auswertung der erhaltenen Messdaten erfolgte mit dem Programm DatLab 4 (Oroboros).

3.4.11 Durchführung der Transkriptomanalyse

Für die Erstellung der Transkriptomanalyse wurde isolierte Gesamt-RNA (siehe 3.2.2, Isolation durchgeführt von Frau Werner, AK Osiewacz) von fünf bzw. 17 Tage alten Wildtypen und Δ*PaSod3*-Stämmen eingesetzt (für jeden Stamm und jeden Zeitpunkt n = 3). Die Sequenzierung erfolgte mittels einer Illumina HiSeq2000 Sequenzierplattform bei der Firma LGC Genomics (Berlin). Herr Gupta aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thines (Biodiversität und Klima Forschungszentrum Frankfurt) ordnete jedem erhaltenen Transkript anhand der *P. anserina*-Genombank (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) ein Gen zu. Die Zuordnung erfolgte mit der Bowtie2-Software mit voreingestellten Parametern (Langmead et al. 2009). Die Ergebnisse der Bowtie2-Software, eine Datei im SAM-Format, wurden in ein geordnetes BAM-Dateiformat umgewandelt (Li et al. 2009). Die relative Expression jedes Gens wurde anhand der BAM-Daten mit folgender Formel berechnet:

$$\text{relative Expression} = \frac{\frac{\sum_1^n \text{Cov(X)}}{n}}{\frac{(M-m)}{(N-n)}}$$

Cov(X) = Abdeckung pro Base des Gens von Interesse (X), M = Anzahl der Basen, die allen Genen zugeordnet wurden, m = Anzahl der Basen, die dem Gen von Interesse zugeordnet wurden, N = Anzahl aller Basen in allen Genen, n = Anzahl der Basen in dem Gen von Interesse

Der Expressionswert für jedes Gen wurde berechnet, indem die durchschnittliche Abdeckung eines Gens durch die Gesamtzahl aller Basen des entsprechenden Gens geteilt wurde. Die durchschnittliche Abdeckung eines Gens errechnet sich, indem die Summe aus der Abdeckung aller Basen eines Gens durch die Länge des jeweiligen Gens geteilt wurde.

3.5 *S. cerevisiae*-spezifische Methoden

3.5.1 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme wurden auf YPD-Platten (Wildstamme, *ScSod*-Deletionsmutanten) bzw. auf Selektionsmedium (*ScSod*-Überexpressionsstämme) ausgestrichen und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend konnten sie bei 4 °C gelagert werden. Alle 2 - 3 Wochen mussten neue Ausstriche angefertigt werden. Zusätzlich erfolgte die Herstellung von Gefrierkulturen, indem die Stämme ü. N. in YPD-Flüssigmedium (30 °C, 220 Upm) angezogen, am Folgetag mit 40 % igem Glycerin im Verhältnis 1 : 1 gemischt und in sterile Schraubdeckelgefäße überführt wurden. Alternativ konnten Glycerinkulturen auch mit Kulturen von Platte hergestellt werden. Dazu wurde möglichst viel Zellmaterial von der jeweiligen Platte in ein 40 % Glycerin enthaltendes Schraubdeckelgefäße transferiert. Die Gefrierkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

3.6 *E. coli*-spezifische Methoden

3.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium schüttelnd (180 Upm) oder auf LB-Festmedium bei 37 °C angezogen. Bei Bedarf erfolgte die Zugabe von Selektionsmarkern. Gefrierkulturen wurden durch die 1 : 1 Mischung von ü. N. Kulturen in LB-Flüssigmedium mit 40 % Glycerin in Schraubdeckelgefäßen erstellt. Diese wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie des Stammes in einer 5 ml Vorkultur angeimpft und mehrere Stunden bei 180 Upm und 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur in eine Hauptkultur (150 ml) überimpft und ü. N. bei 37 °C und 180 Upm angezogen.

4. Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorliegenden Doktorarbeit war die in einer vorangegangenen Arbeit vermutete gemeinsame Regulation von PaSOD-Aktivitäten, basierend auf der Beobachtung von Sandra Zintel, dass *PaSod2*_OEx-Stämme eine gesteigerte PaSOD1-Aktivität aufweisen (Zintel 2012). Da die Beeinflussung der Aktivität einer PaSOD, ohne vorangehende genetische Manipulation des entsprechenden Gens, die Interpretation von Ergebnissen in den *PaSod*-Mutanten deutlich erschweren würde, sollte (I) die mutmaßliche gemeinsame Regulation der PaSODs analysiert werden. Darüber hinaus ergab sich aus Befunden aus anderen Organismen, dass es (II) in *P. anserina* weitere bisher unentdeckte putative *PaSods* geben könnte. Ein entsprechendes Enzym mit SOD-Aktivität müsste in das ROS-Detoxifizierungsnetzwerk von *P. anserina* integriert werden, um mögliche Fehlschlüsse zu vermeiden. Schließlich ging es (III) um die vertiefende Charakterisierung der *PaSod3*-Stämme, die eine Modifikation des Gens tragen, welches für die einzige bekannte mitochondrial lokalisierte SOD kodiert. Im speziellen sollte dabei (IV) der Einfluss von Mangan auf das Detoxifizierungsnetzwerk in *PaSod3*-Stämmen untersucht werden.

4.1 Co-Regulation der Superoxid-Dismutasen

Seit der Postulierung der „freien Radikal-Theorie des Alterns“ (Harman 1956), welche die negativen Wirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies für den Alterungsprozess verantwortlich macht, wird den ROS-detoxifizierenden Enzymen eine wichtige Rolle bei dem Schutz vor einem frühzeitigen Altern zugeordnet. Die erste Detoxifizierungsreaktion, die Umwandlung von Superoxid, welches als primär entstehende ROS gilt, wird von Superoxid-Dismutasen katalysiert. Da die SODs eine sehr wichtige Aufgabe bei der Entgiftung von Superoxid spielen, sind sie Ziel intensiver Forschung.

Seit den 1990er Jahren werden die Superoxid-Dismutasen in dem Ascomyceten *Podospora anserina* untersucht. Zunächst waren nur die cytoplasmatische Cu/ZnSOD (PaSOD1) sowie eine MnSOD (PaSOD2) bekannt, welche in den Mitochondrien vermutet wurde (Borghouts et al. 2001, Borghouts et al. 2002). Nach Veröffentlichung des vollständig sequenzierten Genoms von *P. anserina* wurde eine weitere SOD, PaSOD3, entdeckt und fortan untersucht (Schwitalla 2007, Zintel 2012). Es stellte sich heraus, dass, entgegen der ersten Annahme, PaSOD2 sekretiert wird und PaSOD3 die mitochondriale MnSOD in *P. anserina* darstellt (Zintel et al. 2010). Seither werden die drei PaSODs mithilfe von entsprechenden Deletions- und Überexpressionsstämmen charakterisiert (Zintel 2012, Zintel et al. 2010).

Eine Publikation von Lambou und Kollegen, welche sich mit insgesamt vier in dem Pilz *Aspergillus fumigatus* vorhergesagten SODs beschäftigt (Lambou et al. 2010), initiierte eine neue, genauere Domänensuche in dem Proteom von *P. anserina*. Diese Analyse lieferte

Hinweise darauf, dass *Pa_1_10620* eine bisher unentdeckte putative SOD kodieren könnte, die hohe Homologien zu AfSOD4 aufweist (persönliche Mitteilung Frau Dr. Hamann, AK Osiewacz). Die systematische Suche nach Gen-Ontologien (GOs) in dem Genom von *P. anserina* (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) deutete darauf hin, dass zwei weitere putative *PaSod*-Gene, *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300*, vorliegen könnten. Eine schematische Darstellung der Domänenanordnungen und der Proteingrößen der bestätigten sowie putativen Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* ist in Abbildung 5 dargestellt.

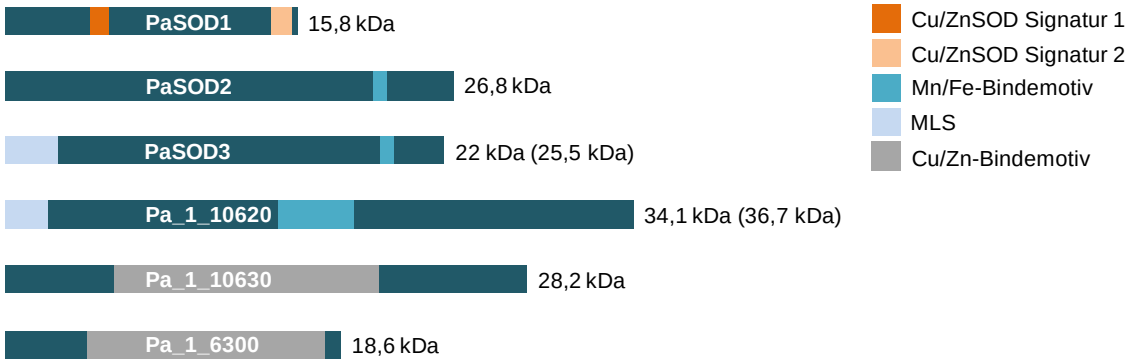


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der (putativen) Superoxid-Dismutasen in *P. anserina*. PaSOD1, überwiegend im Cytoplasma und in geringen Mengen im mitochondrialen Intermembranraum zu finden, ist durch zwei Cu/Zn-Bindemotive charakterisiert. PaSOD2, PaSOD3 und Pa_1_10620 tragen je ein Mn/Fe-Bindemotiv. PaSOD3 und Pa_1_10620 weisen außerdem eine N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS) auf, welche durch Sequenzanalysen (MitoProtII, Claros und Vincens 2004) ermittelt wurden. Pa_1_10630 und Pa_1_6300 stellen zwei putative SODs dar, die jeweils ein großes Cu/Zn-Bindemotiv enthalten. Das Molekulargewicht der prozessierten Proteine ist jeweils rechts angegeben. In Klammern ist das Molekulargewicht der Proteine inklusive MLS aufgeführt.

Bei den in *P. anserina* bekannten SODs handelt es sich um PaSOD1, die einzige bestätigte Superoxid-Dismutase mit einem Kupfer/Zink-Bindemotiv und einem Molekulargewicht von 15,8 kDa. PaSOD2, PaSOD3 und Pa_1_10620 tragen jeweils ein Mangan/Eisen-Bindemotiv, wobei PaSOD2 sowie PaSOD3 bestätigte SODs sind und Pa_1_10620 eine putative SOD darstellt. Zudem ergaben Sequenzanalysen, dass PaSOD3 und Pa_1_10620 eine mitochondriale Lokalisationssequenz (MLS) enthalten. Für beide Proteine wurde diese vorhergesagte Lokalisation experimentell bestätigt (Böhl 2013, Grimm et al. 2015, Zintel et al. 2010). PaSOD2 (26,8 kDa) und PaSOD3 (25,5 kDa mit MLS bzw. 22 kDa ohne MLS) weisen ein deutlich geringeres Molekulargewicht als Pa_1_10620 (36,7 kDa mit MLS bzw. 34,1 kDa ohne MLS) auf. Die putativen Cu/ZnSODs Pa_1_10630 und Pa_1_6300 tragen jeweils ein großes Cu/Zn-Bindemotiv und entsprechen mit ihrem Molekulargewicht von 28,2 kDa sowie 18,6 kDa etwa dem von PaSOD2 bzw. PaSOD1.

4.1.1 Analyse der PaSOD-Proteinmengen in *PaSod*-Mutantenstämmen

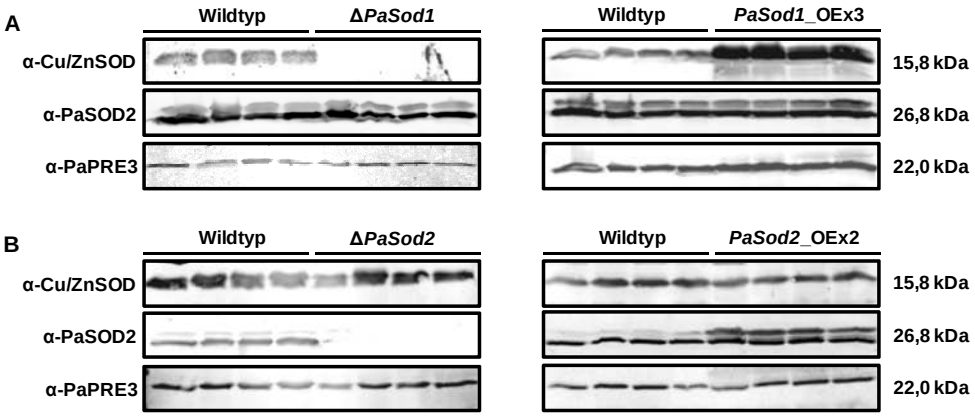
Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte die Rolle der SODs in *P. anserina* genauer analysiert werden. Die Dissertation von Frau Zintel (2012), welche sich bereits mit der Charakterisierung der SODs PaSOD1-3 beschäftigte, lieferte Hinweise auf eine mögliche Co-Regulation von PaSOD-Aktivität in genetisch modifizierten Stämmen. Da eine solche

gemeinsame Regulation in den *PaSod*-Mutanten die Interpretation von Ergebnissen erschweren würde, sollte in der vorliegenden Arbeit eine putative Co-Regulation der PaSODs systematisch untersucht werden. Dazu wurden alle vorhandenen *PaSod*-Mutantenstämme (Δ*PaSod1*, *PaSod1*_OEx1/2/3, Δ*PaSod2*, *PaSod2*_OEx1/2/4, Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1/3) (Schwitalla 2007, Zintel 2012) auf ihre PaSOD-Proteinmengen und -Aktivitäten hin analysiert. Zur Bestimmung der Proteinmengen von PaSOD1, PaSOD2 sowie der Ladekontrolle PaPRE3 wurden Western Blot-Analysen unter Verwendung von Gesamtproteinextrakten durchgeführt. Für PaSOD3 und die entsprechende Ladekontrolle PaPOR (Porin) wurden isolierte mitochondriale Proteinextrakte verwendet. In Abbildung 6 sind exemplarisch repräsentative Western Blots der unterschiedlichen *PaSod*-Mutantenstämme dargestellt. Die Gesamtheit der Western Blot-Analysen aller Mutantenstämme und deren Quantifizierung ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Eine Übersicht der exakten Zahlen der Quantifizierung ist Tabelle S30 im Anhang zu entnehmen.

> Bei der Ladekontrolle für Gesamtproteinextrakte, PaPRE3, handelt es sich um die ß1-Untereinheit des Proteasoms, welche im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist und eine Größe von etwa 22 kDa aufweist. Die für mitochondriale Proteinextrakte verwendete Kontrolle PaPOR ist ein Protein von etwa 32 kDa, welches in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist.

Die Quantifizierung der mit allen *PaSod*-Mutantenstämmen durchgeführten Western Blot-Analysen im Vergleich zum Wildtyp in Abbildung 7 zeigt, dass in den Deletionsstämmen Δ*PaSod1*, Δ*PaSod2* und Δ*PaSod3* das von dem jeweiligen Gen kodierte Protein nicht mehr nachweisbar ist. Ferner zeigen *PaSod1*_OEx-, *PaSod2*_OEx- und *PaSod3*_OEx-Stämme, dass das eingebrachte Überexpressionskonstrukt der jeweiligen *PaSod* auch in einer signifikant erhöhten Proteinmenge des entsprechenden Proteins resultiert. Neben den durch genetische Manipulation bedingten Veränderungen der Proteinmengen war in den Δ*PaSod3*-Stämmen eine erhöhte PaSOD1- und eine verringerte PaSOD2-Proteinmenge nachweisbar (Abbildung 6 C und Abbildung 7).

Folglich wurde durch die Western Blot-Analysen gezeigt, dass offenbar ein Zusammenhang zwischen der genetischen Manipulation einer *PaSod* und der Steigerung bzw. Abnahme der Proteinmenge einer anderen PaSOD – also eine Co-Regulation der PaSODs – existiert.



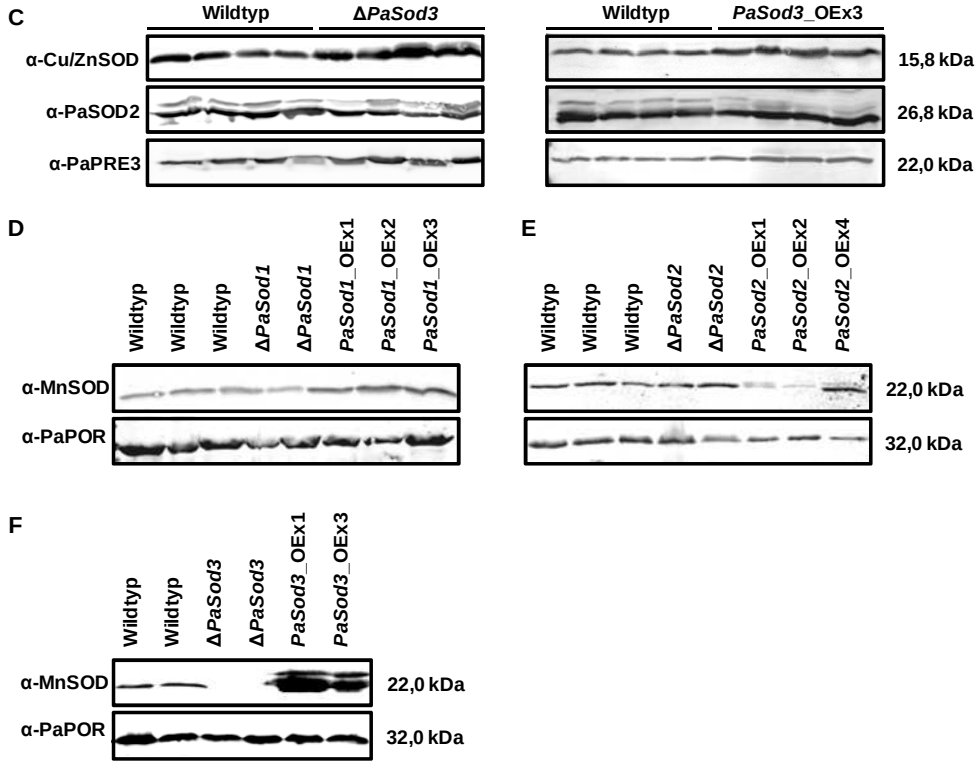


Abbildung 6: Western Blot-Analysen vom Wildtyp und *PaSod*-Mutantenstämmen. Exemplarische Darstellung von Western Blot-Analysen des Wildtyps und verschiedener *PaSod*-Mutantenstämme. **A - C:** Auftrennung von jeweils 100 µg Gesamtproteinextrakten (α-Cu/ZnSOD, α-PaSOD2, α-PaPRE3) bzw. **D - F:** 100 µg mitochondrialen Proteinextrakten (α-MnSOD, α-PaPOR) in 16 % igen SDS-Polyacrylamidgelen. Die separierten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Ladekontrollen dienten die Antikörper α-PaPRE3 für Gesamtproteinextrakte bzw. α-PaPOR für mitochondriale Proteinextrakte. Die verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite, die Größen der jeweils detektierten Proteine auf der rechten Seite aufgeführt.

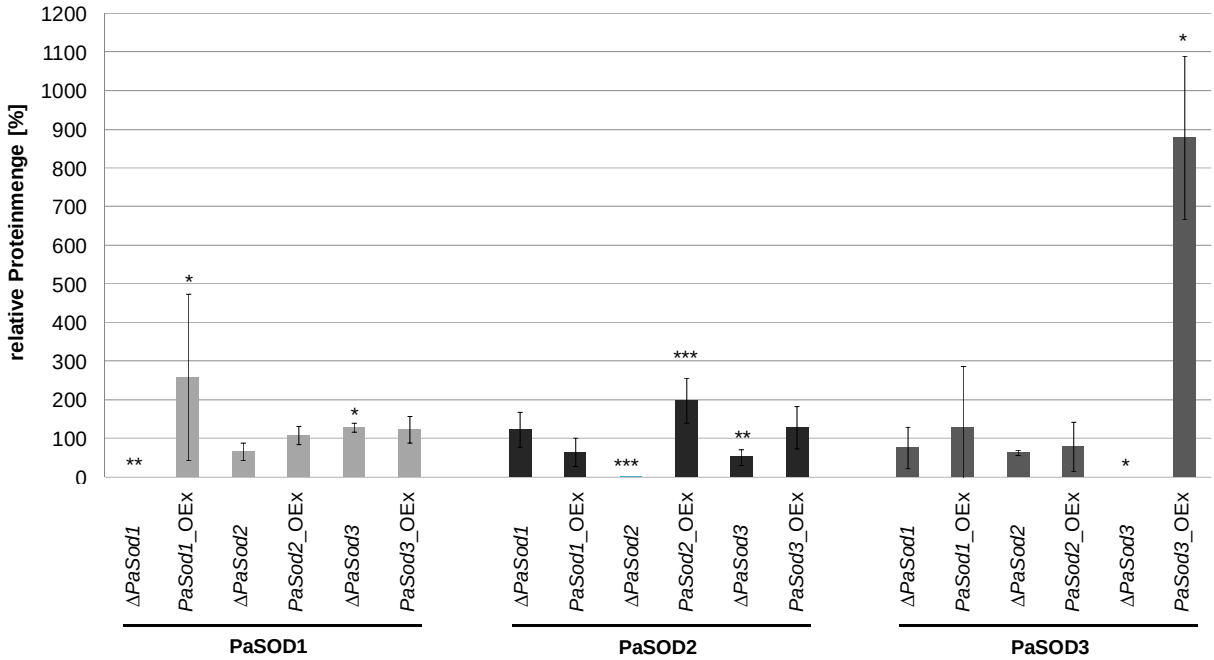


Abbildung 7: Quantifizierung der PaSOD-Mengen des Wildtyps und der *PaSod*-Mutantenstämme. Quantitative Auswertung der PaSOD-Proteinmengen aus Gesamtproteinextrakten (PaSOD1, PaSOD2) bzw. mitochondrialen Proteinextrakten (PaSOD3) des Wildtyp und der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme (Δ*PaSod1*, *PaSod1*_OEx1, *PaSod1*_OEx2, *PaSod1*_OEx3, Δ*PaSod2*, *PaSod2*_OEx1, *PaSod2*_OEx2, *PaSod2*_OEx4, Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1, *PaSod3*_OEx3) (Gesamtproteinextrakte: je Stamm n = 4, mitochondriale Extrakte: je Stamm n = 2 - 3). Die jeweiligen Überexpressionsstämme einer *PaSod* wurden zur Erstellung der Grafik zusammengefasst. Der Wildtyp wurde für die PaSOD1/2/3-Proteinmengen jeweils auf 100 %

gesetzt und die verbleibenden Stämme relativ dazu berechnet. Als Ladekontrolle diente PaPRE3 für Gesamtproteinextrakte und PaPOR für mitochondriale Proteinextrakte. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$). Ferner sind die jeweiligen Standardabweichungen eingezeichnet.

4.1.2 Untersuchung der PaSOD-Aktivitäten in *PaSod*-Mutantenstämmen

Da es nicht möglich ist, von der Proteinmenge einen direkten Schluss auf die Aktivität eines Enzymes zu ziehen, mussten die PaSOD-Aktivitäten in den verschiedenen *PaSod*-Mutanten mittels „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen untersucht werden, um auch eine mögliche gemeinsame Regulation auf Aktivitätsebene detektieren zu können. Dabei wurden PaSOD1- sowie PaSOD2-Aktivitäten in Gesamtproteinextrakten (Abbildung 8 A und B) und PaSOD3-Aktivitäten in mitochondrialen Proteinextrakten (Abbildung 8 C) nachgewiesen. Repräsentative SOD-Aktivitätsgele des Wildtyps sowie der unterschiedlichen Mutantenstämme sind in Abbildung 8 dargestellt. Diese deuten auf gemeinsame Regulationen hin. Es konnte etwa eine verringerte PaSOD1-Aktivität in Δ*PaSod2*-Stämmen nachgewiesen werden (Abbildung 8 A, rechtes Gel). Die Überexpression von *PaSod3* resultierte hingegen in einer gesteigerten SOD-Aktivität auf Höhe der erwarteten PaSOD1-Bande (Abbildung 8 B, rechtes Gel). Dies ist vermutlich auf eine gesteigerte PaSOD1-Aktivität zurückzuführen. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei auch um das Protein der überexprimierten *PaSod3* handelt, welches im nativen Gel eine ähnliche Migration wie PaSOD1 aufweisen könnte. Die auffälligste gemeinsame Regulation schien zwischen der PaSOD1-Aktivität in *PaSod2*_OEx-Stämmen zu bestehen: Hier kam es zu einer immensen PaSOD1-Aktivitätssteigerung (Abbildung 8 B, linkes Gel). Um zu verifizieren, dass es sich bei dieser als PaSOD1 identifizierten Bande tatsächlich ausschließlich um PaSOD1 und nicht beispielsweise um unprozessierte PaSOD2 handelt, wurde das native Gel vor der Aktivitätsfärbung in Kaliumphosphatpuffer mit 5 mM Wasserstoffperoxid inkubiert. Auf diese Weise werden selektiv Cu/ZnSODs, also in *P. anserina* lediglich PaSOD1, inaktiviert (Troxell et al. 2012) (Daten nicht gezeigt). Dieser Versuch ergab, dass nur ein geringer Teil der oberen Aktivitätsbande, welche bisher PaSOD1 zugeordnet wurde, auch auf dieses Enzym zurückzuführen war. Aus diesem Grund wurde im Folgenden ein Δ*PaSod1*_*PaSod2*_OEx2-Stamm hergestellt (Anhang Abbildung S43) und mit diesem wurden erneut „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen durchgeführt (Abbildung 9 A).

Durch die SOD-Aktivitätsfärbung von zwei Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Stämmen im Vergleich zu *PaSod2*_OEx2-Stämmen wurde deutlich, dass nicht die gesamte obere Bande auf PaSOD1 zurückzuführen war. Lediglich der untere Bereich dieser farblosen Bande, welcher bei den Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Stämmen nicht mehr sichtbar wurde, entsprach der PaSOD1-Aktivität (Abbildung 9 A, Bereich auf Höhe des Pfeils). Somit ist nur ein Teil des zuvor als PaSOD1-Aktivitätsbande identifizierten Bereiches tatsächlich auf PaSOD1 zurückzuführen und insgesamt ist in *PaSod2*_OEx2-Stämmen keine gesteigerte PaSOD1-Aktivität detektierbar.

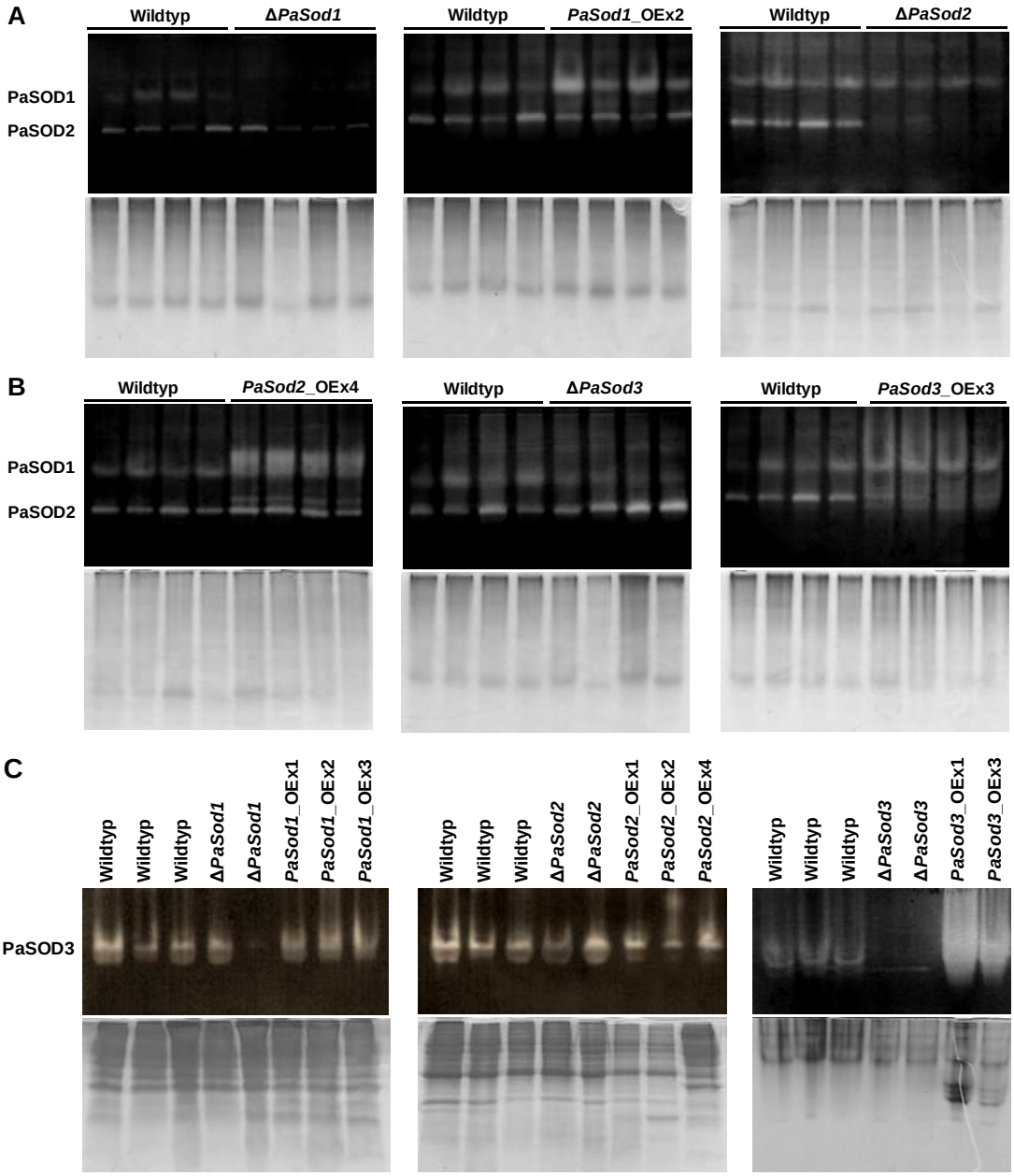


Abbildung 8: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp und *PaSod*-Mutanten. Exemplarische Darstellung von „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen verschiedener Stämme. **A und B:** Der Nachweis von PaSOD1- und PaSOD2-Aktivitäten erfolgte anhand von Gesamtproteinextrakten des Wildtyps, sowie von *PaSod1*-, *PaSod2*- und *PaSod3*-Deletionsstämmen. Ferner sind repräsentative Aktivitätsgele von *PaSod1*_OEx2-, *PaSod2*_OEx4- und *PaSod3*_OEx3-Stämmen abgebildet. Es wurden je 100 µg Gesamtproteinextrakte auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend entweder einer „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung unterzogen oder als Kontrolle mit Coomassie gefärbt. **C:** Nachweis der PaSOD3-Aktivitäten unter Verwendung von je 100 µg mitochondrialen Proteinextrakten vom Wildtyp sowie von *PaSod1*-, *PaSod2*- und *PaSod3*-Mutantenstämmen. Die Auftrennung der nativen Proteine erfolgte auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen. Anschließend wurde ein Gel der SOD-Aktivitätsfärbung unterzogen, das zweite Gel diente als Kontrolle und wurde mit Coomassie gefärbt.

Zur Klärung, ob die in Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Stämmen verbleibende obere Aktivitätsbande auf PaSOD2 zurückzuführen ist, wurden Gesamtproteinextrakte dieser Stämme auf zwei nativen Gelen aufgetrennt. Anschließend konnte ein Gel der SOD-Aktivitätsfärbung unterzogen werden (Abbildung 9 A). Aus dem verbleibenden zweiten, nicht gefärbten Gel, musste ein Fragment auf Höhe der bisher PaSOD1 zugeordneten Bande ausgeschnitten und die darin enthaltenen

Proteine eluiert werden. Diese eluierten Proteine wurden auf einem denaturierenden Gel aufgetrennt und mit einem polyklonalen Antikörper, gerichtet gegen PaSOD2, detektiert (Abbildung 9 B). Die obere Aktivitätsbande in Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Stämmen ist also auf PaSOD2 zurückzuführen. Somit war keine erhöhte PaSOD1-Aktivität in Abhängigkeit von der Überexpression von *PaSod2* nachweisbar. Ferner zeigte dieses Ergebnis, dass die erhöhte Expression einer *PaSod* das Laufverhalten des entsprechenden Proteins im nativen Gel verändern kann.

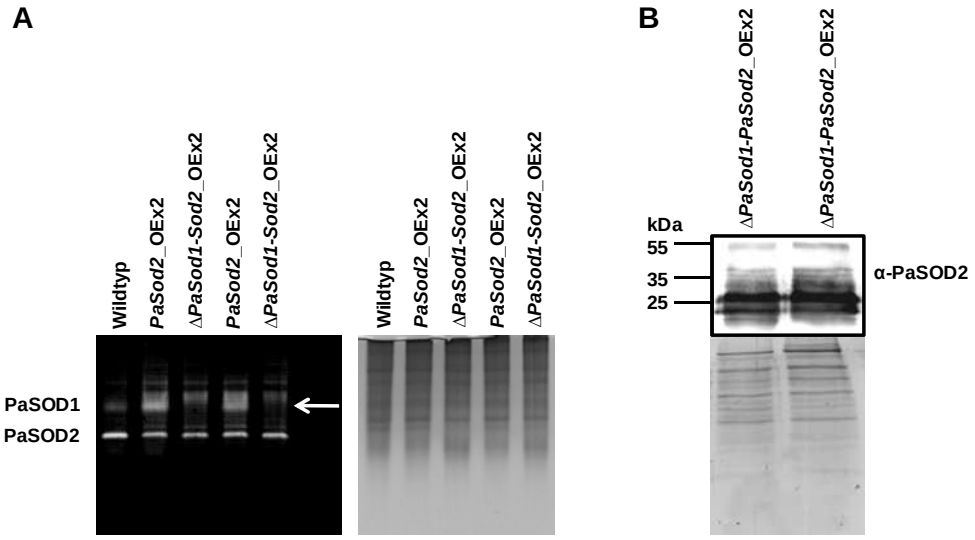


Abbildung 9: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung und Western Blot-Analyse vom Wildtyp sowie *PaSod2*_OEx-Mutanten. A: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung. Je 100 µg Gesamtproteinextrakte von zwei *PaSod2*_OEx2-Stämmen und zwei Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Doppelmutanten wurden in zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt bevor sich für ein Gel die „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung anschloss. Das zweite Gel wurde zur Kontrolle mit Coomassie gefärbt. **B:** Western Blot-Analyse. Auftrennung von je 100 µg Gesamtproteinextrakten von zwei Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx2-Stämmen in zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen. Ein Gel wurde für die SOD-Aktivitätsfärbung verwendet. Aus dem zweiten, ungefärbten, Gel konnte ein Gelstück auf Höhe der im gefärbten Gel entstandenen oberen Aktivitätsbande ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine eluiert werden. Letztere (etwa 8 µg je Spur) wurden auf einem 16 % igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch separiert. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem polyklonalen Antikörper, gerichtet gegen PaSOD2, detektiert. Als Kontrolle diente das mit Coomassie gefärbte Gel.

Insgesamt konnte keine direkte Korrelation zwischen veränderten PaSOD-Proteinmengen und -Aktivitäten gefunden werden. Eine gemeinsame Regulation von PaSODs auf Proteinebene wurde für den Δ*PaSod3*-Stamm nachgewiesen: Dieser zeigte eine gesteigerte PaSOD1- und eine reduzierte PaSOD2-Menge im Vergleich zum Wildtyp. Auf Aktivitätsebene wiesen Δ*PaSod2*-Stämmen eine verringerte PaSOD1-Aktivität und *PaSod3*_OEx-Stämme eine erhöhte PaSOD1-Aktivität auf. Somit konnte auch eine Co-Regulation auf Aktivitätsebene bestätigt werden. Die von Frau Zintel (Zintel 2012) und mir zunächst vermutete gemeinsame Regulation der PaSOD1-Aktivität in Abhängigkeit von der *PaSod2*-Überexpression war nicht auf eine Co-Regulation zurückzuführen. Ferner wurde gezeigt, dass nicht nur eine gemeinsame Regulation von PaSODs besteht, sondern, dass die genetische Modifikation einer *PaSod* auch zu einem veränderten Laufverhalten des entsprechenden Proteins führen kann.

4.1.3 Gemeinsame Regulation der ScSOD-Aktivitäten in *S. cerevisiae*

Die in *P. anserina* gefundene gemeinsame Regulation von SOD-Aktivitäten warf die Frage auf, ob dies ein *P. anserina*-spezifischer Effekt ist, oder ob eine gemeinsame Regulation auch in anderen Organismen vorliegt. Um dies experimentell zu untersuchen, wurde die Bäckerhefe *S. cerevisiae* verwendet. Im Vergleich zu *P. anserina* kodiert das Genom von *S. cerevisiae* nur für zwei SODs, welche beide nicht essentiell sind. Der schematische Aufbau der beiden entsprechenden Proteine ist Abbildung 10 zu entnehmen.

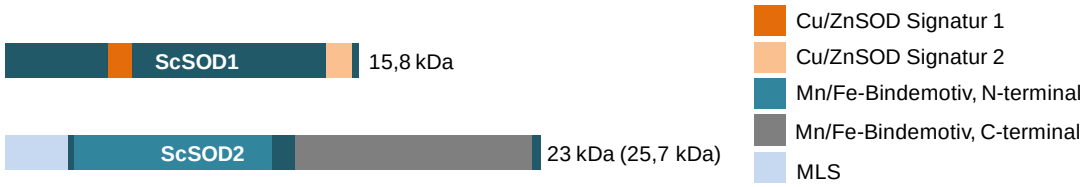


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der Superoxid-Dismutasen von *S. cerevisiae*. ScSOD1, überwiegend im Cytoplasma und in geringen Mengen im mitochondrialen Intermembranraum sowie im Zellkern zu finden, ist durch zwei Cu/Zn-Bindemotive charakterisiert. Bei ScSOD2 handelt es sich um eine MnSOD mit zwei großen Mn/Fe-Bindemotiven. Ferner weist ScSOD2 eine N-terminale MLS auf (MitoProtII, Claros und Vincens 2004). Das Molekulargewicht der prozessierten Proteine ist jeweils rechts angegeben. In Klammern ist das Molekulargewicht inklusive der MLS aufgeführt.

ScSOD1, eine homodimere Cu/ZnSOD, ist, ähnlich wie PaSOD1 (68 % Identität von PaSOD1 und ScSOD1), überwiegend cytoplasmatisch lokalisiert, wurde in geringen Mengen aber auch im Intermembranraum der Mitochondrien sowie im Zellkern gefunden (Bermingham-McDonogh et al. 1988, Gralla und Kosman 1992, Sturtz et al. 2001, Tsang et al. 2014). ScSOD2, die homotetramere Mangan-abhängige SOD, lokalisiert hingegen ausschließlich in den Mitochondrien (Ravindranath und Fridovich 1975) und entspricht somit der SOD3 von *P. anserina* (50 % Identität von PaSOD3 und ScSOD2).

Zur Untersuchung einer möglichen gemeinsamen Regulation der SOD-Aktivitäten in *S. cerevisiae* wurden sowohl Deletions- als auch Überexpressionsstämme der einzelnen *ScSods* untersucht. Die Deletionsstämme (Δ*ScSod1*, Δ*ScSod2*), welche von Herrn Prof. Dr. Reichert (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden, sind ursprünglich von Euroscarf (European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis, Frankfurt am Main) bezogen worden und tragen statt des jeweiligen Gens eine Kanamycin-Resistenzkassette. Vor Verwendung der erhaltenen Stämme mussten diese auf Richtigkeit überprüft werden (Anhang Abbildung S42). Die Überexpressionsstämme Sc*Sod1*_OEx und Sc*Sod2*_OEx, welche von Herrn Prof. Dr. Longo (Universität Südkalifornien, USA) zur Verfügung gestellt wurden, tragen jeweils ein Plasmid mit Mehrfachintegrationen der entsprechenden *ScSod*, was zu einer erhöhten SOD-Aktivität führt (Fabrizio und Longo 2003).

Für eine quantitative Analyse der SOD-Aktivitäten der *ScSod*-Mutantenstämme wurde eine *in vitro* Messung durchgeführt (Abbildung 11). Jedoch kann mittels dieser Messungen lediglich die Gesamt-SOD-Aktivität der eingesetzten Gesamtproteinextrakte ermittelt werden – zwischen den Aktivitäten einzelner in der verwendeten Proteinlösung vorliegenden SODs kann nicht differiert werden.

Zur quantitativen Bestimmung der *in vitro* SOD-Aktivität mit dem SOD-Aktivitäts-Kit wird das wasserlösliche Salz WST-1 (2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium) verwendet. Kommt es zu einer Reaktion von WST-1 mit zwei Superoxidanionen resultiert daraus das WST-1 Formazan, welches ein Absorptionsmaximum bei 450 nm aufweist. Die Reduktion von WST-1 durch zwei Superoxidanionen führt zu der Umwandlung der Superoxidanionen in Sauerstoffmoleküle. Letztere können durch die Xanthin-Oxidase wiederum in Superoxidanionen umgewandelt werden. Die Superoxidanionen können durch SODs detoxifiziert werden, und somit dem „Kreislauf" entzogen werden, oder reduzieren erneut WST-1. Folglich kann anhand der Absorptionsveränderung ein Rückschluss auf die SOD-Aktivität gezogen werden.

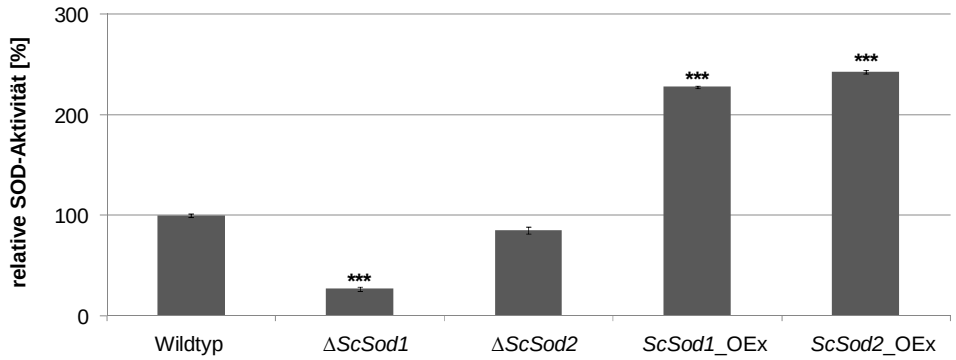


Abbildung 11: Darstellung der Gesamt-SOD-Aktivitäten von *S. cerevisiae*-Stämmen. Graphische Darstellung der relativen Gesamt-SOD-Aktivitäten des Wildtyps und der *ScSod*-Mutantenstämme, bestimmt mittels *in vitro* Messungen. Für die Messungen wurden Gesamtproteinextrakte der jeweiligen *S. cerevisiae*-Stämme (Wildtyp BY4742, Δ*ScSod1*, Δ*ScSod2*, Wildtyp EG103, *ScSod1*_OEx, *ScSod2*_OEx) eingesetzt (n = 3). Die SOD-Aktivitäten der beiden Wildtypen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Aktivitäten der verbleibenden Stämme relativ dazu berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (*** p ≤ 0,001). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler angegeben.

Aus der quantitativen Messung mittels SOD-Aktivitäts-Kit (Abbildung 11) geht hervor, dass der Großteil der im *S. cerevisiae*-Wildtyp vorhandenen SOD-Aktivität auf ScSOD1 zurückzuführen ist: Bei einer Deletion des entsprechenden Gens verbleibt lediglich eine signifikant verringerte SOD-Aktivität von 27 % (zurückzuführen auf ScSOD2). Die Deletion von *ScSod2* führt dagegen nur zu einer Reduktion der Gesamt-SOD-Aktivität um 15 % im Vergleich zum Wildtyp. Ein möglicher kompensatorischer Effekt der verbleibenden ScSOD in den Deletionsstämmen im Vergleich zum Wildtyp kann aufgrund der Messart nicht bestimmt werden. Die Überexpression von *ScSod1* bzw. *ScSod2* resultiert jeweils in einer deutlichen Aktivitätssteigerung der Gesamt-SOD-Aktivität. Aufgrund der Messmethode ist aber nicht nachweisbar, ob diese Aktivitätssteigerung auf eine oder auf beide ScSODs zurückzuführen ist. Um dies genauer zu untersuchen und mögliche Rückschlüsse auf eine gemeinsame Regulation ziehen zu können, wurden SOD-Aktivitätsfärbungen durchgeführt.

Die in Abbildung 12 dargestellten „In-Gel" SOD-Aktivitätsgele zeigen die *ScSod*-Mutantenstämme mit den jeweils entsprechenden Wildtypen. Die *ScSod*-Deletionsstämme wurden in dem BY4742-Hintergrund hergestellt, sodass der entsprechende Wildtyp der BY4742-Stamm ist. Für die Überexpressionsstämme handelt es sich bei dem Wildtyp um den Stamm EG103. Die verschiedenen Wildtypen erklären auch die Unterschiede in den detektierten SOD-Aktivitäten: BY4742 zeigt eine stärkere Aktivität für ScSOD1 als EG103. Der letztgenannte Stamm weist hingegen eine stärkere Bande für PaSOD2 auf. Die untersuchten *ScSod*-Deletionsstämme zeigen damit, wie erwartet, keine Aktivität der entsprechenden SOD. Ferner belegen die

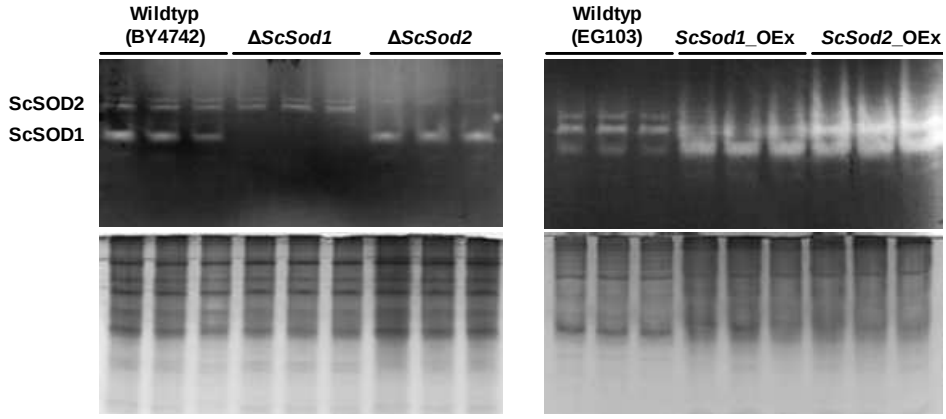


Abbildung 12: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen von *ScSod*-Mutantenstämmen und den entsprechenden Wildtypen. Nachweise der ScSOD-Aktivitäten durch „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen von je 50 µg Gesamtproteinextrakten vom Wildtyp (BY4742), *ScSod1*- und *ScSod2*-Deletionsstämmen (links) sowie dem Wildtyp (EG103), *ScSod1*- und *ScSod2*-Überexpressionsstämmen (rechts). Die Proteinextrakte wurden auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend einer SOD-Aktivitätsfärbung (oben) oder einer Coomassie-Färbung (unten, Kontrolle) unterzogen.

Färbungen, dass eine Deletion von *ScSod1* oder *ScSod2* zu keinem nachweisbaren Effekt auf die Aktivität der verbleibenden SOD führt. Im Gegensatz dazu weisen beide Überexpressionsstämme eine, im Vergleich zum Wildtyp, verstärkte Bande beider ScSODs auf. Dies deutet auf eine gemeinsame Hochregulation beider ScSODs hin. Die in den Wildtypen sowie dem Δ*ScSod1*-Stamm detektierten Doppelbanden für ScSOD2 sind für *S. cerevisiae* bereits bekannt und auf ein unterschiedliches Laufverhalten des Proteins bzw. möglicherweise auf eine Multimerbildung im nativen Gel zurückzuführen (Aguirre et al. 2013, Naranuntarat et al. 2009). Diese Doppelbanden sind in den *ScSod*_OEx-Stämmen, vielleicht aufgrund der erhöhten Aktivität und der folglich stärkeren Banden, nicht mehr nachweisbar. Außerdem veränderte sich das Laufverhalten der SODs der Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtyp: ScSOD1 und ScSOD2 liefen sehr dicht übereinander (Abbildung 12 rechts). Jedoch lässt Abbildung 12 vermuten, dass die Überexpression einer *ScSod* zu einer gesteigerten Aktivität der verbleibenden ScSOD – also einer gemeinsamen Regulation – führt.

Abschließend konnte sowohl für *P. anserina* als auch für *S. cerevisiae* eine gemeinsame Regulation von SOD-Aktivitäten nachgewiesen werden: Die Überexpression von *PaSod3* bzw. *ScSod2* resultiert in einer erhöhten Aktivität der genetisch nicht veränderten SOD1, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen unbekannt sind. Die Möglichkeit, dass durch die genetische Veränderung eines Gens auch ein anderes Protein in seiner Menge bzw. Aktivität beeinflusst wird zeigt, dass es nicht immer möglich ist, durch die Modifikation eines Gens ausschließlich die entsprechende SOD zu verändern.

4.2 Die putativen SODs Pa_1_10620, Pa_1_10630 und Pa_1_6300

Die beschriebene, teilweise gemeinsame Regulation der SODs auf Protein- und Aktivitätsebene (siehe Kapitel 4.1) macht deutlich, dass es essentiell ist, alle Komponenten zu berücksichtigen, welche eine Rolle bei der Detoxifizierung von ROS, in diesem speziellen Fall von Superoxid,

spielen. Eine nicht ganzheitliche Betrachtung aller SODs könnte zu fehlerhaften Rückschlüssen oder Annahmen führen.

Für *P. anserina* konnte bereits eine Triple-Deletionsmutante aller bekannten *PaSods* hergestellt werden (Zintel 2012). Da der Stamm lebensfähig ist, wäre es denkbar, dass in diesem Stamm bis dato unentdeckte *PaSods* induziert werden und so die Auswirkungen der ∆*PaSod1/2/3* kompensieren. Zudem wurden beispielsweise in *A. fumigatus* Hinweise auf eine vierte putative SOD gefunden (Lambou et al. 2010). Um zu vermeiden, dass für *P. anserina* bisher nicht als SODs identifizierte Proteine übersehen werden, wurde nach Proteinen gesucht, welche Homologien zu den für SODs relevanten Domänen, wie aktiven Zentren und Cu/Zn- bzw. Mn/Fe-Bindemotiven, aufweisen. Außerdem wurde eine weiterführende Suche nach GO-Bezeichnungen die im Zusammenhang mit der Detoxifizierung von Superoxid stehen in Transkriptomdaten von *P. anserina* durchgeführt, um Hinweise auf bisher unbekannte SODs zu erhalten (Philipp et al. 2013, Wiemer und Osiewacz 2014).

> Die Suche nach GO-Bezeichnungen basiert auf einer Datenbank, die im Rahmen des Gen-Ontologie Projekts 1998 ins Leben gerufen wurde. Die Datenbank dient der Vereinheitlichung der unterschiedlichen Bezeichnungen von Genprodukten aus verschiedenen Datenbanken. Dabei ist das Ziel die eindeutige und speziesübergreifende Annotation unter Verwendung eines hierarchisch gegliederten Vokabulars (Gene Ontology Consortium 2006).

Diese Suche führte schließlich zu der Identifizierung von *Pa_1_10620*, *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300*. Diese drei Gene mussten fortan als potenzielle *PaSod*-Kandidaten in Betracht gezogen und auf mögliche Funktionen als aktive SODs hin untersucht werden.

4.2.1 Identifizierung von Pa_1_10620

Eine BLAST-Analyse sowie eine Domänensuche mit dem Volllängenprotein zeigten, dass Pa_1_10620, auf der *P. anserina*-Genomseite (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) als putatives mitochondriales Vorläuferprotein der kleinen Untereinheit des ribosomalen Proteins S26 beschrieben, Homologien zu ribosomalen Proteinen und gleichzeitig zu SOD-Domänen aufweist. So können einerseits hohe Ähnlichkeiten von Pa_1_10620 zu den Mn/FeSODs in *Magnaporthe oryzae* 70-15 (E-Wert: 4×10^{-60}), *Glarea lozoyensis* ATCC 20868 (E-Wert: 3×10^{-57}) und *Blumeria graminis f. sp. hordei* DH14 (E-Wert: 1×10^{-56}) gefunden werden. Andererseits sind Homologien zu ribosomalen Proteinen, wie zu den mitochondrialen Ribosomen in *Blumeria graminis f. sp. tritici* 96224 (E-Wert: 1×10^{-58}), dem mitochondrialen RSM26-verwandten Protein in *Fusarium fujikuroi* IMI 58289 (E-Wert: 3×10^{-57}) oder einem 37S ribosomalen Protein S26 in Mitochondrien von *Fusarium oxysporum f. sp.* cubense race 4 (E-Wert: 1×10^{-56}) nachweisbar (Grimm et al. 2015). Die Suche nach Homologien des Proteins Pa_1_10620 ergab auch hohe Übereinstimmungen mit der in *A. fumigatus* beschriebenen putativen AfSOD4 (Lambou et al. 2010).

Pa_1_10620 kodiert für ein 331 Aminosäuren langes Protein mit einer vorhergesagten N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssequenz (Abbildung 13, gelb). Nach dem Import in die Mitochondrien entspricht das erwartete Molekulargewicht 34,1 kDa. Das Protein enthält ein

Mangan-Bindemotiv, jedoch ist dieses Bindemotiv „D - X - [W/F] - E - H - [S/T/A] - [F/Y] - [F/Y]" (Priya et al. 2007) in Pa_1_10620 im Vergleich zu den in PaSOD2 und PaSOD3 vorhandenen Bindemotiven um drei Aminosäuren verkürzt (Abbildung 13, grün). Außerdem ist nur eins der zwei konservierten Histidine, welche wahrscheinlich Teil der aktiven Zentren in MnSODs sind (Zhang et al. 2006) und in PaSOD2 sowie PaSOD3 zu finden sind, für Pa_1_10620 nachweisbar (Abbildung 13, rot).

```
PaSOD2          MVNFDNILKYLAVQAPLRAFSGE---DFNATKMAVQEYTLPALP----------YAYNALEPHISAQIMELHHS 61
PaSOD3          -MSSTLLRTVPALRGALRASAVKPAAALASTSFVRGKATLPDLP----------YDYNALEPYISSKIMELHHK 63
Pa_1_10620      MLRPRLRIPRASSPFALPASRSSTAGQLLPLAYRSSYHTVPVLENIPEKESEDGQKYRSIDGFLSPMAFTTAWD 74
                 :         :   .* *   .    : .        *:* *             *.::: .:*.  :    .

PaSOD2          KHHQAYVTNLN-----NALRLHVAAVGAGDIASQIEMQQVIKFNGGGHINHSLFWKNLAPAESEETKPEAAKEL 130
PaSOD3          KHHQTYVTGLN-----TALENIAKAEEKGDFTKAASIAPLLNFHGGGHVNHSLFWENLAPA-SREGGGEPKGDL 131
Pa_1_10620      YYQTHVLSNLNRLCAETNNDSLLLKDVVLATARDPAQAATFNYASAAHNNH-FFFKCLSPT--ETKAEDMPAQL 145
                 ::   ::.**     .             :        ::: ...* ** :*:: *:*:  .    :   :*

PaSOD2          VAAVEKTWGSLDDFKNAFSSTLLGIQGSGWGWLVKDS-------------------------ANGLRIVTTKD 178
PaSOD3          KQAIEDDFGSFEDFRKQMNTTLAGIQGSGWAWLVKDKE------------------------SDTLSIVTRAN 180
Pa_1_10620      KDALVKSFGSLDALKELMVNTATSMFGPGFVWLVRSDRPKDPHQFRVLTTYLSGSPYPAAHWRKQSLNTATDVG 219
                  *: . :**:: ::: : .*  .: *.*: ***:..                          : *  .*  .

PaSOD2          QDPVVGRDV-------------------------------PVFGVDMWEHAYYLQY----------------- 203
PaSOD3          QDPVTGAFV-------------------------------PLLGIDAWEHAYYLQY----------------- 205
Pa_1_10620      ESSERGIQAGKQYLENSARGAGWNASAYKKDDFAPGGVLLEPVLCLNTWEHAWLFEYGFGGSPKSVLDKVKGGQ 293
                :..  *  .                                *:: :: ****: ::*

PaSOD2          -------LNGKAAYVENIWNVINWKTAEERFLGTSEATKL 236  Identität zu Pa_1_10620: 14,83 %
PaSOD3          -------ENRKAEYFDAIWNIINWKTVAKRYD-------- 230  Identität zu Pa_1_10620: 15,22 %
Pa_1_10620      AGVAENQKSGKEVYAERWWDFVDWNVVARLAFPGGTKI-- 331
                       . *  * :  *:.::*:.. .
```

Abbildung 13: Darstellung des Homologievergleichs der Mn-bindenden (putativen) SODs PaSOD2, PaSOD3 sowie Pa_1_10620. Die zwei in *P. anserina* bestätigten MnSODs, PaSOD2 und PaSOD3, sowie die putative SOD Pa_1_10620 wurden mittels Clustal W verglichen. Die vorhergesagten MLS (MitoProtII, Claros und Vincens 2004) von PaSOD3 und Pa_1_10620 sind in gelb markiert. Rot hinterlegt sind die vorhergesagten Histidine der aktiven Zentren (Zhang et al. 2006). Die Mn-Bindemotive (Priya et al. 2007) von PaSOD2, PaSOD3 sowie das verkürzte Motiv von Pa_1_10620 sind in grün markiert (modifiziert nach Grimm et al. 2015).

Durch Transkriptomanalysen konnte bestätigte werden, dass *Pa_1_10620* in juvenilen, mittelalten und seneszenten (lat.: „senescere" alt werden) *P. anserina*-Wildstämmen exprimiert wird (Grimm et al. 2015, Philipp et al. 2013, Wiemer und Osiewacz 2014). Genauere Untersuchungen zu diesem bisher unbekannten Protein sollten mit Hilfe von Mutantenstämmen (Deletion, Überexpression, GFP-Fusion) erhalten werden. Die Klonierungsarbeiten zu diesen *Pa_1_10620*-Mutantenstämmen wurden von Lena Böhl im Rahmen ihrer Masterarbeit durchgeführt (Böhl 2013). In dieser Arbeit konnte neben der *Pa_1_10620*_OEx1-Mutante auch ein *Pa_1_10620::eGfp*-Stamm, der das Gen unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert, generiert werden. Mit Hilfe dieses Stammes wurde die vorhergesagte mitochondriale Lokalisation von Pa_1_10620 bestätigt (Böhl 2013, Grimm et al. 2015). Ein *Pa_1_10620*-Deletionsstamm konnte trotz der Überprüfung von vielen putativen Transformanden nicht generiert werden (Böhl 2013).

4.2.2 Analyse der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme

Frau Böhl hatte bereits den zur Transformation benötigten Überexpressionsvektor kloniert und konnte einen ersten Überexpressionsstamm, *Pa_1_10620*_OEx1, herstellen (Böhl 2013). Für

eine aussagekräftige Analyse werden jedoch mindestens zwei unabhängige Transformanden benötigt, welche jeweils eine Einfachintegration des Überexpressionskonstrukts in das Genom enthalten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ein weiterer Überexpressionsstamm, *Pa_1_10620*_OEx2, erfolgreich hergestellt und beide Stämme mittels Southern Blot-Analyse (Anhang Abbildung S44) sowie mittels „quantitativer Real-Time-PCR“ (qRT-PCR) verifiziert werden (Abbildung 14).

Zur Erstellung von Überexpressionsstämmen in *P. anserina* muss zunächst ein Vektor konstruiert werden, der das zu überexprimierende Gen unter einem starken konstitutiven Promotor enthält. Bei einer Transformation wird dieser Überexpressionsvektor in Wildtyp-Protoplasten eingebracht. Nach einer erfolgreichen Transformation werden Transformanden isoliert und auf die Integration des vollständigen Überexpressionskonstrukts hin untersucht. Da es sich bei *P. anserina* um keine homologe Rekombination handelt, sondern das Überexpressionskonstrukt an einem beliebigen Ort in das Genom integriert, müssen unabhängige Transformanden gefunden und analysiert werden. Auf diese Weise können mögliche Positionseffekte bei der Genexpression berücksichtigt werden.

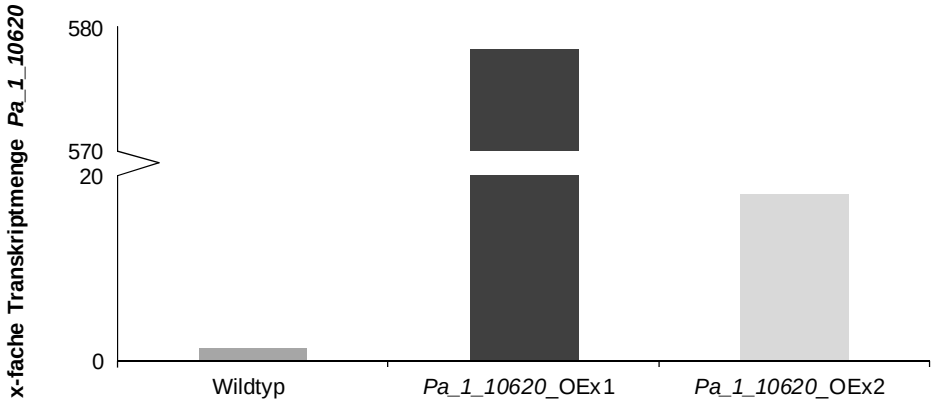


Abbildung 14: Relative *Pa_1_10620*-Transkriptmenge im Wildtyp und den *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen. Durch quantitative Real-Time-PCRs wurden die relativen Transkriptmengen von *Pa_1_10620* im Wildtyp und in den *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen ermittelt. Dazu wurden alle Proben mit dem Haushaltsgen *PaPorin* normiert, die *Pa_1_10620*-Transkriptmenge des Wildtyps auf 1 gesetzt und die Transkriptmengen der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme relativ dazu berechnet. *Pa_1_10620*_OEx1 weist eine 574-fach erhöhte und *Pa_1_10620*_OEx2 eine 18-fach gesteigerte Transkriptmenge an *Pa_1_10620* auf.

Anhand der qRT-PCRs konnte nachgewiesen werden, dass die erstellten *Pa_1_10620*-Überexpressionsstämme nicht nur genetisch korrekt sind, sondern, dass das eingebrachte Gen auch in erhöhtem Maße erfolgreich transkribiert wird. Dies führte zu einer Steigerung der *Pa_1_10620*-Transkriptmenge um das 574-fache für den *Pa_1_10620*_OEx1-Stamm, sowie um das 18-fache für den *Pa_1_10620*_OEx2-Stamm im Vergleich zum Wildtyp.
Zur weiteren Untersuchung dieser Stämme wurden Western Blot-Analysen zur Ermittlung der vorliegenden Proteinmengen mit aufgereinigten Mitochondrien durchgeführt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten mitochondrialen Proteinextrakte wurden über einen Saccharosegradienten in der Ultrazentrifuge aufgereinigt. Diese Methode ermöglicht eine relativ gute Trennung von intakten und defekten Mitochondrien, wobei eine absolute Trennung nicht möglich ist. Ferner enthalten die mitochondrialen Extrakte immer Bestandteile des ERs, da sich diese beiden Kompartimente nicht vollends separieren lassen.

Dabei wird ausgenutzt, dass Pa_1_10620 mit dem gegen die MnSOD PaSOD2 gerichteten polyklonalen Antikörper nachweisbar ist. Wie in Abbildung 15 A zu sehen ist, zeigt die Western

Blot-Analyse mit mitochondrialen Proteinextrakten des Wildtyps eine schwache Bande bei der erwarteten Größe von 34,1 kDa für Pa_1_10620. In den Überexpressionsstämmen sind hingegen sehr deutliche Banden sichtbar (Abbildung 15 A). Neben der für Pa_1_10620 erwarteten Bande bei 34,1 kDa ist jedoch eine weitere Proteinbande bei ~ 26 kDa nachweisbar. Letztere entspricht in etwa dem Molekulargewicht von PaSOD2. Da PaSOD2 nicht in den Mitochondrien lokalisiert ist, aber bei den verwendeten mitochondrialen Proteinextrakten nachgewiesen werden konnte, wurde untersucht, ob es sich dabei um eine Kontamination der verwendeten Mitochondrien-extrakte mit endoplasmatischem Retikulum handelt, in welchem PaSOD2 zu finden ist. Dazu wurden Western Blot-Analysen mit in *P. anserina* bekannten sekretierten Proteinen (PaCATB, PaIDI1) durchgeführt, welche ebenfalls im ER nachweisbar sind.

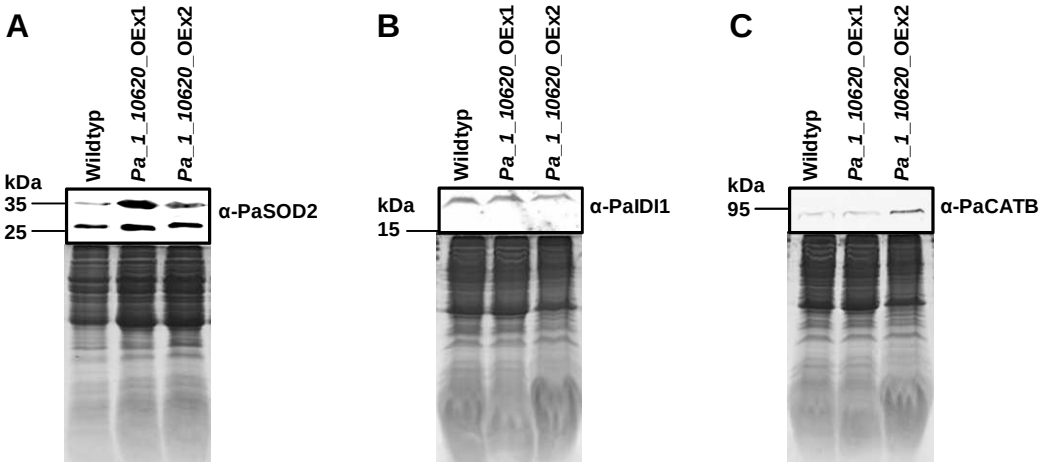


Abbildung 15: Western Blot-Analysen des Wildtyps sowie der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. Es wurden 250 µg (α-PaSOD2) bzw. 100 µg (α-PaIDI1, α-PaCATB) mitochondriale Proteinextrakte in einem 16 % igen (α-PaSOD2, α-PaIDI1) bzw. einem 12 % igen (α-PaCATB) SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Ladekontrolle dienten die mit Coomassie gefärbten Gele. **A:** Pa_1_10620 wurde mit Hilfe des α-PaSOD2-Antikörpers (PaSOD2: 26,8 kDa, Pa_1_10620: 34,1 kDa) im Wildtyp sowie den beiden *Pa_1_10620*-Überexpressionsstämmen nachgewiesen. Zudem wurden die **B:** α-PaIDI1- (21 kDa) und **C:** α-PaCATB-Antikörper (90 kDa) verwendet, welche ebenfalls in allen Stämmen ein Signal hervorbrachten (modifiziert nach Grimm et al. 2015).

Wie in Abbildung 15 zu sehen ist, konnte für beide getesteten sekretierten Proteine, PaIDI1 (Abbildung 15 B) und PaCATB (Abbildung 15 C), in allen untersuchten mitochondrialen Proben eine Bande detektiert werden. Dies bestätigt, dass die isolierten mitochondrialen Extrakte Proteine des ERs enthielten und aus diesem Grund auch PaSOD2 (Abbildung 15 A) detektierbar war.

Nach dem erfolgreichen Nachweis einer erhöhten Pa_1_10620-Proteinmenge in den *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp, sollte im nächsten Schritt die putative SOD-Aktivität mit Hilfe von „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen untersucht werden. Da PaSOD3 in SOD-Aktivitätsgelen mit isolierten Mitochondrien eine starke Bande ergibt, musste vermieden werden, dass sich diese mit einer möglichen Aktivitätsbande für Pa_1_10620 überlagert. Daher wurden Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämme hergestellt (Anhang Abbildung S45). Um auszuschließen, dass die Δ*PaSod3*-Stämme eine Veränderung der Pa_1_10620-Proteinmenge aufweisen, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt die bestätigten, dass Pa_1_10620 in

Δ*PaSod3*-Stämmen immer noch in erhöhtem Umfang vorlag (Anhang Abbildung S46). Anschließend wurden SOD-Aktivitätsgele mit verschiedenen Mengen mitochondrialer Proteinextrakte des Wildtyps sowie der Doppelmutante (100 µg, 250 µg, 500 µg) beladen, laufen gelassen und gefärbt.

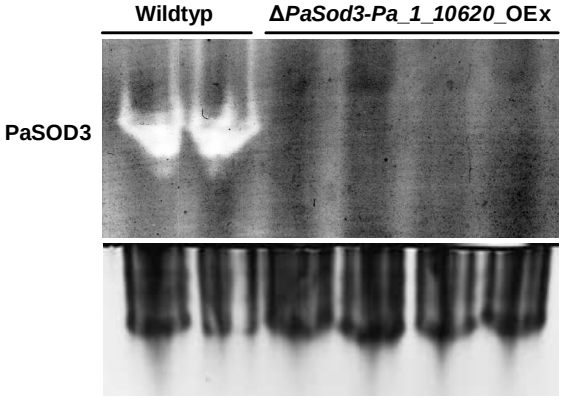


Abbildung 16: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung vom Wildtyp und Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämmen. 250 µg mitochondriale Proteinextrakte von zwei Wildtypen sowie vier Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämmen wurden auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde ein Gel der SOD-Aktivitätsfärbung (oben) unterzogen und das zweite Gel, welches als Ladekontrolle diente, mit Coomassie gefärbt (unten) (modifiziert nach Grimm et al. 2015).

In Abbildung 16 ist zu erkennen, dass der Wildtyp eine deutliche PaSOD3-Aktivitätsbande aufweist. Für die Doppelmutanten waren keine Aktivitätsbanden nachweisbar. Folglich konnte keine SOD-Aktivität für Pa_1_10620 gezeigt werden, wie es auch für die putative AfSOD4 von *A. fumigatus* der Fall war (Lambou et al. 2010). Die daraus folgende Annahme, dass es sich bei Pa_1_10620 um keine SOD handelt, wird durch das deutlich höhere Molekulargewicht von Pa_1_10620 im Vergleich zu PaSOD1-3, der scheinbar essentiellen Funktion und das Fehlen eines der zwei Histidine im aktiven Zentrum unterstützt.

Obwohl Pa_1_10620 keine SOD-Aktivität zeigte, konnte Lena Böhl in ihrer Masterarbeit (2013) Hinweise darauf liefern, dass *Pa_1_10620* ein essentielles Gen sein könnte, da weder eine homokaryotische noch eine heterokaryotische Deletion in über 400 getesteten Phleomycin-resistenten Transformanden möglich war. Um herauszufinden, ob Pa_1_10620 möglicherweise für die Abwehr von oxidativem Stress essentiell ist, wurden Wuchsraten (Abbildung 17 A) und Lebensspannen von *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen auf M2-Medium (Abbildung 17 B) sowie M2-Medium mit Paraquat bzw. Wasserstoffperoxid (Anhang Abbildung S47) als oxidativen Stressoren analysiert.

Die *Pa_1_10620*_OEx-Stämme weisen auf M2-Medium keine Veränderungen der Wuchsraten im Vergleich zum Wildtyp auf (Abbildung 17 A). Die relativen Überlebensraten auf M2-Medium zeigen hingegen signifikant verlängerte Lebensspannen der *Pa_1_10620*-überexprimierenden Stämme im Vergleich zum Wildtyp. Die Verlängerung der medianen Lebensspannen entspricht für beide Mutantenstämme etwa 8 %. Die maximale Lebensspanne des Wildtyps beträgt 32 Tage, während beide *Pa_1_10620*_OEx-Stämme eine maximale Lebensspanne von 34 Tagen aufweisen. Weitere Untersuchungen bezüglich der Lebensspannen auf M2-Medium mit

dem Superoxid-Generator Paraquat zeigen, dass der *Pa_1_10620*_OEx1-Stamm auf allen getesteten Konzentrationen (10 µM, 20 µM, 30 µM Paraquat) eine Langlebigkeit im Vergleich zum Wildtyp aufweist (Anhang Abbildung S47 A - C). Für den *Pa_1_10620*_OEx2-Stamm ist hingegen eine verlängerte Lebensspanne nur auf Medium mit 20 µM Paraquat nachweisbar (Anhang Abbildung S47 B). Auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen Wasserstoffperoxid (3 mM, 6 mM, 9 mM) können keine signifikanten Veränderungen der Lebensspannen von *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Anhang Abbildung S47 D - F).

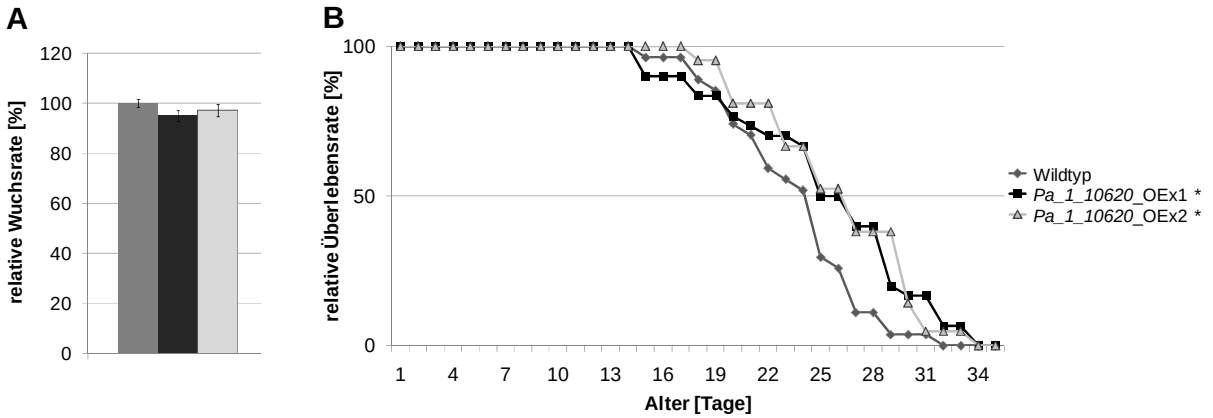


Abbildung 17: Analyse der Wuchsraten und Lebensspannen des Wildtyps und der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. A: Die relativen Wuchsraten vom Wildtyp, dem *Pa_1_10620*_OEx1- sowie dem *Pa_1_10620*_OEx2-Stamm wurden auf M2-Medium bestimmt. Der Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt und die Überexpressionsstämme relativ dazu dargestellt. Je Stamm wurden mehrere Individuen (Wildtyp: n = 27, *Pa_1_10620*_OEx1: n = 30, *Pa_1_10620*_OEx2: n = 19) auf je einer M2-Platte angeimpft und die zurückgelegte Strecke des Myzels nach vier Tagen Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht bestimmt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen. **B:** Es wurden die relativen Überlebensraten des Wildtyps sowie der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme auf M2-Medium bestimmt (Wildtyp: n = 27, *Pa_1_10620*_OEx1: n = 30, *Pa_1_10620*_OEx2: n = 19). Dies resultierte in medianen Lebensspannen von 24 Tagen, 26 Tagen und 26,2 Tagen für den Wildtyp, *Pa_1_10620*_OEx1 bzw. *Pa_1_10620*_OEx2. Die maximalen Lebensspannen betrugen 32 Tage für den Wildtyp und je 34 Tage für beide Überexpressionsstämme. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Log Rank Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$) (modifiziert nach Grimm et al. 2015).

Insgesamt kommt dem von *Pa_1_10620* kodierten Protein damit keine Funktion als aktive SOD zu, aber die Überexpression von *Pa_1_10620* wirkt sich unter Normalbedingungen sowie unter Superoxid-Stress positiv aus, wohingegen *Pa_1_10620* keine Rolle bei Wasserstoffperoxid-Stress zu haben scheint.

4.2.3 Bioinformatische Charakterisierung von Pa_1_10630 und Pa_1_6300

Die Hinweise darauf, dass *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300* für putative SODs kodieren könnten, entstammten der Suche nach GO-Bezeichnungen. SOD-Aktivitätsfärbungen sowohl mit der Δ*PaSod1/2/3*-Mutante als auch mit sekretierten Proteinen der Δ*PaSod2*-Mutante lieferten keine Anhaltspunkte auf bis dato unentdeckte PaSOD-Aktivitäten (Zintel 2012). Um weitere Hinweise auf bisher unbekannte SODs zu erhalten, wurde in Transkriptomdaten von *P. anserina* spezifisch nach Genen gesucht, welchen die drei GO-Bezeichnungen „Superoxid metabolische Prozesse“, „Entfernung von Superoxidradikalen“ und „SOD-Aktivität“ zugeordnet werden konnten (Philipp et al. 2013, Wiemer und Osiewacz 2014). Diese Analyse führte zu zwei Genen, *Pa_1_10630* und

Pa_1_6300, die den gesuchten GO-Bezeichnungen mit einem E-Wert ≤ 1×10^{-20} entsprachen. Keines der beiden Proteine enthält eine vorhergesagte mitochondriale Lokalisationssequenz (MitoProtII, Claros und Vincens 2004). *Pa_1_10630* kodiert für ein 276 AS langes Protein mit einer vorhergesagten Cu/ZnSOD-Domäne von Position 58 - 182 (E-Wert: $1{,}12 \times 10^{-10}$). Das erwartete Molekulargewicht entspricht 28,2 kDa. *Pa_1_6300* kodiert für ein deutlich kürzeres Protein von lediglich 178 AS, welches einem Molekulargewicht von 18,6 kDa entspricht. Ferner trägt es ebenfalls eine vorhergesagte Cu/ZnSOD-Domäne von Position 70 - 168 (E-Wert: 4×10^{-11}). Die Identitäten der beiden Volllängenproteine zu der einzigen verifizierten Cu/ZnSOD in *P. anserina*, PaSOD1, betragen lediglich 13,64 % für Pa_1_10630 sowie 11,04 % für Pa_1_6300. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass PaSOD1 zwei und Pa_1_10630 sowie Pa_1_6300 jeweils nur eine Cu/ZnSOD-Domäne aufweisen, und zum anderen auch auf die deutlichen Unterschiede in der Länge der jeweiligen Domänen: PaSOD1 enthält zwei Cu/ZnSOD-Domänen mit 11 bzw. 12 AS, für Pa_1_10630 bzw. Pa_1_6300 sind diese vorhergesagten Domänen jeweils länger als 120 AS. Es konnten allerdings deutlich höhere Übereinstimmungen von Pa_1_10630 bzw. Pa_1_6300 mit den im humanpathogenen Pilz *Candida albicans* bekannten SODs CaSOD4, CaSOD5 und CaSOD6 gefunden werden (Tabelle 25) (Gleason et al. 2014).

Tabelle 25: Identitäten von PaSOD1 sowie den zwei putativen SODs Pa_1_10630 und Pa_1_6300 mit *C. albicans* CaSOD4, CaSOD5 und CaSOD6.

Protein	CaSOD4	CaSOD5	CaSOD6
PaSOD1	14,29 %	21,43 %	12,99 %
Pa_1_10630	29,74 %	33,33 %	17,45 %
Pa_1_6300	22,6 %	27,12 %	27,12 %

Die Proteine dieser drei von *C. albicans* kodierten Gene zeigen ebenfalls Verwandtschaft zu Cu/ZnSODs und tragen ferner einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), welcher die jeweiligen Proteine in der Zellwand fixiert. Dies ermöglicht den Enzymen extrazelluläres Superoxid in der direkten Umgebung des Pilzes zu detoxifizieren (Gleason et al. 2014). Ferner konnten beispielsweise hohe Homologien der Volllängenproteine Pa_1_10630 zu einem Cu/ZnSOD-ähnlichen Protein aus dem Schimmelpilz *Chaetomium thermophilum* bzw. von Pa_1_6300 zu einem Cu/ZnSOD-ähnlichen Protein aus *Neurospora tetrasperma* nachgewiesen werden. Der Sequenzvergleich der *P. anserina* und *C. albicans* Proteine zeigt, dass die höchsten Identitäten zwischen Pa_1_10630 und CaSOD5 bzw. zwischen Pa_1_6300 und CaSOD5 sowie CaSOD6 bestehen (Tabelle 25). Während CaSOD6 als Cu/ZnSOD beschreiben wird, stellt CaSOD5 eine SOD dar, welche lediglich Kupfer, aber kein Zink bindet (Gleason et al. 2014).
Zur genaueren Untersuchung der in *P. anserina* vorliegenden *Pa_1_10630*- und *Pa_1_6300*-Transkriptmengen wurden die für *P. anserina* publizierten Transkriptomdaten genutzt (Wiemer und Osiewacz 2014).

Tabelle 26: Transkriptmengen von *PaSod1*, *PaSod2*, *PaSod3*, *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300* zu unterschiedlichen Zeitpunkten; angegeben in „tags per million“ (tpm) (Wiemer und Osiewacz 2014).

Transkript	Bezeichnung	Tag 6	Tag 11	Tag 14
Pa_1_17400	PaSOD1	1654	2154	2092
Pa_2_4460	PaSOD2	676	157	124
Pa_5_1740	PaSOD3	19	24	12
Pa_1_10630		161	450	359
Pa_1_6300		2	1	2

Die in Tabelle 26 dargestellten Transkriptomdaten, angegeben in tpm („tags per million“), zeigen, dass für *Pa_1_10630* höhere Transkriptmengen vorliegen als für *PaSod3*. Ganz im Gegensatz dazu waren für *Pa_1_6300* kaum Transkripte detektierbar. Da Transkriptdaten keinen Aufschluss darüber liefern, ob es zur Translation und folglich der Bildung eines stabilen Proteins kommt, wurden im Weiteren Proteomanalysen zur Hilfe gezogen. Für die Erstellung dieser Proteomanalysen wurden mitochondriale Proteinextrakte verwendet, welche nicht, wie bei den anderen Experimenten üblich, über die Ultrazentrifuge aufgereinigt wurden und daher höhere Anteile an nicht-mitochondrialen Bestandteilen enthielten. Die Proteomanalysen konnten sowohl für Pa_1_10630 als auch für Pa_1_6300 translatierte Proteine nachweisen (Zusammenarbeit mit AK Rögner, Ruhr-Universität Bochum, persönliche Mitteilung). Ob es sich bei diesen Proteinen, welche lediglich aufgrund der GO-Bezeichnungen ausgewählt wurden, um aktive und funktionelle Superoxid-Dismutasen handelt, bleibt aber zu klären.

4.3 Charakterisierung der *PaSod3*-Stämme

Das Genom von *P. anserina* kodiert für eine mitochondrial lokalisierte, aktive SOD, die Mn-bindende PaSOD3. Neben dieser können geringe Mengen der Cu/ZnSOD im Intermembranraum der Mitochondrien von *P. anserina* nachgewiesen werden (Zintel et al. 2010). Trotz der im Intermembranraum vorliegenden PaSOD1 wird vermutet, dass die in der mitochondrialen Matrix lokalisierte MnSOD den größten Teil der Entgiftung von ROS in den Mitochondrien übernimmt. Da die Mitochondrien der Hauptort der Entstehung von Superoxid sind, welches aufgrund seiner Ladung die Membranen dieses Kompartiments nicht passieren kann (Muller et al. 2004), wurde eine deutliche Auswirkung der modifizierten PaSOD3-Mengen auf *P. anserina* vermutet.
Frau Zintel konnte bereits zeigen, dass die Deletion der *PaSod3* keinen Einfluss auf die mittlere Lebensspanne hat, sowie, dass diese bei den *PaSod3*_OEx-Stämmen signifikant verkürzt ist (Zintel et al. 2010). Zur detaillierten Untersuchung des Einflusses der veränderten mitochondrialen SOD-Mengen auf *P. anserina* wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit Lebensspannenanalysen durchgeführt, die die Auswirkungen von oxidativem Stress auf die *PaSod3*-Stämme untersuchen (Abbildung 18 und Abbildung 19).

4.3.1 Einfluss von Paraquat auf die Lebensspanne

Paraquat führt zu der Bildung von intrazellulärem Superoxid, primär an Komplex I der mitochondrialen Elektronentransportkette, was wiederum in oxidativem Stress resultiert (Castello

et al. 2007, Cochemé und Murphy 2008). Um die Auswirkung von erhöhten intrazellulären Superoxid-Konzentrationen auf *PaSod3*-Mutanten (Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1, *PaSod3*_OEx3) zu testen, wurden Lebensspannenanalysen auf *P. anserina* synthetischem Medium (PASM) und auf PASM mit unterschiedlichen Paraquat-Konzentrationen (5 µM, 10 µM, 15 µM) durchgeführt.
Die Analysen der relativen Überlebensraten auf PASM-Medium (Abbildung 18 A) zeigen, dass die beiden unabhängigen *PaSod3*-Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtyp signifikant kurzlebig sind, obwohl die maximalen Lebensspannen kaum verändert sind. Hingegen weist die Lebensspanne des Δ*PaSod3*-Stammes keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. Bei der Untersuchung der relativen Überlebensrate auf Paraquat-haltigem Medium (Abbildung 18 B - D) wurde deutlich, dass der Wildtyp durch die gewählten Konzentrationen (5 µM, 10 µM, 15 µM Paraquat) keine Beeinträchtigung der Lebensspanne zeigte (mediane Lebensspannen: PASM: 18,2 Tage, PASM mit 5 µM bzw. 10 µM bzw. 15 µM Paraquat: je 20,2 Tage). Der Δ*PaSod3*-Stamm wies hingegen bei steigenden Paraquat-Konzentrationen immer kürzer werdende mediane Lebensspannen auf (mediane Lebensspannen: PASM: 17,2 Tage, PASM mit 5 µM Paraquat: 15,2 Tage, PASM mit 10 µM Paraquat: 13,5 Tage, PASM mit 15 µM Paraquat: 9,6 Tage), welche signifikante Unterschiede zum Wildtyp zeigten.

> Die mediane Lebensspanne beschreibt die Anzahl an Tagen, bis 50 % aller getesteten Individuen eines Stammes das Wachstum eingestellt haben. Im Gegensatz dazu ergibt sich die mittlere Lebensspanne aus der durchschnittlichen Lebensspanne aller untersuchten Isolate eines Stammes.

Die Überexpressionsstämme wiesen zwei verschiedene Verläufe der Lebensspannen auf: Rund die Hälfte der getesteten Individuen des *PaSod3*_OEx1-Stammes waren bei einer Paraquat-Konzentration von 5 µM bereits nach etwa 10 Tagen nicht mehr lebensfähig. Dies ist eine signifikante Verkürzung der Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp. Auch bei höheren Paraquat-Konzentrationen zeichnete sich ein ähnliches Bild ab. Bei der Zugabe von 10 µM Paraquat zum Medium waren nach 10,5 Tagen und bei der Zugabe von 15 µM Paraquat nach 9,3 Tagen 50 % aller untersuchten Individuen tot. Hingegen verhielten sich die Individuen des *PaSod3*_OEx3-Stammes etwas anders: Erst nach 16 Tagen waren die Hälfte der analysierten Individuen bei einer Paraquat-Konzentration von 5 µM verstorben. Dies blieb auch bei steigenden Konzentrationen des Superoxid-Generators ähnlich (mediane Lebensspannen: PASM mit 10 µM Paraquat: 24,5 Tage, PASM mit 15 µM Paraquat: 15,5 Tage). Generell scheint der Beginn der relativen Überlebensraten der *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme ähnlich zu verlaufen; sie zeigen eine Verkürzung im Vergleich zum untersuchten Wildtyp. Jedoch können die überlebenden Individuen des *PaSod3*_OEx3-Stammes, welche die ersten 15 Tage lebensfähig waren, möglicherweise eine höhere Resistenz gegenüber Paraquat ausbilden, sodass die maximale Lebensspanne deutlich länger ist, als die der getesteten Wildtyp-Individuen.

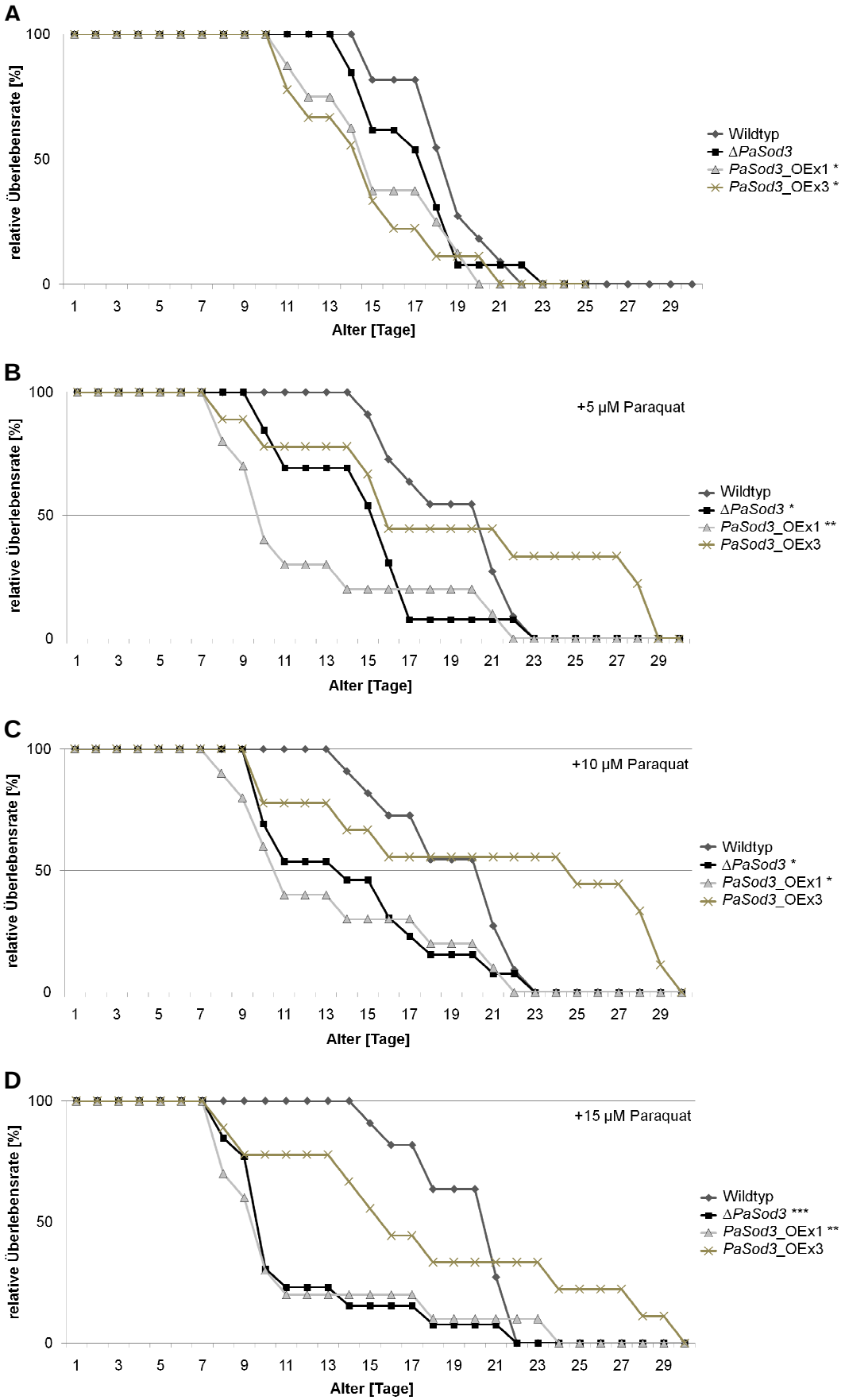


Abbildung 18: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutantenstämme auf PASM ohne bzw. mit Paraquat. Es wurden die relativen Überlebensraten vom Wildtyp (n = 11), Δ*PaSod3*- (n = 13), *PaSod3*_OEx1- (n = 8) und *PaSod3*_OEx3-Stämmen (n = 9) bestimmt. **A:** Auf PASM resultierten diese

in medianen Lebensspannen von 18,2 Tagen, 17,2 Tagen, 14,5 Tagen und 14,3 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen betrugen 22 Tage für den Wildtyp, 23 Tage für Δ*PaSod3*-, sowie 20 bzw. 21 Tage für *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme. **B:** Für PASM, versetzt mit 5 µM Paraquat, ergaben sich mediane Lebensspannen von 20,2 Tagen, 15,2 Tagen, 9,7 Tagen und 15,8 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen betrugen 23 Tage für den Wildtyp und den Δ*PaSod3*-Stamm, 22 Tage für *PaSod3*_OEx1- und 29 Tage für *PaSod3*_OEx3-Stämme. **C:** Die Lebensspannenanalyse auf PASM mit 10 µM Paraquat resultierte in medianen Lebensspannen von 20,2 Tagen, 13,5 Tagen, 10,5 Tagen und 24,5 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen beliefen sich auf 23 Tage für den Wildtyp und den Δ*PaSod3*-Stamm, 22 Tage für den *PaSod3*_OEx1-Stamm sowie 30 Tage für den *PaSod3*_OEx3-Stamm. **D:** Die relativen Überlebensraten auf PASM unter Zugabe von 15 µM Paraquat resultierten in medianen Lebensspannen von 20,4 Tagen, 9,6 Tagen, 9,3 Tagen und 15,5 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- sowie *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen für den Wildtyp und Δ*PaSod3*-Stamm betrugen 22 Tage, 24 Tage für den *PaSod3*_OEx1-Stamm und 30 Tage für den *PaSod3*_OEx3-Stamm. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Wilcoxon-Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$).

4.3.2 Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Lebensspanne

Paraquat führt zu der Bildung von intrazellulärem Superoxid, dem Substrat der Superoxid-Dismutasen. Bei der von SODs katalysierten Reaktion entsteht neben molekularem Sauerstoff auch Wasserstoffperoxid, welches, wie Superoxid, zu den ROS zählt. Im Gegensatz zu Superoxid kann Wasserstoffperoxid Membranen passieren und so den Entstehungsort verlassen. Zur Untersuchung der Auswirkungen von erhöhten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen auf *PaSod3*-Mutantenstämme, unabhängig von der durch SODs katalysierten Reaktion, wurden Lebensspannenanalysen auf Wasserstoffperoxid-haltigem Medium (3 mM, 6 mM, 9 mM) im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Aus Abbildung 19 wird deutlich, dass der Wildtyp ab einer Konzentration von 9 mM H_2O_2 im Medium eine deutlich verkürzte Lebensspanne aufwies (mediane Lebensspannen: PASM: 18,2 Tage, PASM mit 3 mM H_2O_2: 18,6 Tage, PASM mit 6 mM H_2O_2: 18,9 Tage, PASM mit 9 mM H_2O_2: 11,5 Tage). Hingegen wurden keine Wasserstoff-peroxid-abhängigen Unterschiede im Überleben der Deletionsmutante ermittelt (mediane Lebensspannen: PASM: 17,2 Tage, PASM mit 3 mM H_2O_2: 18,8 Tage, PASM mit 6 mM H_2O_2: 18,3 Tage, PASM mit 9 mM H_2O_2: 18,8 Tage). Zudem zeigte Letztere auf PASM mit 9 mM H_2O_2 eine signifikant verlängerte relative Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 19 C).

Obwohl die maximalen Lebensspannen der *PaSod3*_OEx-Stämme auf der niedrigsten getesteten Wasserstoffperoxid-Konzentration (Abbildung 19 A) keinen Unterschied zum Wildtyp aufwiesen, zeigten sie verringerte mediane Lebensspannen. Bei Verwendung von 6 mM (Abbildung 19 B) oder 9 mM (Abbildung 19 C) Wasserstoffperoxid waren sowohl die medianen als auch die maximalen Lebensspannen der *PaSod3*-überexprimierenden Stämme signifikant verkürzt (mediane Lebensspannen *PaSod3*_OEx1: PASM: 14,5 Tage, PASM mit 3 mM H_2O_2: 17,5 Tage, PASM mit 6 mM H_2O_2: 10 Tage, PASM mit 9 mM H_2O_2: 7,5 Tage; mediane Lebensspannen *PaSod3*_OEx3: PASM: 14,3 Tage, PASM mit 3 mM H_2O_2: 10,8 Tage, PASM mit 6 mM H_2O_2: 6,8 Tage, PASM mit 9 mM H_2O_2: 6,6 Tage).

Die Ergebnisse der Lebensspannenuntersuchungen deuten daraufhin, dass der Δ*PaSod3*-Stamm, der aufgrund des Verlustes der PaSOD3 mitochondriales Superoxid nicht effizient

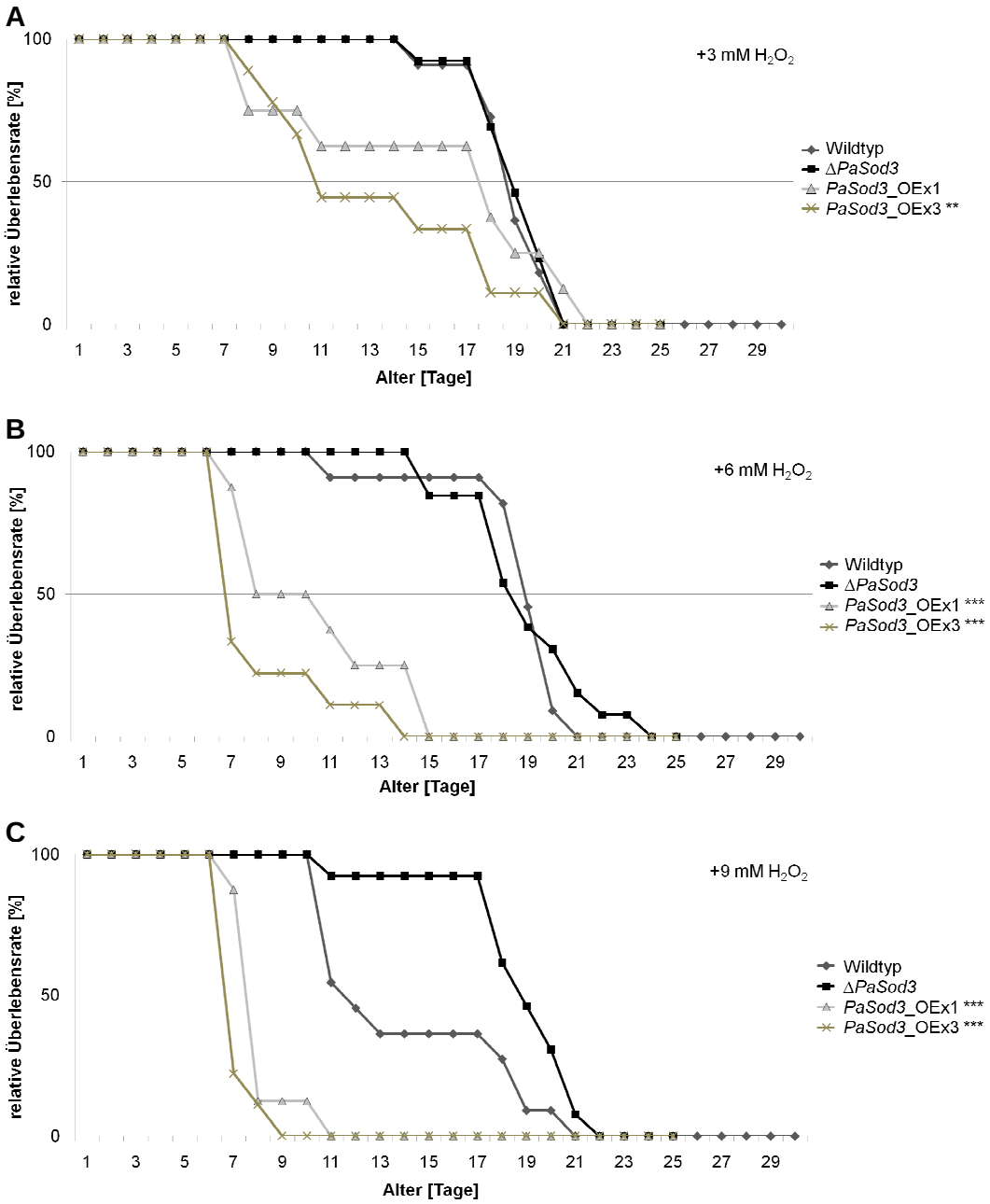


Abbildung 19: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutantenstämme auf PASM mit Wasserstoffperoxid. Es wurden die relativen Überlebensraten vom Wildtyp (n = 11), Δ*PaSod3*- (n = 13), *PaSod3*_OEx1- (n = 8) und *PaSod3*_OEx3-Stämmen (n = 9) bestimmt. **A:** Auf PASM-Medium, versetzt mit 3 mM Wasserstoffperoxid, resultierten diese in medianen Lebensspannen von 18,6 Tagen, 18,8 Tagen, 17,5 Tagen und 10,8 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen betrugen 21 Tage für den Wildtyp, die Δ*PaSod3*- und *PaSod3*_OEx3-Stämme sowie 22 Tage für den *PaSod3*_OEx1-Stamm. **B:** Für PASM-Medium mit 6 mM Wasserstoffperoxid ergaben sich mediane Lebensspannen von 18,9 Tagen, 18,3 Tagen, 10 Tagen und 6,8 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen betrugen 21 Tage für den Wildtyp, 24 Tage für Δ*PaSod3*-, 15 Tage für *PaSod3*_OEx1- und 14 Tage für *PaSod3*_OEx3-Stämme. **C:** Auf PASM-Medium mit 9 mM Wasserstoffperoxid führten die Untersuchungen zu medianen Lebensspannen von 11,5 Tagen, 18,8 Tagen, 7,5 Tagen und 6,6 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Die maximalen Lebensspannen betrugen 21 Tage für den Wildtyp, 22 Tage für Δ*PaSod3*-, 11 Tage für *PaSod3*_OEx1- sowie 9 Tage für *PaSod3*_OEx3-Stämme. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Wilcoxon-Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$).

umsetzen kann und folglich eine geringere intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge enthält, eine höhere exogene Wasserstoffperoxid-Konzentration tolerieren kann als der Wildtyp. Exogenes Paraquat resultiert aber in einer Lebensspannenverkürzung des Δ*PaSod3*-Stammes. Die *PaSod3*-überexprimierenden Stämme dismutieren aufgrund ihrer hohen PaSOD3-Aktivität effizient mitochondriales Superoxid. Dies führt zu einer hohen intrazellulären Wasserstoffperoxid-Menge. Zusätzliches Wasserstoffperoxid wirkt sich negativ auf die Lebensspanne aus. Paraquat im Kultivierungsmedium führt bei *PaSod3*_OEx1-Stämmen zu einer Lebensspannenverkürzung. Bei den untersuchten *PaSod3*_OEx3-Stämmen sterben etwa die Hälfte der Individuen auf Paraquat-haltigem Medium früher als der Wildtyp, die verbleibenden Individuen sind möglicherweise in der Lage, eine Art Resistenz gegenüber Paraquat auszubilden.

4.3.3 Kompensation des Verlustes der PaSOD3

Vor der Durchführung der Lebensspannenanalysen bestand die Vermutung, dass die Deletion von *PaSod3* gravierende Auswirkungen auf den entsprechenden Stamm haben könnte. Dies wäre darauf zurückzuführen, dass das primär in den Mitochondrien entstehende Superoxid nicht mehr effizient abgebaut werden und folglich zu zellulären Schäden führen kann. Aufgrund dieser Annahme wurde eine Verkürzung der Lebensspanne des Δ*PaSod3*-Stammes erwartet. Diese Hypothese wurde aber nicht bestätigt (Abbildung 18 sowie Zintel et al. 2010). Da die überwiegend cytoplasmatisch lokalisierte PaSOD1 in geringen Mengen in den Mitochondrien von *P. anserina* nachgewiesen werden kann (Zintel et al. 2010), sollte eine quantitative Untersuchung der PaSOD1-Proteinmenge in Mitochondrien des Δ*PaSod3*-Stammes Aufschluss darüber liefern, ob dies zu einer möglichen Kompensation des Verlustes von PaSOD3 führen könnte. Mikroskopische Studien von Δ*PaSod3-PaSod1::eGfp*-Stämmen lieferten keine deutlichen Hinweise darauf (Daten nicht gezeigt). Daher wurden im weiteren Verlauf Western Blot-Analysen durchgeführt. Diese gezielte Untersuchung der PaSOD1-Mengen in isolierten Mitochondrien von Wildtyp- und Δ*PaSod3*-Stämmen (Anhang Abbildung S48) zeigte eine Zunahme der PaSOD1-Menge in Δ*PaSod3*-Mutantenstämmen, welche aufgrund eines großen Standardfehlers allerdings nicht signifikant ist. Dies ist auch auf eine starke Schwankung der PaSOD1-Menge in den unterschiedlichen Δ*PaSod3*-Stämmen zurückzuführen.

Um herauszufinden, welche Faktoren neben der leicht vermehrten mitochondrialen PaSOD1-Menge für die Kompensation des Verlustes von PaSOD3 verantwortlich sein könnten, wurden Transkriptomanalysen durchgeführt. Dazu wurde von Frau Werner (AK Osiewacz) Gesamt-RNA von je drei Individuen von fünf bzw. 17 Tage alten Wildtypen bzw. Δ*PaSod3*-Stämmen isoliert. Die RNA wurde von der Firma LGC Genomics (Berlin) analysiert und die Zuordnung der Tags zu den *P. anserina*-Genen anhand der *P. anserina*-Genomseite (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) wurde von Herrn Gupta aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Thines (Biodiversität und Klima Forschungszentrum Frankfurt) durchgeführt. Nach der Normalisierung der Daten durch Herrn Philipp (AK Osiewacz) wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Transkripten selektioniert,

welche statistisch signifikant waren ($p \leq 0,05$) und eine um mindestens Faktor drei veränderte Expression in dem Δ*PaSod3*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp sowohl im juvenilen (fünf Tage) als auch im seneszenten (17 Tage) Stadium aufwiesen. Es wurden insgesamt 23 Transkripte identifiziert, welche hochreguliert (Anhang Tabelle S31) und 34 Transkripte gefunden, welche herunterreguliert (Anhang Tabelle S32) waren. In Tabelle 27 sind all jene Transkripte aufgelistet, denen eine Funktion zugeordnet werden konnte.

> Die Zuordnung einer putativen Funktion zu jedem Transkript erfolgte anhand der auf der *P. anserina*-Genomseite hinterlegten Annotation. War dort für ein Transkript keine Funktion hinterlegt wurde versucht, anhand einer GO-Analyse dem jeweiligen Transkript eine putative Funktion zuzuordnen. Die Zuordnung der meisten Gen-Ontologien erfolgte aufgrund von Homologievergleichen (BLAST-Analysen) mit anderen Spezies. Dafür wurde jede Gen-Ontologie eines anderen Organismus mit einem E-Wert von $\leq 1 \times e^{-20}$ als signifikant bewertet.

Neben den x-fachen Transkriptveränderungen von juvenilen Stämmen (Δ*PaSod3* versus Wildtyp) sind auch die Änderungen von seneszenten Stämmen aufgelistet. Die Gene der jeweilig veränderten Transkripte wurden – soweit möglich – verschiedenen Prozessen zugeordnet, welche in Tabelle 27 farblich markiert sind. Bei der genauen Betrachtung fällt auf, dass die fünf dem Energiemetabolismus zugeordneten Transkripte alle eine Hochregulation zeigen. Zudem sind die zwei an der Detoxifizierung beteiligten Gene sowie alle detektierten mitochondrialen ORFs („open reading frame“ offener Leserahmen) lediglich unter den hochregulierten Transkripten zu finden.

> Die meisten in den Mitochondrien lokalisierten Proteine werden im Nukleus kodiert, an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und in die Mitochondrien transportiert. Allerdings werden auch einige wenige Proteine, wie etwa eine Untereinheit der Cytochrom c-Oxidase, von mitochondrialer DNA kodiert und in demselben Kompartiment synthetisiert (Cummings et al. 1990). Neben den Proteinen kodiert die mtDNA auch für tRNAs und Ribosomen.

Im Gegensatz dazu wurden Gene, die mit Transport (vier), Zellwand (vier), Proteolyse (drei) oder DNA (zwei) in Verbindung gebracht werden, nur unter den herunterregulierten Transkripten nachgewiesen. Bei Betrachtung der Stoffwechselwege/Biosynthese zeigt sich ein geteiltes Bild: Sieben Transkripte, die mit diesen Prozessen in Zusammenhang gebracht werden, wiesen eine vermehrte und fünf eine verringerte Transkriptmenge in juvenilen und seneszenten Δ*PaSod3*-Stämmen im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp auf (Tabelle 27).

Anhand einer „GO-enrichment“ Analyse konnte die Funktion der Gene, deren Transkripte um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterreguliert waren, weiter eingegrenzt werden. Dazu wurde die Funktion jedes Gens in drei Gruppen unterteilt: Die zelluläre Komponente („cellular component“, CC), in dem es wirkt, der biologische Prozess („biological process“, BP), in den es involviert ist und die molekulare Funktion („molecular function“, MF), an der es mitwirkt. Jedem Gen konnte eine oder mehrere GO-Bezeichnung(en) in jeder dieser Gruppen zugewiesen werden, welche speziesübergreifend sind. Hinter jeder einzelnen GO-Bezeichnung, die zu einem spezifischen Gen passt, stecken zahlreiche weitere GO-Bezeichnungen, welche hierarchisch

Tabelle 27: Auflistung der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich Δ*PaSod3* juvenil (juv) vs. Wildtyp juvenil sowie Δ*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent. Es wurden jeweils die Werte der drei Individuen eines Stammes gemittelt und die Faktoren hier aufgeführt.

Transkript	Annotation	x-fach (juv)	x-fach (sen)	mögliche Funktion
Pa_1_14430	„Oxidoreductase activity, lipid metabolic process“	3	4,8	
Pa_1_22120	„Putative NAD(P)H-dependent oxidoreductase“	10,1	5,3	
Pa_2_11630	„Putative formate dehydrogenase, involved in methanol metabolism“	4,2	3,1	
Pa_2_50	„Putative protein similar to yrkC of *Bacillus subtilis*“	6,3	3,1	
Pa_4_2260	„cellular response to stress, cell wall“	3,9	3,7	
Pa_4_4860	„PaNAT2 Arylamine N-acetyltransferase“	3,7	5,9	
Pa_5_1390	„Putative mannose-6-phosphate isomerase“	4,1	3,8	
Pa_5_5720	„Putative pyruvate decarboxylase“	4,1	4,8	
Pa_5_8020	„Energy production and conversion“	4,2	3,2	
Pa_6_10330	„Putative polyketide synthase“	6,7	17	
Pa_6_10360	„Putative cytochrome P450 E-class, group I“	3,5	3,9	
Pa_7_1060	„CATP2 small subunit catalase“	4,6	3,6	
Pa_mito_cox3	„Cytochrome c oxidase subunit 3“	4,6	6,5	
Pa_mito_nad4	„NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4“	4,6	12,3	
Pa_mito_nad6	„NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6“	4,2	9,1	
Pa_mito_orf403	„Putative LAGLIDADG endonuclease/maturase“	9,2	9,2	
Pa_1_13230	„DNA-replication“	0,3	0,3	
Pa_1_13940	„apiose 1-reductase activity, DNA-binding“	0,3	0,2	
Pa_1_23640	„Putative efflux permease“	0,2	0,3	
Pa_1_5980	„Cell wall/membrane/envelope biogenesis“	0,2	0,3	
Pa_1_5990	„Putative glycoside hydrolase family 5“	0,2	0,3	
Pa_1_6000	„Putative cholinesterase precursor“	0,2	0,3	
Pa_1_620	„Putative glycosyltransferase family 2“	0,2	0,3	
Pa_1_800	„Putative endothiapepsin precursor “	0,3	0,3	
Pa_1_8290	„mat-specific pheromone precursor encoded by *mfm* “	0,1	0,1	
Pa_2_14110	„Putative alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase“	0,3	0,3	
Pa_2_7420	„Putative NAD(P)-binding protein involved in aflatoxin biosynthesis orthologous to *A. nidulans* stcO“	0,3	0,2	
Pa_2_7680	„Cell wall/membrane/envelope biogenesis, proteolysis, peptidase activity“	0,3	0,3	
Pa_3_2920	„IDI-1 precursor of cell wall protein“	0,2	0,2	
Pa_4_1240	„Putative methionine permease“	0,2	0,2	
Pa_4_3710	„Intracellular trafficking, secretion, vesicular transport“	0,3	0,2	
Pa_5_1420	„Putative glycoside hydrolase family 31“	0,2	0,3	
Pa_5_2330	„response to drug, peptidase activity, oxidoreductase activity, transcription, monooxygenase activity“	0,3	0,3	
Pa_5_4730	„Putative arylsulfatase“	0,1	0,3	
Pa_5_8880	„Inorganic ion transport and metabolism, metal ion transmembrane transporter activity“	0,3	0,2	
Pa_6_4110	„Putative HMG-box containing domain protein“	0,3	0,3	

	Energiemetabolismus		Zellwand
	Stoffwechsel/Biosynthese		Proteolyse/Abbau
	DNA		Detoxifizierung
	Transport		

angeordnet sind; diese werden also immer unspezifischer. All diese GO-Terme zusammen wurden für die Berechnung der „GO-enrichment“ Analyse verwendet. Daher kann diese Art der Untersuchung auch dazu genutzt werden, statistische Signifikanzen zu berechnen. Im Anhang in Tabelle S33 ist die Gesamtheit der „GO-enrichment“ Analyse für alle Transkripte aufgeführt, die eine um mindestens Faktor drei veränderte Expression im Δ*PaSod3*-Stamm im Vergleich zum

Wildtyp sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium aufwiesen und statistisch signifikant sind. Eine Übersicht mit den wichtigsten Angaben ist Tabelle 28 zu entnehmen.
Die Klassifizierung der differentiell regulierten Transkripte anhand ihrer GO-Bezeichnung zeigt, dass von den acht gefundenen zellulären Komponenten sieben hochreguliert werden und diese alle mit mitochondrialen Prozessen im Zusammenhang stehen, wie beispielsweise der Atmungskette sowie einzelnen Komponenten aus dieser (Tabelle 28). Die extrazelluläre Region konnte als einzige herunterregulierte zelluläre Komponente identifiziert werden. Bei den ermittelten biologischen Prozessen wurden lediglich Signifikanzen für hochregulierte Prozesse nachgewiesen. Dazu zählen u. a. die ATP-Synthese und damit verbundene Gene, wie die oxidative Phosphorylierung, die Antwort auf ROS und metabolische Prozesse. Dies spiegelt sich auch bei den vermehrt vorkommenden GO-Bezeichnungen der molekularen Funktion wider: Eine große Anzahl der gefundenen GO-Terme steht in Zusammenhang mit der NADH-Aktivität oder einer NADH- bzw. NADPH-spezifischen Oxidoreduktase-Aktivität. Abbauende Prozesse, Transporter und mit Pheromonen in Zusammenhang stehende Prozesse zeigen eine reduzierte Expression.

Tabelle 28: „GO-enrichment" Analyse der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich von Δ*PaSod3* mit dem Wildtyp im juvenilen und seneszenten Stadium. Die Rohdaten zur Erstellung der hier aufgeführten „GO-enrichment" Analyse sind Tabelle S31 und Tabelle S32 im Anhang zu entnehmen.

Zelluläre Komponente	**Regulation**
„mitochondrial respiratory chain"	hoch
„respiratory chain"	hoch
„mitochondrial respiratory chain complex I"	hoch
„respiratory chain complex I"	hoch
„NADH dehydrogenase complex"	hoch
„mitochondrial membrane part"	hoch
„mitochondrion"	hoch
„extracellular region"	herunter
Biologischer Prozess	**Regulation**
„ATP synthesis coupled electron transport"	hoch
„oxidative phosphorylation"	hoch
„respiratory electron transport chain"	hoch
„oxidation-reduction process"	hoch
„energy derivation by oxidation of organic compounds"	hoch
„mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport"	hoch
„electron transport chain"	hoch
„cellular biogenic amine catabolic process"	hoch
„generation of precursor metabolites and energy"	hoch
„amine catabolic process"	hoch
„cellular respiration"	hoch
„phosphorylation"	hoch
„response to hydrogen peroxide"	hoch
„intron homing"	hoch
„choline catabolic process"	hoch
„formate catabolic process"	hoch
„methylamine metabolic process"	hoch
„formate metabolic process"	hoch
„methanol oxidation"	hoch
„primary alcohol metabolic process	hoch
„mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone"	hoch
„cellular response to water stimulus"	hoch

„cellular response to water deprivation“	hoch
„response to water deprivation“	hoch
„response to water stimulus“	hoch
„response to reactive oxygen species“	hoch
„phosphorus metabolic process“	hoch
„phosphate-containing compound metabolic process“	hoch
„branched-chain amino acid metabolic process“	hoch
„NADH regeneration“	hoch
„aromatic amino acid family catabolic process to alcohol via Ehrlich pathway“	hoch
„cellular biogenic amine metabolic process“	hoch
„cellular amine metabolic process“	hoch
„GDP-mannose metabolic process“	hoch
„GDP-mannose biosynthetic process“	hoch
Molekulare Funktion	**Regulation**
„oxidoreductase activity“	hoch
„NADH dehydrogenase (quinone) activity“	hoch
„NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity“	hoch
„NADH dehydrogenase activity“	hoch
„oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, quinone or similar compound as acceptor“	hoch
„gluconate dehydrogenase activity“	hoch
„oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH“	hoch
„thiamine pyrophosphate binding“	hoch
„phenylpyruvate decarboxylase activity“	hoch
„heme binding“	hoch
„tetrapyrrole binding“	hoch
„pyruvate decarboxylase activity“	hoch
„mannose-6-phosphate isomerase activity“	hoch
„formate dehydrogenase (NAD+) activity“	hoch
„gluconate 2-dehydrogenase activity“	hoch
„coenzyme binding“	hoch
„glucan 1,4-alpha-glucosidase activity“	herunter
„neutral amino acid transmembrane transporter activity“	herunter
„mating pheromone activity“	herunter
„N-acetylglucosamine-6-sulfatase activity“	herunter
„pheromone activity“	herunter
„apiose 1-reductase activity“	herunter
„L-amino acid transmembrane transporter activity“	herunter
„arylsulfatase activity“	herunter

Zusammenfassend lassen die Daten darauf schließen, dass in der Δ*PaSod3*-Mutante mit der Elektronentransportkette der Mitochondrien in Verbindung stehende Prozesse hochreguliert werden, während extrazelluläre Prozesse herunterreguliert werden. Dies deutet eine durch Energie-abhängige Prozesse ablaufende Kompensation des Verlustes der PaSOD3 an. Dieses Zusammenspiel ist vermutlich dafür verantwortlich, dass der Δ*PaSod3*-Stamm keine augenscheinlichen Defizite aufweist.

4.4 Die Wirkung von Mangan auf *PaSod3*-Mutantenstämme

4.4.1 Einfluss auf Wuchsverhalten, Fertilität und Stressresistenz

Während sich die Deletion der *PaSod3* aufgrund von hochregulierten Mitochondrienfunktionen oder anderen Schutzenzymen in keinem offenkundigen Defizit äußert, sind die negativen

Auswirkungen einer erhöhten PaSOD3-Menge auf den ersten Blick nur schwer erklärbar. In früheren Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass *PaSod3*_OEx2-Stämme eine erhöhte Wasserstoffperoxid-Ausstoßrate aufweisen (Kowald et al. 2012). Neben der schädlichen Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Zelle wäre auch denkbar, dass die Versorgung mit Mangan als Co-Faktor der PaSOD3 eine limitierende Rolle in den *PaSod3*_OEx-Stämmen spielt, da die erhöhte PaSOD3-Menge das in geringen Konzentrationen im Medium vorhandene Mangan vollständig abfangen könnte. Standardmäßig enthält das M2-Medium nur Spuren von Mangan (296 nM $MnSO_4$). Dies könnte zu einem Mangan-Mangel in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen führen. Um zu untersuchen, ob in diesen Stämmen Mangan limitiert ist, wurden Supplementationsexperimente mit verschiedenen Konzentrationen Mangansulfat in dem semisynthetischen M2-Medium durchgeführt (Abbildung 20).

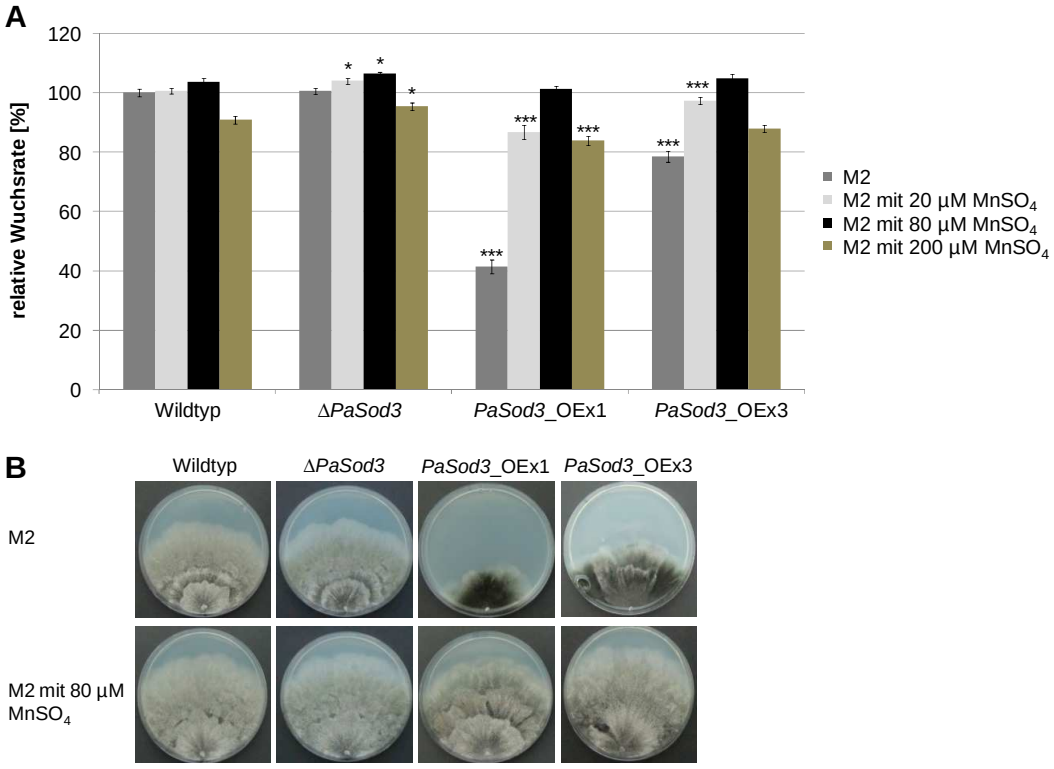


Abbildung 20: Analyse des Wuchsverhaltens des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium sowie M2-Medium mit verschiedenen $MnSO_4$-Konzentrationen. A: Graphische Darstellung der relativen Wuchsraten des Wildtyps (n = 31) sowie der Δ*PaSod3*- (n = 26), *PaSod3*_OEx1- (n = 24) und *PaSod3*_OEx3-Stämme (n = 36) auf M2-Medium sowie M2-Medium supplementiert mit 20 µM, 80 µM oder 200 µM $MnSO_4$. Die Wuchsraten wurden nach vier Tagen Inkubation auf dem entsprechenden Medium bei 27 °C und Dauerlicht bestimmt und relativ zum Wildtyp auf M2-Medium berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet. **B:** Phänotypische Untersuchung des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutantenstämme auf M2-Medium sowie auf M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$ nach zwölf Tagen Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Wie aus Abbildung 20 A hervorgeht, führte die Supplementation des Mediums mit 20 µM oder 80 µM $MnSO_4$ bei dem Wildtyp zu keiner relevanten Veränderung der Wuchsrate. Bei der verwendeten Konzentration von 200 µM $MnSO_4$ wurde hingegen bereits eine negative Auswirkung beobachtet. Diese wuchshemmende Wirkung von 200 µM $MnSO_4$ war auch für die *PaSod3*-Mutantenstämme nachweisbar (Abbildung 20 A).

Mangan ist ein essentielles Spurenelement, welches für die Funktionalität/Aktivität verschiedener Enzyme und Prozesse unabdingbar ist. Zu hohe Konzentrationen dieses Elements können allerdings toxisch wirken (Chtourou et al. 2011). Daher ist eine genaue Regulation des Mangan-Haushaltes wichtig (siehe Kapitel 1.5).

Die Deletionsmutante wies auf allen mit Mangan supplementierten Medien eine etwas bessere Wuchsrate als der Wildtyp auf, wobei bei der höchsten verwendeten Konzentration ebenfalls eine wuchshemmende Wirkung zu erkennen war. Die beiden unabhängigen *PaSod3*_OEx-Stämme, *PaSod3*_OEx1 und *PaSod3*_OEx3, zeigten auf M2-Medium eine, relativ zum Wildtyp, um 59 % bzw. 22 % signifikant verringerte Wuchsrate. Im Vergleich zu der bei Supplementation mit 20 µM sowie 80 µM $MnSO_4$ bei dem Wildtyp sowie der Δ*PaSod3*-Mutante geringen Wuchsraten-steigerung wirkte sich dies auf die *PaSod3*_OEx-Stämme wesentlich stärker aus: Bereits 20 µM $MnSO_4$ im Medium führten zu einer deutlichen Steigerung der Wuchsrate. Die Verwendung von 80 µM $MnSO_4$ resultierte sogar in der Wildtyp-Wuchsrate für die *PaSod3*_OEx-Stämme. Somit konnte die größte Steigerung der Wuchsrate auf M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$ nachgewiesen werden (Abbildung 20 A). Auch die Supplementation mit 80 µM $MnCl_2$ statt mit 80 µM $MnSO_4$ konnte ähnliche positive Effekte auf die Wuchsraten der *PaSod3*_OEx-Stämme hervorrufen (Anhang Abbildung S49), sodass Mangan und nicht der Substituent die limitierende Komponente darstellt. Die Supplementation des M2-Mediums mit Mangansulfat ist nicht nur in der Lage das Wuchsdefizit der *PaSod3*_OEx-Stämme zu kompensieren, sondern auch den Wildtyp-Phänotyp, bezogen auf die Pigmentierung sowie die Bildung von Luftmyzel, wiederherzustellen (Abbildung 20 B). In den folgenden Experimenten wurde daher Medium (fest oder flüssig) ohne zusätzliches Mangan (Bezeichnung „M2“) oder mit Zugabe von jeweils 80 µM $MnSO_4$ (Bezeichnung „M2(+)“) verwendet.

Neben dem veränderten Phänotyp und der Wuchsrate der *PaSod3*_OEx-Stämme wurde auch die Fertilität des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Mutanten auf M2- bzw. M2(+)-Medium untersucht (Abbildung 21).

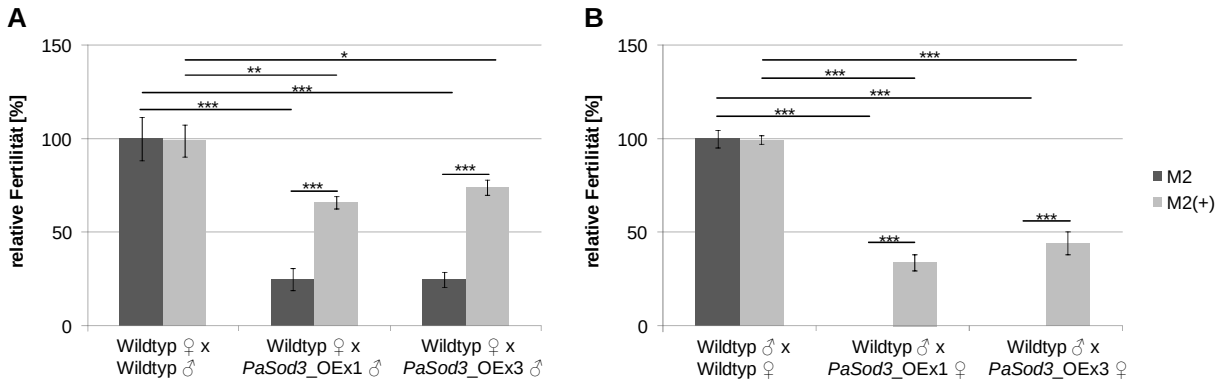


Abbildung 21: Fertilität des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2- und M2(+)-Medium. Es wurde sowohl **A:** die männliche (jeweils 2 biologische und 3 technische Replikate) als auch **B:** die weibliche Fertilität (jeweils 2 - 3 biologische und 4 technische Replikate) zwischen zwei kompatiblen Wildtypen sowie zwischen dem Wildtyp und jeweils einem kompatiblen *PaSod3*_OEx-Stamm auf M2- und M2(+)-Medium bestimmt. Die Anzahl der gebildeten Perithezien bei einer Wildtyp-Spermatisierung auf M2-Medium wurde auf 100 % gesetzt und die verbleibenden Werte relativ dazu berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet.

Aus Abbildung 21 wird deutlich, dass die getesteten Medien keinen Einfluss auf die Fertilität des Wildtyps hatten. Die Spermatisierung eines Wildtyps und einer *PaSod3*_OEx-Mutante, beide kultiviert auf M2, zeigte hingegen gravierende Auswirkungen: Die männliche Fertilität der *PaSod3*_OEx-Stämme, gemessen an der relativen Anzahl gebildeter Perithezien, war auf ein Viertel reduziert (Abbildung 21 A). Zudem waren diese Stämme weiblich steril (Abbildung 21 B). Die Anzucht auf M2(+) resultierte in einer Steigerung der relativen Anzahl an Perithezien: Die männliche Fertilität erreichte Werte von 67 % bzw. 74 % (Abbildung 21 A), die weibliche Fertilität von 34 % sowie 44 % (Abbildung 21 B) für *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stämme. Zwar war die männliche und die weibliche Fertilität für *PaSod3*-überexprimierende Stämme durch Zugabe mit 80 µM $MnSO_4$ zum Medium verbessert, die Wildtyp-Fertilität wurde aber nicht erreicht.
Insgesamt führt die Supplementation des Mediums mit Mangansulfat dazu, dass für *PaSod3*_OEx-Stämme sowohl der Wildtyp-Phänotyp als auch eine mit dem Wildtyp vergleichbare Wuchsrate erreicht wird. Die eingeschränkte Fertilität der *PaSod3*-überexprimierenden Stämme kann durch $MnSO_4$ zwar verbessert, aber nicht bis auf das Wildtyp-Level revertiert werden.

Zum besseren Verständnis, wie es durch $MnSO_4$ zu der in Abbildung 20 A gezeigten Wachstumsverbesserung kommt, wäre eine Analyse mit Hilfe eines Mangan-Chelators optimal, um das vorhandene Mangan, und damit die biologische Verfügbarkeit auch von Spuren des Metalls, zu vermindern. Allerdings ist bisher in der Literatur kein für Mangan-spezifischer Chelator bekannt.

> Ein Chelator (gr.: „chelos“ krallen) ist ein Molekül, dass reversibel an andere Moleküle, meist Metalle, binden kann, und sie so in Lösung hält. Damit stehen diese Metalle für biologische Reaktionen nicht mehr zur Verfügung. Eine Voraussetzung dafür ist, dass das reaktive Metallion eine höhere Affinität zu dem komplexierenden Chelator als zu den biologisch sensitiven Molekülen hat (Aaseth et al. 2014, Sitzmann 2006).

Um trotz fehlendem spezifischen Mangan-Chelator einen Hinweis zu erhalten, ob der Effekt auf das Wuchsverhalten von *PaSod3*_OEx-Stämmen Mangan-spezifisch ist, oder auf einen generellen Mangel an zweiwertigen Ionen zurückzuführen ist, wurden Wuchsanalysen mit zweiwertigen Ionen in Form von Magnesiumsulfat ($MgSO_4$) (Abbildung 22 A) und Zinksulfat ($ZnSO_4$) (Abbildung 22 B) durchgeführt. Dazu wurden dem M2-Medium, welches für gewöhnlich 1 mM $MgSO_4$ x 7 H_2O und 17 µM $ZnSO_4$ x 7 H_2O enthält, verschiedene Konzentrationen $MgSO_4$ bzw. $ZnSO_4$ zugegeben.
Wie in Abbildung 22 A und B zu erkennen ist, führte weder die Supplementation mit Magnesium- noch mit Zinksulfat zu einem positiven Effekt auf die Wuchsrate der getesteten Stämme. Bereits bei der geringsten verwendeten Konzentration an Magnesiumsulfat oder Zinksulfat zeigte der Wildtyp eine verringerte Wuchsrate. Dies war in vergleichbarem Ausmaß auch für die *PaSod3*-Deletionsmutante nachweisbar. Zwar resultierte die Supplementation mit $MgSO_4$ bzw. $ZnSO_4$ in keiner deutlichen Reduktion der relativen Wuchsraten der *PaSod3*_OEx-Stämme, allerdings

konnte auch kein positiver Effekt, wie durch $MnSO_4$ (Abbildung 20 A), nachgewiesen werden. Folglich konnte der durch Mangan-Supplementation hervorgerufene positive Effekt auf die Wuchsrate von *PaSod3*_OEx-Stämmen nicht durch die hier getesteten zweiwertigen Ionen nachgeahmt werden.

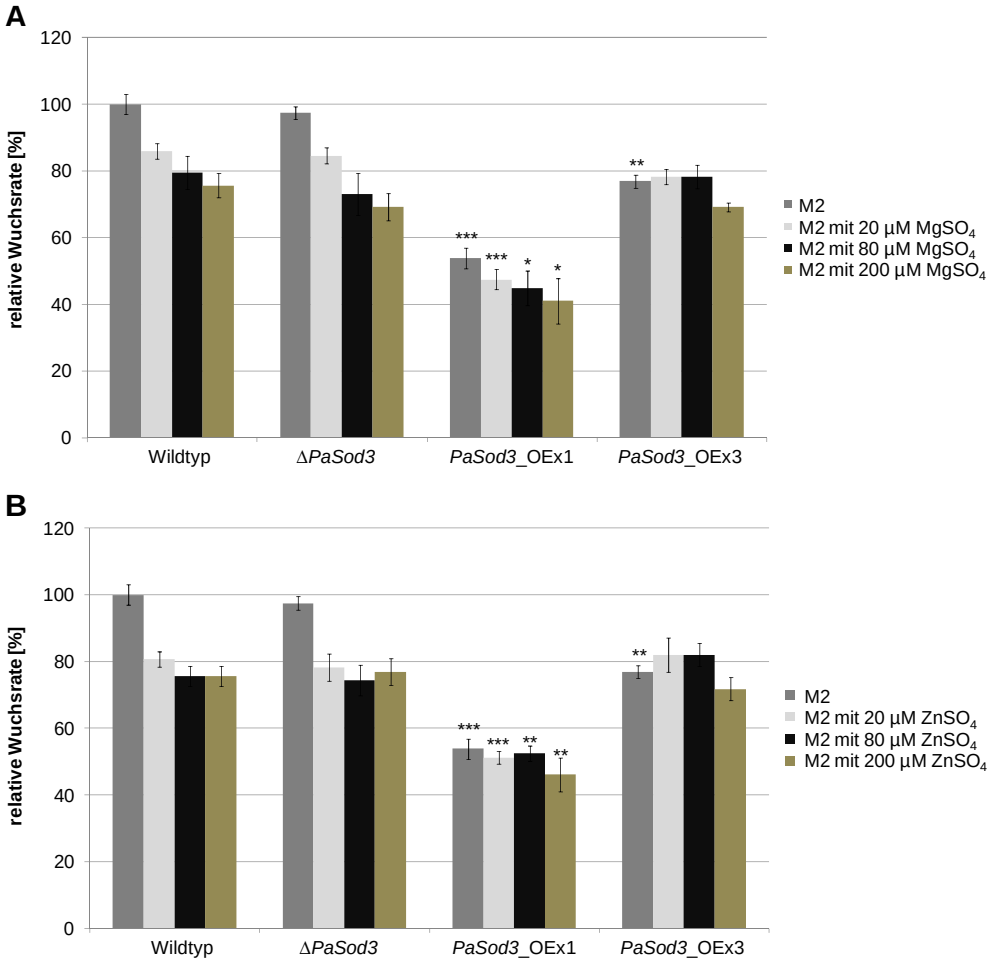


Abbildung 22: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps sowie der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium und M2-Medium supplementiert mit $MgSO_4$- sowie $ZnSO_4$. Graphische Darstellung der relativen Wuchsraten des Wildtyps sowie der Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme (je n = 4) auf M2-Medium und M2-Medium mit zusätzlich 20 µM, 80 µM oder 200 µM **A:** $MgSO_4$ bzw. **B:** $ZnSO_4$. Die Wuchsraten wurden nach vier Tagen Inkubation auf dem entsprechenden Medium bei 27 °C und Dauerlicht bestimmt und relativ zum Wildtyp auf M2-Medium berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$). Ferner ist der jeweilige Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

In der Literatur werden verschiedene Antioxidantien beschrieben. Die Gabe solcher Antioxidantien kann sich auf unterschiedliche Weise, etwa durch eine reduzierte Lipidperoxidation (Georgiou und Petropoulou 2001), positiv auf den untersuchten Organismus auswirken. Z. B. für Supplementationsexperimente mit L-Ascorbinsäure wurden lebensverlängernde Effekte für *C. elegans* und Mäuse nachgewiesen (Bezlepkin et al. 1996, Shibamura et al. 2009). Um zu analysieren, ob Antioxidantien einen vergleichbaren Effekt auf die *PaSod3*_OEx-Stämme haben wie 80 µM $MnSO_4$, wurden Wuchsratenanalysen auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen der in der Literatur beschriebenen Antioxidantien L-Ascorbinsäure (AA) sowie N-Acetyl-L-Cystein (NAC) durchgeführt (Abbildung 23).

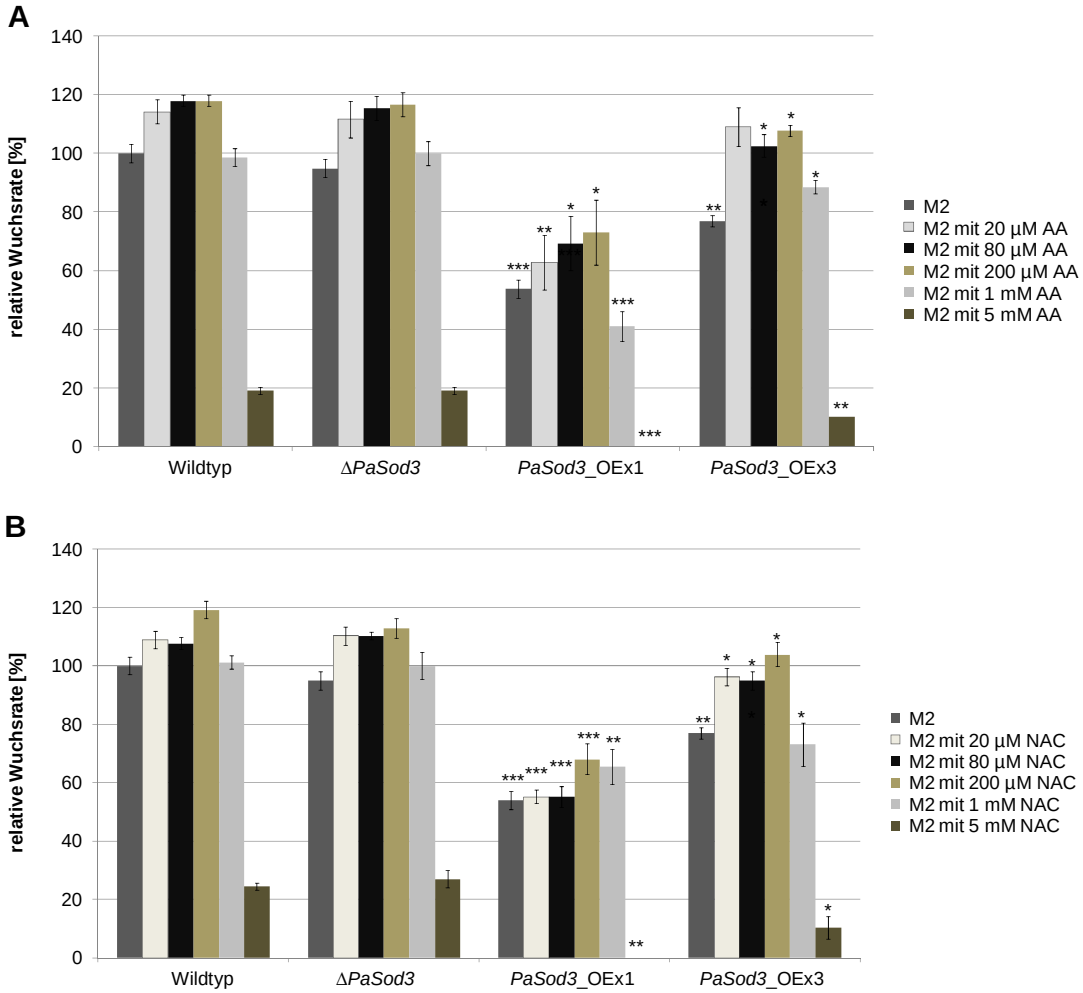


Abbildung 23: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutanten auf M2-Medium mit verschiedenen Konzentrationen L-Ascorbinsäure bzw. N-Acetyl-L-Cystein. Graphische Darstellung der relativen Wuchsraten des Wildtyps, sowie der Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme (je n = 4) auf M2-Medium und M2-Medium mit 20 µM, 80 µM, 200 µM, 1 mM sowie 5 mM **A:** L-Ascorbinsäure (AA) bzw. **B:** N-Acetyl-L-Cystein (NAC). Die Wuchsraten wurden nach vier Tagen Inkubation auf dem entsprechenden Medium bei 27 °C und Dauerlicht bestimmt und relativ zum Wildtyp auf M2-Medium berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Aus den Wuchsratenanalysen auf M2-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen bekannter Antioxidantien geht hervor, dass sowohl AA (Abbildung 23 A) als auch NAC (Abbildung 23 B) bis zu einer Konzentration von 200 µM die Wuchsrate des Wildtyps steigern können. Ähnliches ist auch für den Δ*PaSod3*-Stamm erkennbar. Für *PaSod3*_OEx-Stämme wurde, im Vergleich zu den selben Stämmen auf M2-Medium, ebenfalls eine Zunahme der relativen Wuchsraten auf Medium mit AA und NAC bis zu einer Konzentration von jeweils 200 µM nachgewiesen, jedoch ist der in Abbildung 23 gezeigte positive Effekt keinesfalls vergleichbar mit dem durch $MnSO_4$-Supplementation hervorgerufenen (Abbildung 20).

Beide untersuchten Antioxidantien sind demnach nicht in der Lage die Wildtyp-Wuchsrate für *PaSod3*_OEx-Stämme wiederherzustellen, wie es durch Mangansulfat möglich ist. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass $MnSO_4$ nicht wie ein generelles Antioxidans auf *PaSod3*_OEx-Stämme wirkt.

4.4.2 Beeinflussung der Lebensspanne

Um die Wirkung von Mangan auf die Alterung von *PaSod3*-Mutantenstämme genauer zu analysieren, wurden Lebensspannenanalysen auf M2- (Abbildung 24 A) bzw. M2(+)-Medium (Abbildung 24 B) durchgeführt.

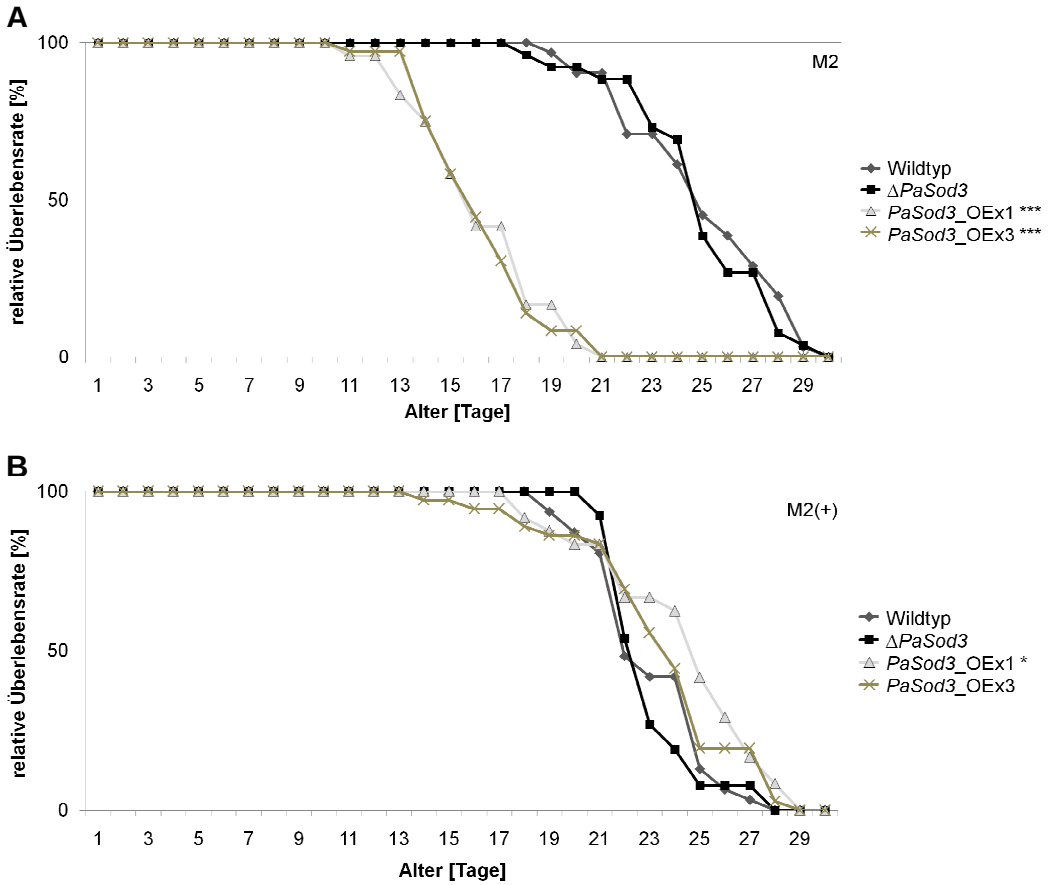


Abbildung 24: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutanten auf M2- bzw. M2(+)-Medium. Die relativen Überlebensraten des Wildtyps (n = 31) sowie der Δ*PaSod3*- (n = 26), *PaSod3*_OEx1- (n = 24) und *PaSod3*_OEx3-Stämme (n = 36) auf **A:** M2-Medium resultierten in medianen Lebensspannen von 24,7 Tagen, 24,6 Tagen, 15,5 Tagen und 15,6 Tagen für den Wildtyp, Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1 bzw. *PaSod3*_OEx3. Die maximalen Lebensspannen betrugen 30 Tage für den Wildtyp sowie den Δ*PaSod3*-Stamm und je 21 Tage für beide *PaSod3*_OEx-Stämme. **B:** Die Analyse der relativen Überlebensraten auf M2(+)-Medium führte zu medianen Lebensspannen von 22 Tagen, 22,1 Tagen, 24,6 Tagen und 23,5 Tagen für den Wildtyp, den Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- bzw. *PaSod3*_OEx3-Stamm. Die maximalen Lebensspannen betrugen 28 Tage für den Wildtyp sowie den Δ*PaSod3*-Stamm und je 29 Tage für die *PaSod3*_OEx-Stämme. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Wilcoxon Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$) (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Aus den Lebensspannenanalysen (Abbildung 24) geht hervor, dass der Wildtyp und die Δ*PaSod3*-Mutante sich sowohl auf M2- als auch auf M2(+)-Medium nicht voneinander unterschieden. Im Gegensatz dazu zeigten die *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2 eine signifikant verkürzte Lebensspannen (mediane Lebensspannen: Wildtyp: 24,7 Tage, *PaSod3*_OEx1: 15,5 Tage, *PaSod3*_OEx3: 15,6 Tage). Allerdings war es möglich diese Kurzlebigkeit durch die Zugabe von 80 µM $MnSO_4$ zu dem verwendeten M2-Medium vollständig auf Wildtyp-Niveau zu revertieren (mediane Lebensspannen: Wildtyp: 22 Tage, *PaSod3*_OEx1: 24,6 Tage, *PaSod3*_OEx3: 23,5 Tage). Somit wies keiner der *PaSod3*-Mutantenstämme auf M2(+)-Medium

eine verkürzte Lebensspanne auf. Im Gegenteil zeigte der *PaSod3*_OEx1-Stamm sogar eine Lebensverlängerung um ~ 12 % im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 24 B).

Um auszuschließen, dass $MnSO_4$ einen generellen positiven Einfluss auf kurzlebige *P. anserina*-Stämme hat, wurden Lebensspannenanalysen auf M2- und M2(+)-Medium mit im Arbeitskreis bekannten kurzlebigen Mutantenstämmen, dem *PaCypD*_OEx- (Brust 2011) sowie dem Δ*PaMth1*-Stamm (Kunstmann 2009), durchgeführt.

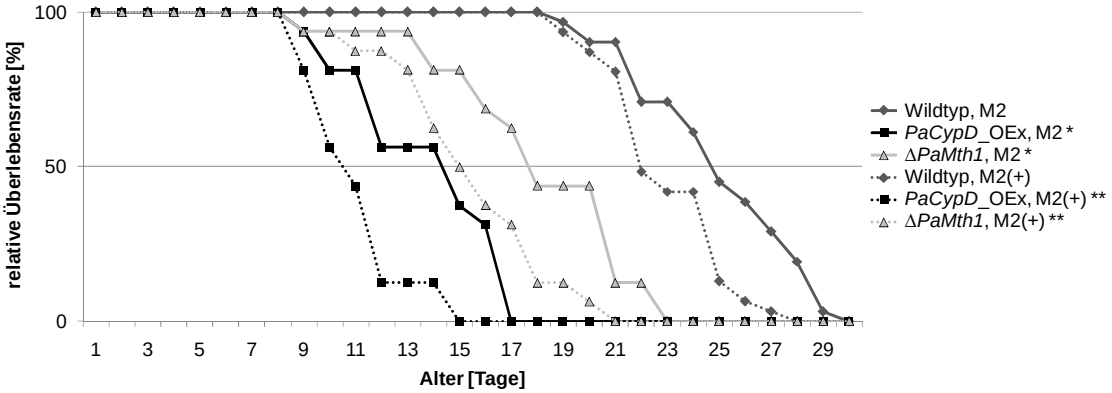


Abbildung 25: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps sowie der *PaCypD*_OEx- und Δ*PaMth1*-Stämme auf M2- bzw. M2(+). Die relativen Überlebensraten des Wildtyps (n = 31) sowie der *PaCypD*_OEx- (n = 16) und Δ*PaMth1*-Stämme (n = 16) auf M2-Medium resultierten in medianen Lebensspannen von 24,7 Tagen, 14,3 Tagen bzw. 17,7 Tagen. Die maximalen Lebensspannen betrugen 30 Tage für den Wildtyp, 17 Tage für *PaCypD*_OEx sowie 23 Tage für Δ*PaMth1*. Die Analyse auf M2(+)-Medium resultierte in medianen Lebensspannen von 22 Tagen, 10,5 Tagen und 15 Tagen für den Wildtyp, *PaCypD*_OEx bzw. Δ*PaMth1*. Die maximalen Lebensspannen auf M2(+) betrugen 28 Tage für den Wildtyp, 15 Tage für *PaCypD*_OEx sowie 21 Tage für Δ*PaMth1*. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Wilcoxon Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$) (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Die Analyse der relativen Überlebensraten dieser kurzlebigen Mutanten (Abbildung 25) zeigte neben einer signifikant verkürzten Lebensspanne auf M2-Medium im Vergleich zum Wildtyp (mediane Lebensspannen: Wildtyp: 24,7 Tage, *PaCypD*_OEx: 14,3 Tage, Δ*PaMth1*: 17,7 Tage) eine nochmalige Reduktion um weitere 3 - 4 Tage bei Kultivierung auf M2(+)-Medium (mediane Lebensspannen: Wildtyp: 22 Tage, *PaCypD*_OEx: 10,5 Tage, Δ*PaMth1*: 15 Tage).
Dieser Befund deutet darauf hin, dass Mangansulfat keinen generellen positiven Effekt auf kurzlebige *P. anserina*-Stämme aufweist, sondern selektiv vorteilhaft auf *PaSod3*_OEx-Stämme wirkte.

4.4.3 Einfluss von Mangan auf die PaSOD-Aktivität

Da *PaSod3*_OEx-Stämme einen sehr positiven Effekt auf die Supplementation des Anzuchtmediums mit Mangansulfat aufwiesen, sollte im Weiteren herausgefunden werden, welche molekularen Mechanismen daran beteiligt sind. Zunächst sollte geklärt werden, ob sich die Kultivierung von *PaSod3*_OEx-Stämmen auf Medium mit zusätzlichem Mangan in einer Steigerung der Mangan-abhängigen SOD-Aktivitäten äußern würde. Zu diesem Zweck wurden

die PaSOD-Aktivitäten unter verschiedenen Anzuchtbedingungen (M2 bzw. M2(+)) mit einem SOD-Aktivitäts-Kit bestimmt (Abbildung 26).

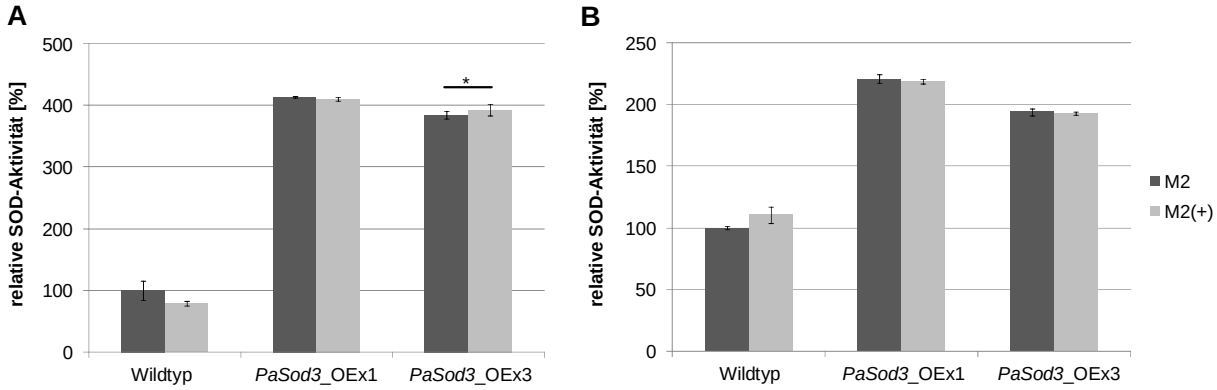


Abbildung 26: Bestimmung der relativen SOD-Aktivitäten von mitochondrialen Proteinextrakten bzw. Gesamtproteinextrakten. Graphische Darstellung der relativen Gesamt-SOD-Aktivitäten von **A:** mitochondrialen Proteinextrakten (Wildtyp: n = 3, *PaSod3*_OEx1 und *PaSod3*_OEx3: je n = 2) sowie **B:** Gesamtproteinextrakten (je n = 3) der angegebenen Stämme nach Anzucht auf M2- bzw. M2(+)-Medium. Die Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte gemittelt. Die SOD-Aktivitäten des Wildtyps auf M2-Medium wurden auf 100 % gesetzt und die verbleibenden Stämme relativ dazu berechnet. Signifikante Unterschiede zwischen demselben Stamm auf M2 bzw. M2(+) wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

In Abbildung 26 ist die Bestimmung der Gesamt-SOD-Aktivitäten von isolierten Mitochondrien (A) bzw. unter Verwendung von Gesamtproteinextrakten (B) dargestellt. Für den Wildtyp konnten keine signifikanten Unterschiede in den PaSOD-Aktivitäten zwischen den beiden verwendeten Anzuchtbedingungen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wiesen mitochondriale Extrakte der *PaSod3*_OEx-Stämme aufgrund ihrer genetischen Veränderung eine etwa 4-fach höhere SOD-Aktivität als der Wildtyp auf (Abbildung 26 A). Ferner zeigte sich, dass die Supplementation des Mediums mit 80 µM $MnSO_4$ lediglich zu einer Steigerung der SOD-Aktivität von mitochondrialen Proteinextrakten des *PaSod3*_OEx3-Stammes, nicht aber des *PaSod3*_OEx1-Stammes, führte. Hingegen wiesen Messungen mit Gesamtproteinextrakten keine signifikanten Veränderungen der SOD-Aktivitäten weder im Wildtyp noch in den *PaSod3*_OEx-Stämmen auf, wenn die Kultivierung auf M2 mit M2(+) verglichen wurde (Abbildung 26 B).

Somit führt die Supplementation mit Mangan für den *PaSod3*_OEx3-Mutantenstamm zu einer weiteren Erhöhung der PaSOD3-Aktivität; für die verbleibende MnSOD, PaSOD2, konnte keine veränderte Aktivität nachgewiesen werden.

4.4.4 Die Rolle von Mangan bei der Regulation der Wasserstoffperoxid-Menge

Aus Abbildung 26 ist ersichtlich, dass die *PaSod3*_OEx-Stämme aufgrund ihrer genetischen Veränderung eine deutlich höhere SOD-Aktivität als der Wildtyp aufweisen. Diese resultiert in einer gesteigerten Wasserstoffperoxid-Menge, dem Produkt der durch SODs katalysierten Reaktion. Um zu untersuchen, wie stark sich die vermehrte Expression von *PaSod3* auf die Wasserstoffperoxid-Menge auswirkt, und ob dies in einer veränderten Aktivität Wasserstoff-peroxid-entgiftender Enzyme deutlich wird, wurde der Wasserstoffperoxid-Ausstoß bestimmt.

Dazu fand eine Färbung von Myzel auf Platten (Abbildung 27 A), sowie eine photometrische Messung von Myzelstücken definierter Größe (Abbildung 27 B), jeweils mit einer Diaminobenzidin (DAB)-Färbelösung, Anwendung.

> Für die Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Ausstoßrate wird eine DAB-Lösung verwendet, mit der das Myzel überschichtet wird. In Anwesenheit von Wasserstoffperoxid wird DAB oxidiert, was zu der Bildung eines dunkelbraunen Präzipitats führt. Dieses kann als Maß für die Menge vorhandenen Wasserstoffperoxids verwendet werden (Munkres 1990).

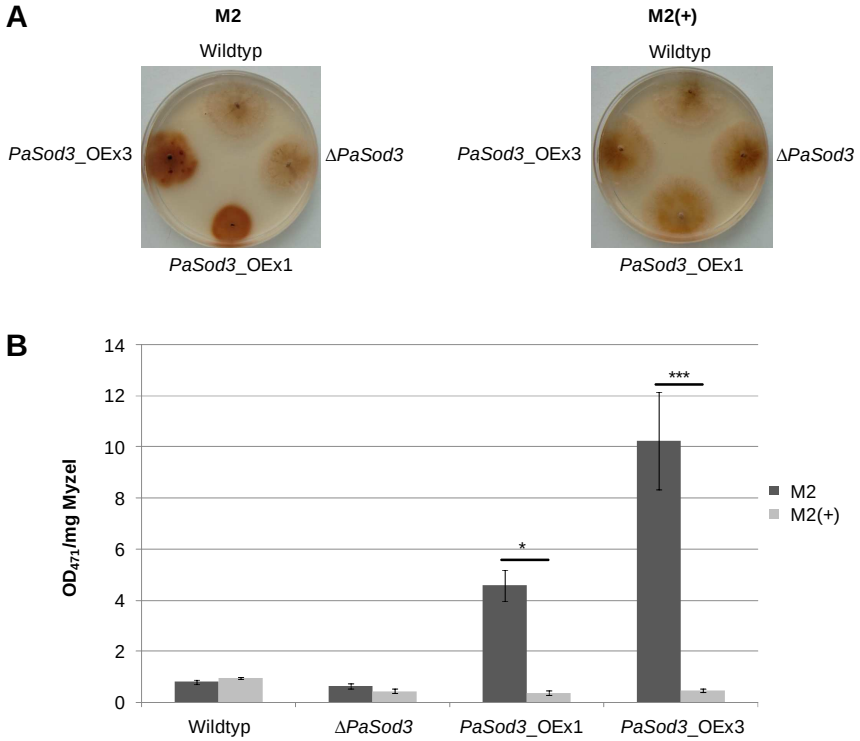


Abbildung 27: Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2- sowie M2(+)-Medium. A: Der Wildtyp sowie die *PaSod3*-Mutantenstämme wurden auf M2- bzw. M2(+)-Medium für vier Tage im Dunkeln angezogen und anschließend einer DAB-Färbung unterzogen. Die Stärke der Braunfärbung des Myzels entspricht der ausgestoßenen H_2O_2-Menge. **B:** Darstellung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (OD_{471}/mg Myzel). Die Wasserstoffperoxid-Ausstoßrate des Wildtyps sowie der Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx-Stämme (je n = 4) auf M2- bzw. M2(+)-Medium wurde photometrisch bestimmt und relativ zum jeweiligen Trockengewicht berechnet. Die Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte gemittelt. Der Wildtyp, angezogen auf M2, wurde auf 1 gesetzt und die verbleibenden Werte relativ dazu berechnet. Signifikante Unterschiede zum selben Stamm auf den unterschiedlichen Medien wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$, ** $p \leq 0{,}01$ und *** $p \leq 0{,}001$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Die DAB-Färbung von Myzel (Abbildung 27 A) zeigt keine Unterschiede im Wasserstoffperoxid-Ausstoß zwischen Wildtyp und Δ*PaSod3*-Stamm auf M2 sowie auf M2(+). Im Gegensatz dazu ist klar zu erkennen, dass es bei Anzucht der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2-Medium zu einem deutlich gesteigerten Wasserstoffperoxid-Ausstoß kam – sichtbar an der dunkleren Braunfärbung. Dies war bei Anzucht derselben Stämme auf M2(+)-Medium nicht mehr nachweisbar. Zur quantitativen Bestimmung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (Abbildung 27 B) fand eine photometrische Messung mit Myzel und einer DAB-Lösung Anwendung. Aus dieser geht hervor, dass bei Anzucht des Wildtyps oder der *PaSod3*-Deletionsmutante die Zugabe von Mangansulfat zu keinen Veränderungen der ausgestoßenen Wasserstoffperoxid-Menge führte, wie bereits aus

Abbildung 27 A vermutet wurde. Für *PaSod3*-überexprimierende Stämme resultierte die Anzucht auf Medium ohne Supplementation in einer 5-fachen (*PaSod3*_OEx1) bzw. in einer 10-fachen (*PaSod3*_OEx3) Steigerung der ausgestoßenen Wasserstoffperoxid-Menge. Die Kultivierung derselben Stämme auf mit Mangan supplementiertem Medium revertierte diesen erhöhten H_2O_2-Ausstoß wieder auf Wildtyp-Niveau. Es deutet sich damit an, dass Mangan eine Rolle bei der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid in *PaSod3*_OEx-Stämmen spielt.

Um zu untersuchen, ob die Mangan-Gabe eine Veränderung in der Proteinmenge von Peroxiredoxin, einem am Wasserstoffperoxid-Abbau beteiligten Protein, hervorruft, wurden Western Blot-Analysen mit mitochondrialen Proteinextrakten von Stämmen, angezogen auf M2 oder M2(+), mit einem gegen Peroxiredoxin gerichteten Antikörper durchgeführt (Abbildung 28).

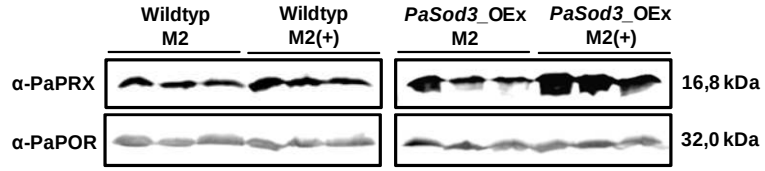


Abbildung 28: Western Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinextrakten des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). Es wurden jeweils 100 µg mitochondriale Proteinextrakte vom Wildtyp sowie von den *PaSod3*_OEx-Stämmen (je n = 3), angezogen auf M2- bzw. M2(+)-Medium, in 16 %igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und Peroxiredoxin (PaPRX) (16,8 kDa) mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente Porin (PaPOR) (32 kDa). Die verwendeten Antikörper sind auf der linken und die Größen der nachgewiesenen Proteine auf der rechten Seite aufgeführt (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Die Western Blot-Analysen zeigen nur eine gering veränderte PaPRX-Proteinmenge bei dem Wildtyp von M2 bzw. M2(+) (Abbildung 28). Im Gegensatz dazu war eine deutlich gesteigerte PaPRX-Menge bei *PaSod3*_OEx-Stämmen, welche auf M2(+) statt auf M2 angezogen wurden, detektierbar. Dies lässt die Vermutung zu, dass Peroxiredoxin an der Reduktion von intrazellulärem Wasserstoffperoxid in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2(+)-Medium beteiligt ist. Jedoch erklärt die hier gezeigte Zunahme der PaPRX-Proteinmenge in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2(+) keinesfalls den drastischen Rückgang des in Abbildung 27 gezeigten H_2O_2-Ausstoßes in diesen Stämmen.

Um zu analysieren, ob die Mangan-Supplementation auch einen Einfluss auf die Aktivität von Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzymen nach sich zieht, wurden Peroxidase- und Katalase-Aktivitätsgele angefertigt. Dazu mussten Gesamtproteinextrakte der Stämme, angezogen auf M2 oder M2(+), auf nativen Gelen aufgetrennt und Aktivitätsfärbungen unterzogen werden. Wie in Abbildung 29 zu sehen ist, führte die Anzucht des Wildtyps auf M2 bzw. M2(+) zu keinen veränderten Aktivitäten der Peroxidasen und Katalasen. Hingegen konnte eine leichte Steigerung der Aktivität sowohl der Peroxidasen als auch der Katalasen von *PaSod3*_OEx-Stämmen bei Anzucht mit Mangan-Supplementation im Vergleich zu nicht supplementiertem Medium nachgewiesen werden.

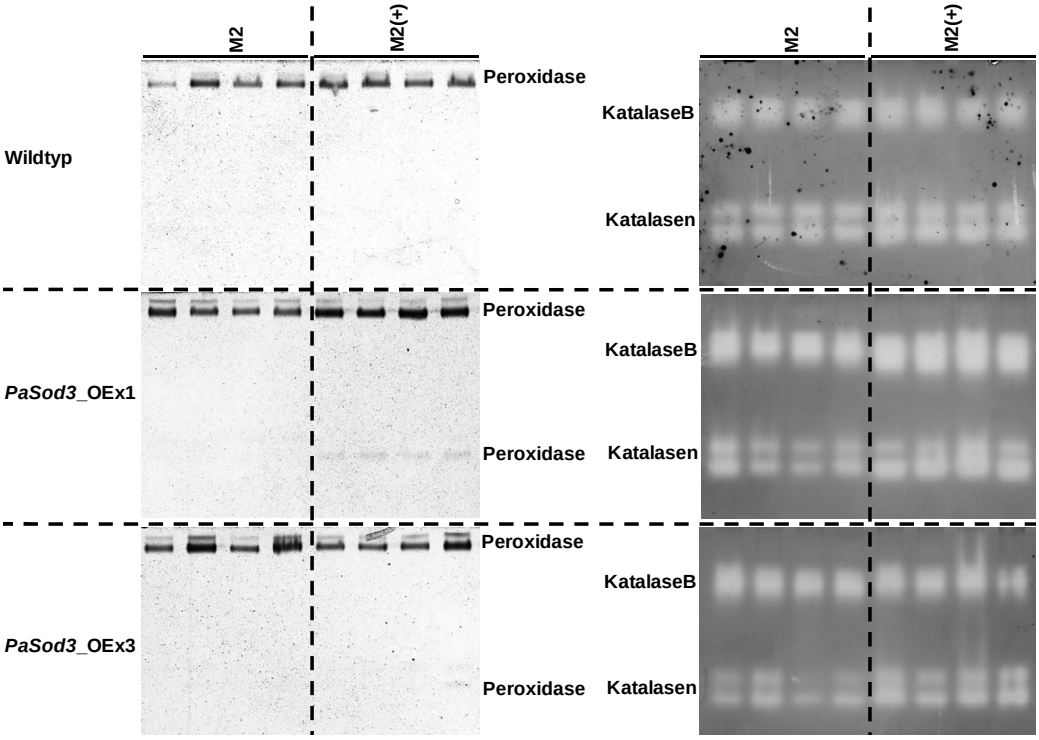


Abbildung 29: Peroxidase- und Katalase-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp und den *PaSod3*_OEx-Stämmen kultiviert auf M2 bzw. M2(+). Es wurden je 30 µg Gesamtproteinextrakte vom Wildtyp sowie von *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Mutantenstämmen (je n = 4), angezogen auf M2- bzw. M2(+)-Medium, auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Jeweils ein Gel wurde der Peroxidase-Färbung (links) und ein weiteres Gel der Katalase-Färbung (rechts) unterzogen. Aktive Peroxidasen zeigten sich durch dunkle Banden und aktive Katalasen durch farblose Banden (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Diese Ergebnissen weisen darauf hin, dass die erhöhte Peroxiredoxin-Menge zusammen mit den erhöhten Peroxidase- und Katalase-Aktivitäten in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2(+)-Medium für die gesteigerte Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid verantwortlich sind.

Zur Ermittlung, ob *PaSod3*-überexprimierende Stämme auf M2(+)-Medium Wasserstoffperoxid effizienter detoxifizieren können, wurden photometrische Messungen für die Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Abbaurate durchgeführt (Abbildung 30). Ferner sollte mit diesen Messungen bestimmt werden, ob Mangan als Katalysator für den Wasserstoffperoxid-Abbau wirken kann. Bei der verwendeten Methode wird die Absorptionsabnahme einer Proteinlösung, versetzt mit einer H_2O_2-Lösung, über die Zeit verfolgt. Die Absorptionsabnahme spiegelt den Abbau von Wasserstoffperoxid wider (Zintel et al. 2011). Für die Messung wurden Gesamtproteinextrakte vom Wildtyp und dem *PaSod3*_OEx1-Stamm, kultiviert auf M2 und M2(+), analysiert. Zur Bestimmung einer möglichen Wirkung von Mangan als Katalysator wurde den Proteinextrakten der beiden oben genannten Stämme, angezogen auf M2, unmittelbar vor der Messung in den experimentellen Aufbau eine Mangan-Lösung *in vitro* hinzugegeben und die densitometrische Änderung aufgezeichnet.

Bei der Bestimmung der relativen Wasserstoffperoxid-Abbauraten (Abbildung 30) zeigten sich keine vom Kultivierungsmedium abhängigen Veränderungen für den Wildtyp. Auch die direkte

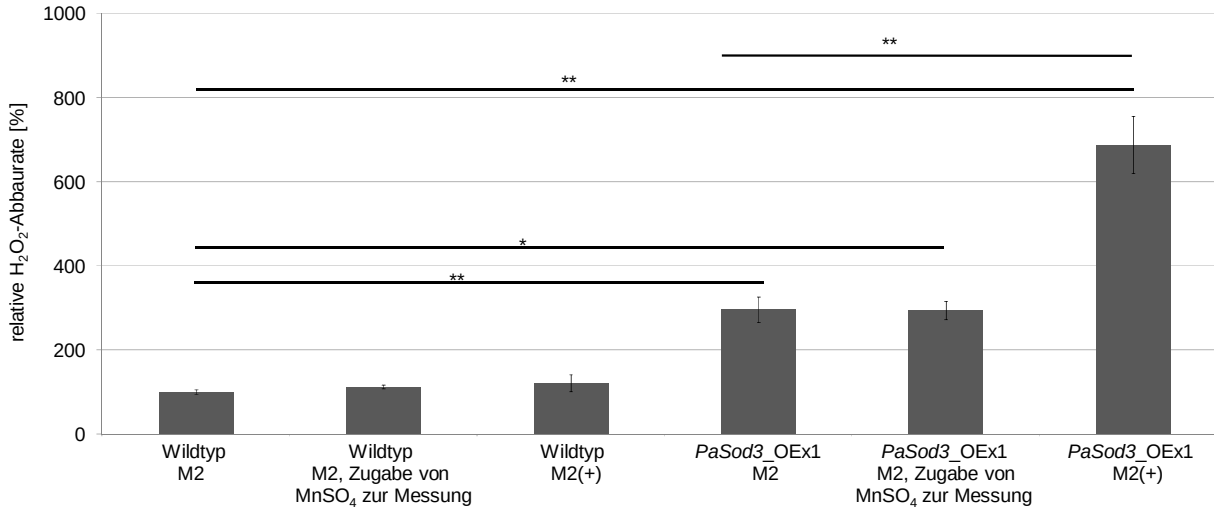


Abbildung 30: Relative Wasserstoffperoxid-Abbaurate des Wildtyps und des *PaSod3*_OEx1-Stammes von M2- bzw. M2(+)-Medium. Quantitative photometrische Bestimmung der relativen Wasserstoffperoxid-Abbaurate vom Wildtyp und dem *PaSod3*_OEx1-Stamm (je n = 4). Die Wasserstoffperoxid-Abbaurate wurde durch die Absorptionsabnahme bei 240 nm bestimmt. Dazu sind Gesamtproteinextrakte vom Wildtyp sowie der *PaSod3*_OEx1-Mutante eingesetzt worden, welche auf M2 bzw. M2(+) angezogen wurden. Jede Messung wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt und die Werte anschließend gemittelt. Der Wildtyp, kultiviert auf M2, wurde auf 100 % gesetzt und die verbleibenden Werte relativ dazu berechnet. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$). Ferner sind die jeweiligen Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Zugabe einer $MnSO_4$-Lösung in den experimentellen Aufbau zu Wildtypextrakten von M2 rief keine Änderung hervor. Hingegen wies der *PaSod3*_OEx1-Stamm auf M2 im Vergleich zum Wildtyp auf demselben Medium eine um das Dreifache gesteigerte Wasserstoffperoxid-Abbaurate auf. Bei Anzucht auf M2(+) konnte eine weitere Zunahme auf das Siebenfache ermittelt werden. Das Zufügen von Mangan in den experimentellen Aufbau direkt zur Messung der Mutante führte ebenfalls zu keiner Beeinflussung der H_2O_2-Abbaurate, wie bereits für den Wildtyp beschrieben.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass *PaSod3*_OEx-Stämme eine erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge enthalten. Erst die Anzucht auf Medium mit zusätzlichem Mangan ermöglicht es den Stämmen, diese gesteigerte Wasserstoffperoxid-Menge entsprechend ihrer Entstehung vermehrt zu detoxifizieren. Eine Wirkung von Mangan als Katalysator bei dem Abbau von Wasserstoffperoxid lässt sich ausschließen. Es ist also wichtig, dass Mangan bei dem Wachstum von *P. anserina* vorhanden ist und für die benötigten Prozesse verwendet werden kann.

4.4.5 Veränderung der Mitochondrienmorphologie

Aus den Messungen des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (Abbildung 27) ging hervor, dass dieser in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2-Medium, jedoch nicht bei denselben Stämmen angezogen auf M2(+)-Medium, im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war. Da bekannt ist, dass oxidativer Stress, beispielsweise durch Wasserstoffperoxid, zu vermehrter mitochondrialer Fragmentierung führt (Palermo et al. 2007), wurde die Morphologie der Mitochondrien vom Wildtyp sowie von *PaSod3*_OEx-Stämmen, gewachsen auf M2- bzw. M2(+)-Medium, mikroskopisch analysiert

(Abbildung 31). Dazu musste das Myzel mit dem Mitochondrien-spezifischen Farbstoff „Mito Tracker Red CMX-ROS“ behandelt werden.

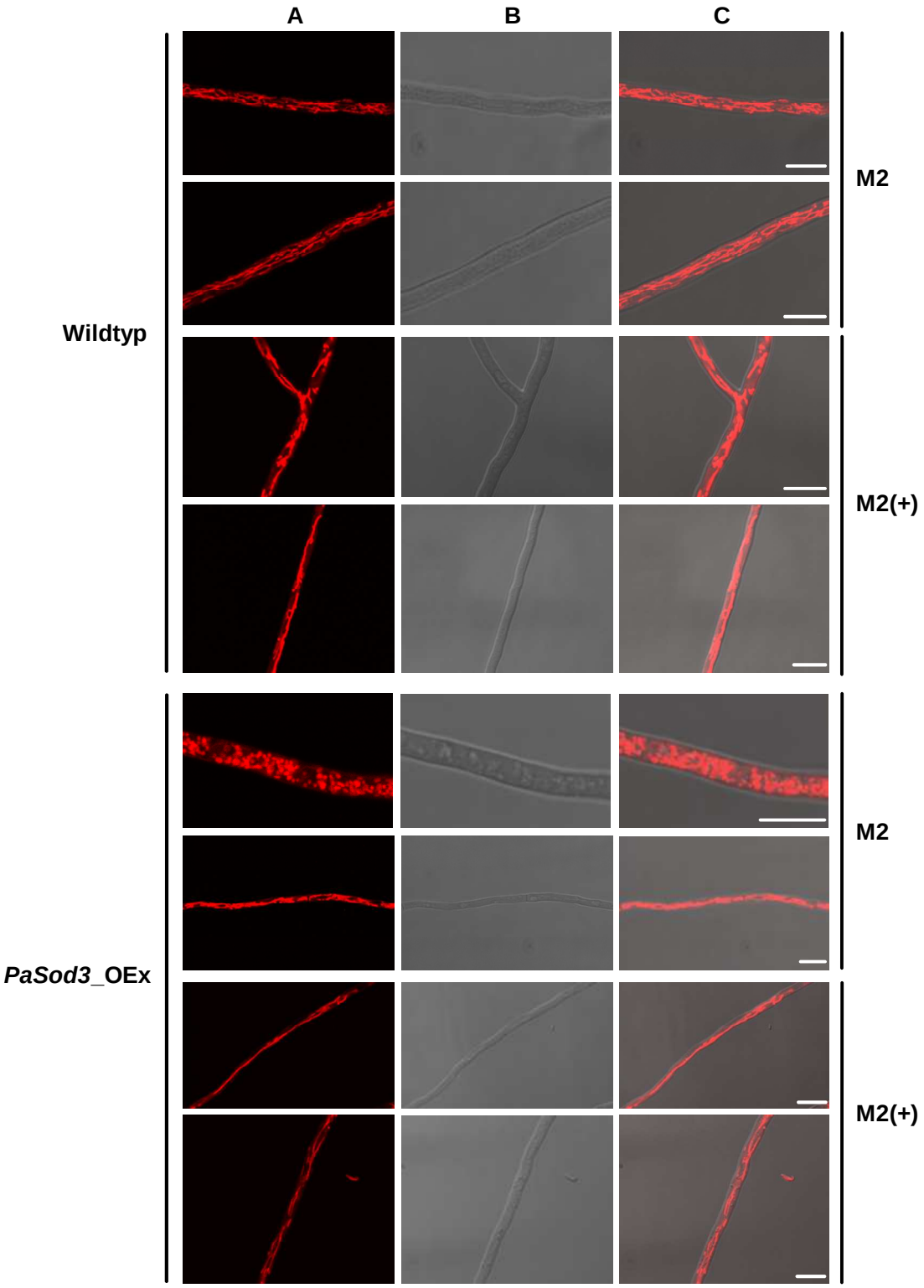


Abbildung 31: Mikroskopische Analyse der Mitochondrien des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme. Darstellung von repräsentativen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, aufgenommen an einem konfokalen Laserscanning Mikroskop, von Hyphenabschnitten des Wildtyps sowie von *PaSod3*_OEx-Stämmen angezogen auf M2- bzw. M2(+)-Medium. **A:** Fluoreszenzaufnahmen der Mitochondrien, die mit dem Fluorochrom „Mito Tracker Red CMX-ROS“ angefärbt wurden. **B:** Aufnahmen der Hyphenabschnitte im Durchlicht. **C:** Überlagerung der gefärbten Mitochondrien mit dem entsprechenden Durchlichtbild. Balkenskala: 10 µm.

Aus den in Abbildung 31 repräsentativ dargestellten Bildern der jeweiligen Stämme wird deutlich, dass die Anzucht auf M2- bzw. M2(+)-Medium keinen Einfluss auf die lange filamentöse Struktur der Wildtyp-Mitochondrien hatte. Letztere weist auf gesunde, intakte Mitochondrien hin, die in der Lage sind Fusion und Fission zu betreiben. Hingegen zeigten auf M2-Medium kultivierte *PaSod3*_OEx-Stämme zwei Arten von Mitochondrien: Zum einen wurden Hyphenabschnitte mit stark fragmentierten, punktförmigen Mitochondrien gefunden, welche auf ein Problem bei der Fusion dieser Mitochondrien hinweisen. Ferner gab es auch Hyphenabschnitte mit ausschließlich filamentösen Mitochondrien. Bei Kultivierung von *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen auf M2(+) waren hingegen ausschließlich sehr lange, filamentöse Mitochondrien nachweisbar.
Diese Analyse deutet darauf hin, dass Mangan-Mangel einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Mitochondrienmorphologie von *PaSod3*_OEx-Stämmen hat. Da die Morphologie in Zusammenhang mit der Funktion der Mitochondrien steht, könnten auch in den Mitochondrien ablaufende Prozesse durch Mangan-Mangel in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen beeinflusst werden.

4.4.6 Untersuchung der Atmung und der Atmungskettenkomplexe

*PaSod3*_OEx-Stämme, welche auf M2 kultiviert wurden, zeigten eine vermehrte Fragmentierung der Mitochondrien, die bei Supplementation des Mediums mit Mangansulfat nicht mehr nachweisbar war (Abbildung 31). Um zu untersuchen, ob diese veränderte Mitochondrienmorphologie einen Einfluss auf die in diesem Kompartiment ansässige Atmungskette und damit auch auf den Sauerstoffverbrauch hat, wurden Atmungsmessungen mit Myzel durchgeführt (Abbildung 32).

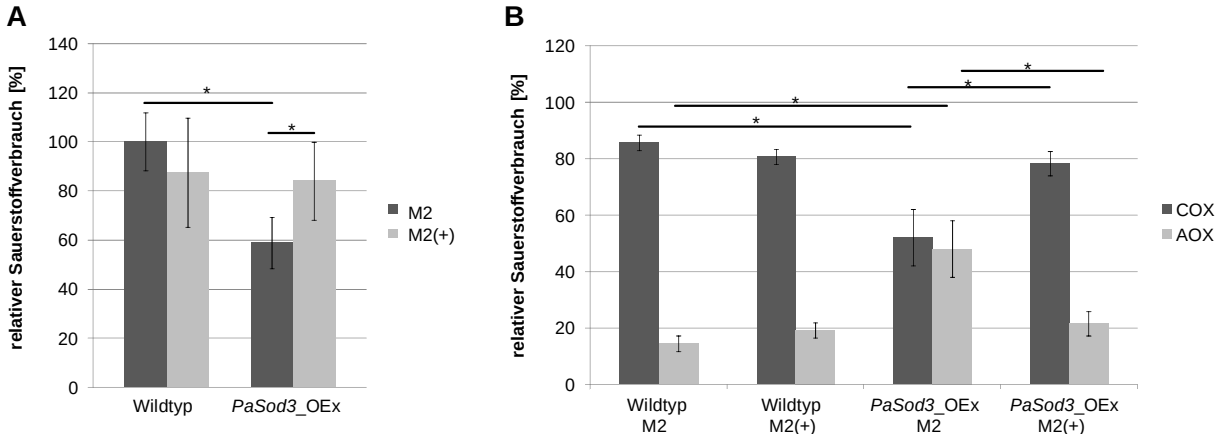


Abbildung 32: Sauerstoffverbrauchsmessungen vom Wildtyp und den *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2 bzw. M2(+). Es wurden Sauerstoffverbrauchsmessungen im Respirometer mit Myzel des Wildtyps sowie den beiden *PaSod3*_OEx-Stämmen durchgeführt. Die entsprechenden Stämme wurden auf M2- bzw. M2(+)-Medium kultiviert. **A:** Es wurden der Sauerstoffverbrauch des Wildtyps sowie der beiden *PaSod3*_OEx-Stämme (je n = 3) bestimmt. Zur Berechnung des relativen Sauerstoffverbrauchs musste der verbrauchte Sauerstoff (pmol/sec) mit dem Trockengewicht des Myzelstücks, welches für die Messung eingesetzt wurde, verrechnet werden. Der Wildtyp von M2 wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu dargestellt. Die Werte der *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme sind in der abgebildeten Grafik gemittelt. **B:** Es wurde der Sauerstoffverbrauch des Wildtyps (je n = 6) sowie der *PaSod3*_OEx-Stämme (Stämme von M2: n = 7, Stämme von M2(+): n = 10) nach Inhibierung der COX bzw. der AOX bestimmt. Zur Inhibierung der COX wurde 1 mM KCN und für die AOX 4 mM SHAM bei der Messung eingesetzt. Die selektive Inhibierung der Oxidasen erfolgte sowohl in der Reihenfolge KCN und anschließend SHAM als auch in umgekehrter Reihenfolge. Die Grundatmung (mittlerer Sauerstoffverbrauch ohne Zusatz von Inhibitoren) wurde für jedes Individuum auf 100 % gesetzt. Die Inhibierung der Oxidasen wurde relativ dazu berechnet und anschließend mussten alle Werte verschiedener

Individuen desselben Stammes gemittelt werden. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's T-Test berechnet und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$). Ferner ist der jeweilige Standardfehler eingezeichnet (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Der relative Sauerstoffverbauch (Abbildung 32 A) des Wildtyps von M2- bzw. M2(+)-Medium unterschied sich nicht signifikant. Hingegen war der relative Sauerstoffverbrauch von *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2-Medium um etwa 40 % geringer als der des Wildtyps auf diesem Medium. Die Anzucht der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2(+) erhöhte den Sauerstoffverbrauch wieder auf Wildtyp-Niveau (Abbildung 32 A).

Das Genom von *P. anserina* kodiert neben Komplex IV, der Cytochrom c-Oxidase (COX), auch für eine alternative Oxidase (AOX), welche eine Komplex IV-unabhängige Atmung ermöglicht (Vanlerberghe und McIntosh 1997). Wird über die AOX geatmet, gelangen die Elektronen direkt von Ubichinon zu der AOX und werden von dort an molekularen Sauerstoff übertragen. Mit spezifischen Inhibitoren kann selektiv die COX bzw. die AOX inhibiert werden. Dies wird ausgenutzt, um den prozentualen Anteil der Atmung zu bestimmen, der über die einzelnen Oxidasen vollzogen wird. Um die dargestellten Unterschiede im relativen Sauerstoffverbrauch (Abbildung 32 A) zu spezifizieren und den einzelnen Oxidasen zuzuordnen, wurden Atmungsmessungen mit Kaliumcyanid (KCN), welches die COX inhibiert, und mit Salizylhydroxaminsäure (SHAM), welches die AOX inhibiert, durchgeführt (Abbildung 32 B). Zur Ermittlung des relativen Sauerstoffverbrauchs der COX bzw. AOX der verschiedenen Isolate, angezogen auf M2 bzw. M2(+), wurde die Grundatmung, also der mittlere Sauerstoffverbrauch ohne Zusatz von Inhibitoren, jedes Individuums ermittelt und auf 100 % gesetzt. Darauf folgte die selektive Inhibierung der Oxidasen mittels KCN bzw. SHAM. Es wurden Messungen durchgeführt, bei denen zuerst die COX und danach die AOX inhibiert wurde, sowie Messungen in umgekehrter Reihenfolge. Anschließend wurde der Anteil der Atmung, welcher über die COX bzw. die AOX verlief, relativ zueinander berechnet. Die Ergebnisse der Messungen zeigten, dass bei dem Wildtyp, unabhängig von dem Kultivierungsmedium, sowie bei den *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2(+) etwa 80 % der Atmung über die COX und lediglich die verbleibenden 20 % über die AOX vollzogen wurden (Abbildung 32 B). Bei *PaSod3*_OEx-Stämmen, angezogen auf M2, war dieses Verhältnis zugunsten der AOX verschoben: Je etwa 50 % der Atmung erfolgten über die COX bzw. die AOX.

Zur Verifizierung dieser Daten wurden Mitochondrien der jeweiligen Stämme isoliert und mittels blau-nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) aufgetrennt. Diese Methode wird verwendet, um Membranproteinkomplexe, wie hier mitochondriale Atmungskettenkomplexe, zu untersuchen (Schägger et al. 1994, Schägger und Jagow 1991, Wittig und Schägger 2008). Das zur Auftrennung verwendete Gradientengel separiert problemlos Proteinkomplexe von bis zu 1.000 kDa. Zur Untersuchung wurden der Wildtyp sowie die beiden *PaSod3*_OEx-Stämme jeweils auf M2- und M2(+)-Medium angezogen und anschließend die Mitochondrien isoliert. Letztere mussten nach einer Solubilisierung mit Digitonin zu gleichen Mengen auf das blau-native Gel aufgetragen und ihrer Größe nach aufgetrennt werden (Abbildung 33).

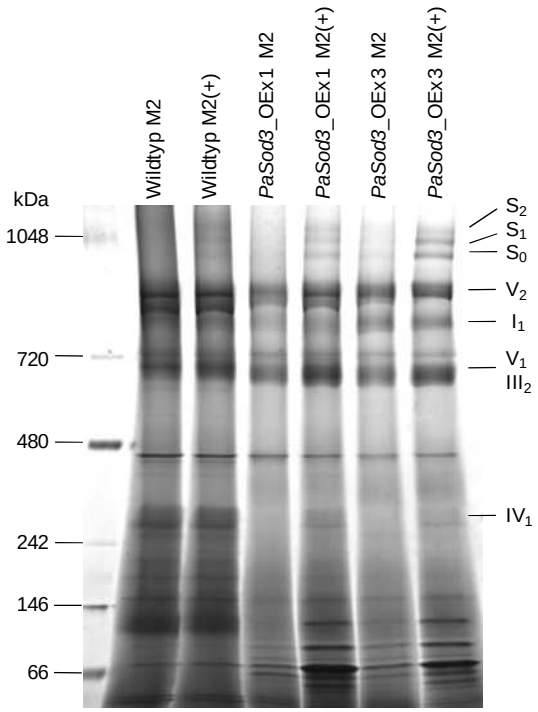


Abbildung 33: Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). Es wurden jeweils 100 µg mit 1 % Digitonin solubilisierte mitochondriale Proteinextrakte auf das 3,5 - 13 % ige blau-native Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nach der Entfärbung mit Wasser und Görg-Coomassie-Entfärber konnten verschiedene Atmungskettenkomplexe (I_1, III_2, IV_1, V_2) und Atmungskettensuperkomplexe (S_0: $I_1III_2IV_0$, S_1: $I_1III_2IV_1$, S_2: $I_1III_2IV_2$) detektiert werden, welche an der rechten Seite angegeben sind. Der Größenstandard ist auf der linken Seite des Gels dargestellt.

Nach einer Coomassie-Färbung und der sich anschließenden Entfärbung des Gels konnten die verschiedenen Atmungskettenkomplexe und Atmungskettensuperkomplexe anhand ihres Molekulargewichts den entsprechenden Banden im Gel zugeordnet werden (Abbildung 33). Dabei fiel auf, dass die vom Wildtyp auf M2 und M2(+) kultivierten Extrakte, sowie die der beiden *PaSod3*_OEx-Stämme von M2(+) jeweils das Komplex IV-Monomer enthielten, welches in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen von M2-Medium nicht nachweisbar war. Dies steht in Einklang mit der in Abbildung 32 B dargestellten verringerten Atmung über Komplex IV (COX) in den *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2. *PaSod3*_OEx-Stämme von M2(+) wiesen hingegen vermehrte Abbauprodukte von etwa 50 - 100 kDa auf. Neben dem veränderten Vorkommen von Komplex IV-Monomeren zeigten alle auf M2(+) kultivierten Stämme eine Akkumulation der Atmungskettensuperkomplexe S_0 ($I_1III_2IV_0$), S_1 ($I_1III_2IV_1$) und S_2 ($I_1III_2IV_2$) im Vergleich zu denselben Stämmen von M2.

Während eine erhöhte PaSOD3-Menge also zu einem Verlust an Komplex IV führt, scheint Mangan einen Einfluss auf die Menge der gebildeten Atmungskettensuperkomplexe zu haben.

4.4.7 Veränderte Prozessierung mitochondrialer Proteine

Aus den vorangegangenen Analysen ist ersichtlich, dass *PaSod3*_OEx-Stämme, welche auf M2(+)-Medium angezogen wurden, in ihrer Wuchsrate, Lebensspanne, Wasserstoffperoxid-Menge sowie Mitochondrienmorphologie dem Wildtyp auf M2-Medium entsprechen. Um Hinweise

zu erhalten, welche Veränderungen auf Proteinebene in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2(+)-Medium dafür verantwortlich sein könnten, dass sich diese Stämme, im Gegensatz zu der Kultivierung auf M2-Medium, wieder wie der Wildtyp verhalten, wurden zweidimensionale Gelelektrophoresen durchgeführt (Abbildung 34). Dazu wurden Gesamtproteinextrakte des Wildtyps, angezogen auf M2, sowie des *PaSod3*_OEx1-Stammes, kultiviert auf M2(+), zunächst isoelektrisch fokussiert und anschließend der Größe nach aufgetrennt. Insgesamt wurden 450 µg Gesamtproteinextrakte je Stamm eingesetzt, die zu gleichen Teilen aus jeweils vier verschiedenen Individuen stammten.

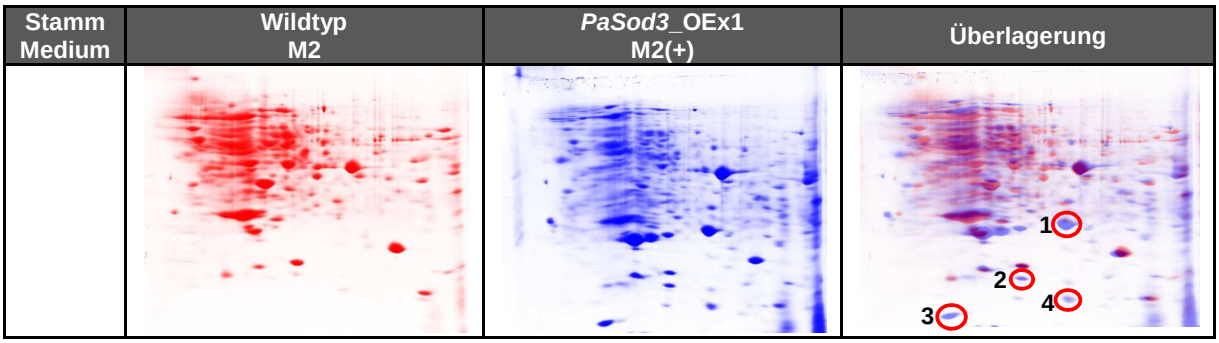


Abbildung 34: Zweidimensionale Gelelektrophoresen von Gesamtproteinextrakten des Wildtyps von M2 und des *PaSod3*_OEx1-Stammes von M2(+). Zur Analyse wurden je 450 µg Gesamtproteinextrakte, „gepoolt" zu gleichen Teilen aus jeweils vier Individuen pro Stamm, eingesetzt. Es wurden Extrakte vom Wildtyp, kultiviert auf M2-Medium (rotes Gel), sowie vom *PaSod3*_OEx1-Stamm, angezogen auf M2(+)-Medium (blaues Gel), zunächst nach ihrem pI separiert. Anschließend wurden die Proteine in einem 12 % igen SDS-Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und eingescannt. Das Gelbild des Wildtyps wurde durch eine Falschfarbendarstellung künstlich rot eingefärbt, sodass eine Überlagerung beider Gele (rechts) und die anschließende Zuordnung der Proteinspots zu dem entsprechenden Stamm möglich ist.

In Abbildung 34 sind die Gele nach zweidimensionaler Auftrennung dargestellt. Das Gel mit den Wildtyp-Extrakten von M2-Medium (links) wurde durch eine Falschfarbendarstellung rot eingefärbt, sodass eine Überlagerung mit dem blau gefärbten Gel, welches *PaSod3*_OEx1-Extrakte von M2(+)-Medium enthält (mittig), möglich ist. Die Überlagerung beider Bilder ist rechts zu sehen. Ein Vergleich der Proteinmuster des *PaSod3*_OEx1-Stammes (blau) mit dem Wildtyp (rot) zeigt deutliche Veränderung. Vier der in dem *PaSod3*_OEx1-Stamm von M2(+)-Medium gehäuft vorkommenden Proteinspots, welche mit 1 bis 4 nummeriert sind (Abbildung 34 recht), wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mittels MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry) von der Firma PANATecs (Heilbronn) analysiert. Eine detaillierte Zusammenfassung der Auswertung dieser ausgewählten Proteinspots ist Tabelle 29 und die nachgewiesenen Sequenzabdeckungen der entsprechenden Proteine Abbildung 35 zu entnehmen.

Diese Untersuchung zeigte, dass im *PaSod3*_OEx1-Stamm von M2(+) im Vergleich zum Wildtyp auf M2 vermehrt die unprozessierten mitochondrialen Proteine PaSOD3 (Abbildung 34 Spot 1) und PaCYPD (Abbildung 34 Spot 2), eine Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase, detektiert wurden. Neben den unprozessierten Proteinen konnte die prozessierte PaSOD3 (Abbildung 34 Spot 3) sowie PaHEX1 (Abbildung 34 Spot 4), ein in Woronin-Körperchen vorkommendes Protein (Woronin 1864), nachgewiesen werden. Die erhöhte Menge prozessierter PaSOD3

Tabelle 29: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS- und PMF-Analyse der ausgeschnittenen Proteinspots. Die in Abbildung 34 mit 1 - 4 nummerierten Proteinspots wurden mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die anschließende Peptide Mass Fingerprint (PMF) basierte Proteinidentifizierung führte zu folgenden Resultaten:

Spot	ID	Molekular-gewicht [Da]	pI	Mascot score (>76: signifikant)	Sequenz-abdeckung [%]	Pa No	MLS
1	171678411	25479	6,45	170	66	Pa_5_1740 **PaSOD3**	mit MLS
2	171695540	25876	8,57	65	35	Pa_1_4920 **PaCYPD**	mit MLS
3	171678411	25479	6,45	73	26	Pa_5_1740 **PaSOD3**	ohne MLS
4	171684413	23274	8,56	69	32	Pa_1_17000 **PaHEX1**	

Abbildung 35: Darstellung der Sequenzabdeckung bei der Identifizierung ausgewählter Proteinspots. Es ist jeweils die gesamte Proteinsequenz der links angegebenen Proteine abgebildet. Die roten Bereiche der Sequenzen wurden nach der MALDI-TOF-MS-Analyse mittels PMF-basierter Proteinidentifizierung abgedeckt. Das Ende der MLS in PaSOD3 und PaCYPD wurde in der Sequenz markiert. In Spot 1 und 2 wurden jeweils Sequenzen aus der MLS identifiziert, sodass die entsprechenden Proteine unprozessiert vorgelegen haben müssen.

(Abbildung 34 Spot 3) wurde aufgrund der Überexpression von *PaSod3* erwartet. Unerwartet war allerdings, dass PaSOD3 auch in erhöhten Mengen in unprozessierter Form vorlag.

Diese Befunde sind erste Hinweise dafür, dass es in *PaSod3*_OEx-Stämmen zu einer veränderten Prozessierung mitochondrialer Proteine kommt. Im weiteren Verlauf sollten im speziellen die unprozessierten mitochondrialen Proteine detaillierter analysiert werden. Die gezeigte Akkumulation von PaHEX1 im *PaSod3*_OEx1-Stamm von M2(+) stellt ebenfalls einen interessanten Ansatzpunkt dar, welcher in zukünftigen Studien untersucht werden sollte.

Zur detaillierteren Analyse der veränderten Prozessierung mitochondrialer Proteine wurden Western Blot-Analysen mit mitochondrialen Proteinextrakten der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2- sowie M2(+)-Medium durchgeführt (Abbildung 36). Diese Untersuchungen zeigen bei Anzucht von *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2-Medium eine erhöhte Proteinmenge an unprozessiertem PaCYPD (26 kDa), einer mitochondrialen Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase, die an der Öffnung

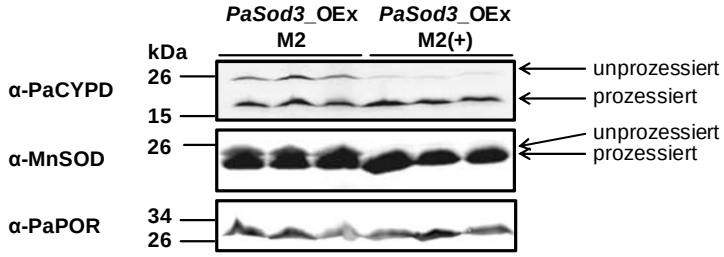


Abbildung 36: Western Blot-Analysen mitochondrialer Proteinextrakte der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). Es wurden jeweils 100 µg mitochondriale Proteinextrakte der *PaSod3*_OEx-Stämme, angezogen auf M2- bzw. M2(+)-Medium, (je n = 3) in 16 % igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und mit spezifischen Antikörpern detektiert. Als Primärantikörper wurden α-PaCYPD (unprozessiert: 26 kDa, prozessiert: 20 kDa), α-MnSOD (unprozessiert: 25,5 kDa, prozessiert: 22 kDa) und α-PaPOR (32 kDa) eingesetzt. Porin diente dabei als Ladekontrolle. Die verwendeten Primärantikörper sowie der Größenmarker sind links angegeben.

der mitochondrialen Permeabilitätstransitionspore (mPTP) beteiligt ist, sowie der mitochondrialen PaSOD3 (25,5 kDa). Fand die Anzucht der Stämme hingegen in Anwesenheit von 80 µM $MnSO_4$ statt, waren nur noch sehr geringe Mengen unprozessierten PaCYPDs und keine unprozessierte PaSOD3 nachweisbar. Die Gesamtmenge der Proteine PaCYPD (20 kDa) bzw. PaSOD3 (22 kDa) scheint sich dabei nicht oder nur unwesentlich zu verändern. Auch die im Cytoplasma nachweisbare PaCYPD-Menge variiert nicht zwischen den *PaSod3*_OEx-Stämmen von unterschiedlichen Anzuchtmedien (Daten nicht gezeigt). Daher scheint der in Abbildung 36 dargestellte Unterschied zwischen prozessierten und unprozessierten mitochondrialen Proteinen, abhängig vom Anzuchtmedium, nicht aufgrund veränderter Proteinmengen zustande zu kommen. Möglicherweise ist die verminderte Prozessierung der Proteine in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2-Medium auf ein Import-Problem bzw. eine Beeinträchtigung von TOM/TIM aufgrund der geringeren Energie-Menge in diesen Stämmen zurückzuführen.

4.4.8 *PaSod3*_OEx-Stämme als Modell für intrazellulären Wasserstoffperoxid-Stress

Aus den mit *PaSod3*_OEx-Stämmen erhaltenen Daten geht hervor, dass die Beeinträchtigung dieser Stämme auf eine deutlich gesteigerte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge zurückzuführen ist. Diese erhöhte H_2O_2-Menge kann in den *PaSod3*_OEx-Stämmen durch die Supplementation mit 80 µM $MnSO_4$ auf Wildtyp-Niveau reduziert werden. Es wäre denkbar, dass Mangan auch im Wildtyp zu einer gesteigerten Wasserstoffperoxid-Resistenz führt. Um dies zu untersuchen, wurden Lebensspannenanalysen des Wildtyps, welcher sowohl auf M2- als auch auf M2(+)-Medium kultiviert und gleichzeitig mit Wasserstoffperoxid gestresst wurde, durchgeführt. Die Untersuchung der relativen Überlebensraten des Wildtyps auf M2- bzw. M2(+)-Medium zeigte keine Unterschiede (Abbildung 37): Die medianen Lebensspannen entsprachen auf beiden Medien 19,7 Tagen und die maximalen Lebensspannen jeweils 25 Tagen. Bei der Kultivierung des Wildtyps auf M2-Medium mit 9 mM sowie mit 15 mM Wasserstoffperoxid konnte hingegen eine signifikante Verkürzung der Lebensspannen beobachtet werden. Dabei sind die medianen Lebensspannen um etwa drei Tage und die maximalen Lebensspannen um drei bis fünf Tage im Vergleich zur Anzucht auf M2-Medium verkürzt (Abbildung 37 A). Diese

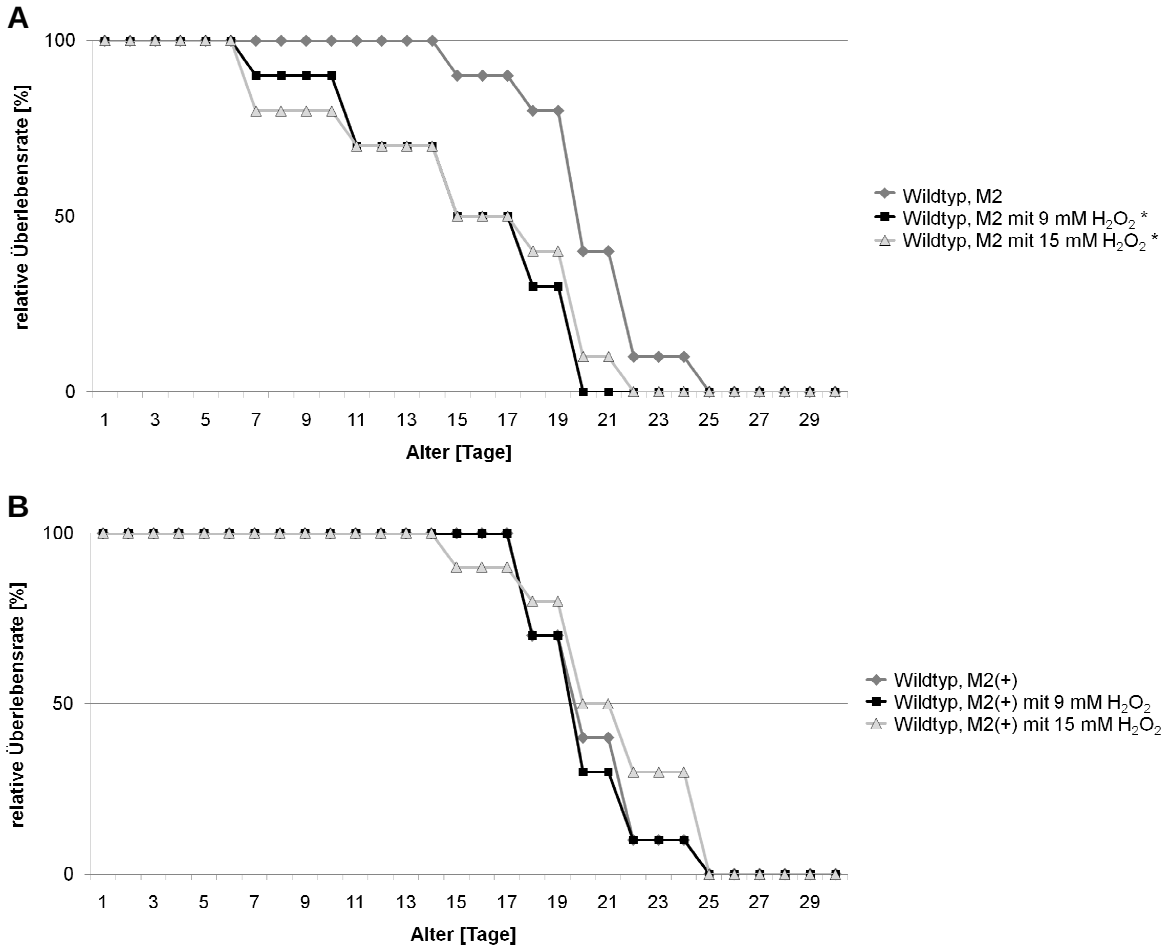


Abbildung 37: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps auf M2 sowie M2(+) mit und ohne Wasserstoffperoxid. A: Graphische Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps (n = 10) auf M2-Medium sowie M2-Medium mit 9 mM bzw. 15 mM Wasserstoffperoxid. Die Untersuchung resultierte in medianen Lebensspannen von 19,7 Tagen auf M2-Medium und von 17 Tagen auf beiden getesteten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen. Die maximalen Lebensspannen betrugen 25 Tage auf M2-Medium, 20 Tage auf M2-Medium mit 9 mM H_2O_2 und 22 Tage auf M2-Medium mit 15 mM H_2O_2. **B:** Die relativen Überlebensraten des Wildtyps (n = 10) auf M2(+)-Medium führten zu medianen Lebensspannen von 19,7 Tagen, 19,5 Tagen bzw. 21 Tagen auf M2(+)-Medium, M2(+)-Medium mit 9 mM H_2O_2 sowie M2(+)-Medium mit 15 mM H_2O_2. Die maximalen Lebensspannen betrugen auf allen getesteten Medien 25 Tage. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf M2- bzw. M2(+)-Medium wurden mit dem Wilcoxon Test (SPSS) ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$).

Unterschiede waren nicht mehr nachweisbar, wenn Lebensspannenanalysen des Wildtyps auf M2(+)-Medium mit denselben H_2O_2-Konzentrationen durchgeführt wurden (Abbildung 37 B). Dieses Ergebnis kann in einen direkten Zusammenhang mit einer gesteigerten Peroxidase-Aktivität gebracht werden: Wurde der Wildtyp auf M2(+)-Medium mit zusätzlichem Wasserstoffperoxid kultiviert, zeigten Gesamtproteinextrakte eine höhere Peroxidase-Aktivität, als wenn der Wildtyp auf M2-Medium mit zusätzlichem Wasserstoffperoxid angezogen wurde (Abbildung 38).

Diese Befunde belegen, dass Mangan in der Lage ist, die durch Wasserstoffperoxid hervorgerufene Lebensspannenverkürzung des Wildtyps u. a. durch eine gesteigerte Aktivität der Peroxidase aufzuheben, ähnlich wie es bei *PaSod3*_OEx-Stämmen, jedoch lediglich aufgrund der gesteigerten intrazellulären Wasserstoffperoxid-Menge, der Fall ist.

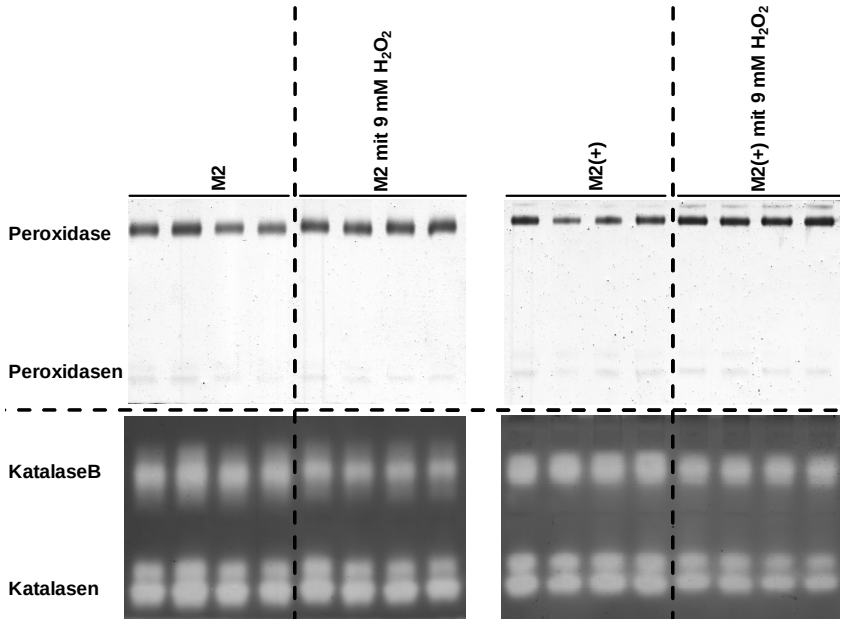


Abbildung 38: Peroxidase- und Katalase-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp auf M2-/M2(+)-Medium bzw. M2-/M2(+)-Medium mit 9 mM Wasserstoffperoxid. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtproteinextrakte vom Wildtyp, kultiviert auf M2- bzw. M2(+)-Medium sowie auf M2- bzw. M2(+)-Medium mit 9 mM Wasserstoffperoxid (je n = 4), auf zwei 10 % igen nativen Polyacrylamidgelen separiert. Ein Gel wurde der Peroxidase-Färbung (oben) und das zweite Gel der Katalase-Färbung (unten) unterzogen. Aktive Peroxidasen zeigten sich durch dunkle und aktive Katalasen durch farblose Banden (modifiziert nach Grimm und Osiewacz 2015).

Aus den gewonnenen Daten ergibt sich, dass *PaSod3*_OEx-Stämme ein gutes Modell zur Untersuchung von hohen intrazellulären Wasserstoffperoxid-Konzentrationen in *P. anserina* darstellen. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse darauf hin, dass erhöhte intrazelluläre H_2O_2-Konzentrationen zu einer Mangan-abhängigen Induktion des ROS-Detoxifizierungssystems führen.

FAZIT

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Studien, dass in *P. anserina*, dessen Genom für drei aktive SODs kodiert, eine gemeinsame Regulation einiger SODs vorliegt. Ferner kann der Verlust der mitochondrial lokalisierten PaSOD3 durch Energie-abhängige Prozesse kompensiert werden. Ein besonders interessanter Befund ist, dass die vorliegende Arbeit erstmals Hinweise auf einen Zusammenhang der Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid und Mangan liefert. Darüber hinaus zeigt sich, dass, abhängig von der Verfügbarkeit von Mangan im Medium, verschiedene Mechanismen unterschieden werden können, um mit hohen intrazellulären Wasserstoffperoxid-Mengen umzugehen:

1. Sind ausreichende Mengen Mangan in der Zelle verfügbar, wird Wasserstoffperoxid effizient in unschädliche Produkte umgewandelt (u. a. durch Katalasen und Peroxidasen).
2. Ist die Mangan-Menge allerdings limitiert und daher die Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid nur eingeschränkt möglich, verändert sich die Atmung: *P. anserina* atmet vermehrt über die alternative Oxidase, um so die an der Atmungskette entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu reduzieren. Dies dient als Schutz vor einer weiteren Steigerung der intrazellulären ROS-Menge.

5. Diskussion

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die Superoxid-Dismutasen von *P. anserina* und deren Rolle bei der Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies untersucht. Dazu wurde (I) die aus Vorarbeiten vermutete gemeinsame Regulation der SODs in *P. anserina*, und zum Vergleich auch in *S. cerevisiae*, analysiert. Außerdem wurden (II) zu Beginn der vorliegenden Arbeit unbekannte putative Superoxid-Dismutasen auf ihre mögliche Funktion als aktive SODs hin untersucht. Das Hauptaugenmerk dieser Dissertation lag auf der Charakterisierung der *PaSod3*-Mutantenstämme, welche eine Modulation der Menge der einzigen mitochondrial lokalisierten SOD aufweisen. Der Einfluss der veränderten PaSOD3-Mengen wurde (III) mit Hilfe von Lebensspannenanalysen unter oxidativem Stress sowie (IV) durch Transkriptomstudien der Δ*PaSod3*-Mutante untersucht. Außerdem wurde (V) die Wirkung von Mangan auf *PaSod3*-Stämme und das ROS-Detoxifizierungsnetzwerk experimentell analysiert.

5.1 MnSOD und Cu/ZnSOD zeigen eine gemeinsame Regulation

Seit Veröffentlichung der „freien Radikal-Theorie des Alterns“ (Harman 1956) werden ROS-detoxifizierende Enzyme, zu welchen auch die SODs zählen, mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht und ihr Einfluss auf den Alterungsprozess untersucht (Nickla et al. 1983, Rao et al. 1990, Scarpa et al. 1987, Sohal et al. 1987, Stevens et al. 1975). Die tatsächliche Beeinflussung der Lebensspanne eines Organismus durch die Manipulation der verschiedenen SOD-kodierenden Gene hängt von diversen Faktoren ab, z. B. einer gemeinsamen Regulation von SODs oder weiteren, an der Detoxifizierung beteiligten, Enzymen wie Katalasen. Prinzipiell liegen die verschiedenen SODs in unterschiedlichen Kompartimenten vor. Allerdings ist beispielsweise eine Beeinflussung der überwiegend cytoplasmatisch lokalisierten Cu/ZnSOD, welche auch im Intermembranraum der Mitochondrien gefunden wurde, mit der in diesem Kompartiment lokalisierten MnSOD denkbar (Sturtz et al. 2001, Zintel et al. 2010). Erste Hinweise auf eine mögliche gemeinsame Regulation von PaSODs, also die veränderte Menge oder Aktivität einer SOD in Abhängigkeit von der genetischen Modifikation eines anderen *Sod*-Gens, lieferte eine vorangegangene Arbeit. Eine „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbung von Extrakten der *PaSod2*_OEx-Stämme zeigte eine erhöhte Aktivität, die sich im Gel auf der Höhe der PaSOD1 befand (Zintel 2012). Eine Co-Regulation von SODs würde dazu führen, dass die beobachteten Effekte nicht eindeutig einem Isoenzym zugeordnet werden können. Daher ist es wichtig zu untersuchen, welchen Einfluss die verschiedenen SODs aufeinander haben.

Zur detaillierten Charakterisierung einer möglichen gemeinsamen Regulation der PaSODs wurden in der vorliegenden Doktorarbeit alle bereits vorhandenen *PaSod*-Mutantenstämme systematisch auf Veränderungen der PaSOD-Proteinmengen und -Aktivitäten hin analysiert. Zunächst konnte bestätigt werden, dass in allen *PaSod*-Deletionsstämmen das entsprechende

Protein nicht mehr vorlag. In *PaSod*_OEx-Stämmen wurde, wie erwartet, eine erhöhte Menge des jeweiligen Proteins nachgewiesen. Obwohl für alle *PaSod*_OEx-Stämme das jeweilige Gen unter der Kontrolle des Metallothioneinpromotors (Mt-Promotor, Averbeck et al. 2001) stand, der für eine konstitutive und starke Genexpression sorgt, fiel auf, dass die Überexpression von *PaSod1* in einer 2,5-fachen und die von *PaSod2* in einer 2-fachen Steigerung der entsprechenden Proteinmenge resultierte, in *PaSod3*_OEx-Stämmen aber zu einer 9-fachen Erhöhung führte (Abbildung 7). Bei der in einer früheren Arbeit durchgeführten Herstellung der Überexpressionsstämme wurden sowohl für *PaSod1* als auch für *PaSod2* Transformanden mit Mehrfachintegrationen des entsprechenden Überexpressionskonstrukts nachgewiesen (Schwitalla 2007). Für *PaSod3* waren ausschließlich Transformanden mit Einfachintegrationen nachweisbar (Schwitalla 2007). Dies deutet darauf hin, dass Transformanden mit einer noch höheren PaSOD1- oder PaSOD2-Menge nicht lebensfähig sind und daher auf Transformanden selektioniert wurde, welche nur eine geringfügig gesteigerte PaSOD1- bzw. PaSOD2-Menge aufwiesen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte, um Faktor neun gesteigerte, PaSOD3-Proteinmenge (Mittelwert des *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stammes) weicht von publizierten Werten ab: Für den *PaSod3*_OEx2-Stamm wurde eine 80-fach erhöhte (Kowald et al. 2012) und für den *PaSod3*_OEx3-Stamm mittels SRM-Analyse eine 130-fach gesteigerte PaSOD3-Menge detektiert (Plohnke et al. 2014).

> SRM oder „selected reaction monitoring“ ist eine auf der Massenspektrometrie beruhende Methode zur spezifischen Identifizierung bzw. Analyse von ausgewählten Peptiden. Für das zu untersuchende Protein werden spezifische Peptide synthetisiert, die mit Isotopen markiert werden. Dabei stellt das Isotopen-markierte Peptid, welches in einer definierten Menge zu der Proteinprobe gegeben wird, eine Referenz dar, mit deren Hilfe auf die Menge des spezifischen Proteins in der Probe geschlossen werden kann (Lange et al. 2008).

Generell ist der Faktor, um den ein Gen überexprimiert wird, nicht festgelegt, sondern kann, wie auch die entsprechende Proteinmenge, variieren. Für den *PaSod3*_OEx2-Stamm wird vermutet, dass dieser im Vergleich zu den *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämmen eine höhere PaSOD3-Proteinmenge enthielt. Diese enorme PaSOD3-Menge wirkte sich offensichtlich negativ auf den entsprechenden Stamm aus, sodass Letzterer das Überexpressionskonstrukt inzwischen verloren hat und daher in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden konnte. Bei der Ermittlung der PaSOD3-Menge mittels SRM-Analyse wurde die Gesamtmenge der vorhandenen PaSOD3 bestimmt, also auch unprozessierte PaSOD3, die noch nicht in die Mitochondrien eintransportiert wurde und kann deshalb von der tatsächlichen mitochondrialen Proteinmenge abweichen.

Neben den erwarteten Effekten bezüglich der Menge der SOD-Isoenzyme in den Deletions- und Überexpressionsstämmen, wurde eine um 50 % verringerte PaSOD2-Menge in Δ*PaSod3*-Stämmen und eine um 30 % gesteigerte PaSOD1-Menge, ebenfalls in Δ*PaSod3*-Stämmen, nachgewiesen (Abbildung 7). Die reduzierte PaSOD2-Proteinmenge deutet an, dass die Expression von *PaSod2*, welche für die sekretierte PaSOD2 kodiert, nicht so relevant für den Pilz

ist, wie die der *PaSod1* und *PaSod3*, welche für intrazelluläre SODs kodieren. Es ist denkbar, dass bei einem Ungleichgewicht des ROS-Detoxifizierungsnetzwerkes, bedingt durch die genetische Manipulation eines *Sod*-Gens, die primär unwichtigere sekretierte PaSOD2 vermindert exprimiert wird, um Ressourcen für die in der Zelle benötigten Prozesse zu sparen. Die erhöhte PaSOD1-Menge in Gesamtproteinextrakten wird als ein Versuch gedeutet, den Verlust der mitochondrialen PaSOD3 zu kompensieren, da u. a. in *S. cerevisiae* und *P. anserina* gezeigt wurde, dass die cytoplasmatische Cu/ZnSOD in geringen Mengen auch im Intermembranraum der Mitochondrien vorliegt (Sturtz et al. 2001, Zintel et al. 2010). Auf Transkriptebene war allerdings kein signifikanter Unterschied detektierbar: Ein Vergleich des Δ*PaSod3*-Stammes mit dem Wildtyp ergab keine Beeinflussung der *PaSod1*-Transkriptmenge (Daten nicht gezeigt), sodass die gesteigerte PaSOD1-Proteinmenge auf eine veränderte post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation, wie beispielsweise eine veränderte Proteinstabilität, zurückzuführen sein könnte. In *C. elegans* führte die separate Deletion jeder einzelnen *Sod* ebenfalls zu keinen veränderten Expressionswerten für die jeweils verbleibenden *Sods*. Bei einer gleichzeitigen Deletion beider Gene, die für mitochondrial lokalisierte SODs kodieren, reduzierte sich in *C. elegans*, im Gegensatz zu *P. anserina*, sogar die Expression der extrazellulären *Sod-4* bzw. der cytoplasmatischen *Sod-5*, während die Transkriptmenge der cytoplasmatischen *Sod-1* unbeeinflusst blieb (Back et al. 2010).

Da Δ*PaSod3*-Stämme keinen offensichtlich veränderten Phänotyp im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, obwohl die mitochondrial lokalisierte PaSOD3 fehlt, wurde eine mögliche Akkumulation von PaSOD1 in den Mitochondrien untersucht. In einer Western Blot-Analyse wurde zwar eine gesteigerte PaSOD1-Menge in den Mitochondrien von Δ*PaSod3*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen, aber dieser Unterschied war nicht signifikant (Anhang Abbildung S48). Daher wird vermutet, dass die Zunahme der mitochondrialen PaSOD1-Menge keinen gezielten Kompensationsmechanismus des Verlustes der PaSOD3 darstellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wird angenommen, dass die *PaSod3*-Deletion zu einer post-transkriptionell oder post-translational bedingten Erhöhung der Cu/ZnSOD-Menge führt.

Die Überprüfung der PaSOD-Aktivitäten zeigte keinen direkten Zusammenhang zu den erhöhten bzw. reduzierten Proteinmengen in den *PaSod*-Mutanten. „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen wiesen auf gemeinsame Regulationen von PaSODs hin: *PaSod3*_OEx-Stämme zeigten eine PaSOD1-Aktivitätssteigerung und Δ*PaSod2*-Stämme eine Reduktion der PaSOD1-Aktivität. Die in *PaSod2*_OEx-Stämmen sowohl von Frau Zintel (Zintel 2012) als auch in dieser Arbeit beobachtete deutlich stärkere Aktivität auf der erwarteten Höhe von PaSOD1 (Abbildung 8 B, linkes Gel) deutete zunächst ebenfalls auf eine gemeinsame Regulation hin. Detailliertere Studien mit einem Δ*PaSod1_PaSod2*_OEx2-Stamm ergaben aber, dass es sich dabei um keine Co-Regulation handelt. Die stärkere Bande – und somit höhere SOD-Aktivität – ist auf ein verändertes Laufverhalten der PaSOD2 im nativen Gel zurückzuführen, sodass PaSOD2 neben der eigentlichen PaSOD2-zugeordneten Bande auch direkt oberhalb der PaSOD1-Bande

Aktivität zeigt (Abbildung 9). Diese über PaSOD1 laufende PaSOD2-Aktivitätsbande ist in keiner anderen *PaSod*-Mutante nachweisbar und damit direkt auf die Überexpression von *PaSod2* zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung für das geänderte Laufverhalten eines Teils von PaSOD2 ist die Dimer- bzw. Multimerbildung. Allerdings gibt es diesbezüglich keine Untersuchungen an bekannten sekretierten MnSODs. Für mitochondrial und cytoplasmatisch lokalisierte MnSODs wurden dagegen entsprechende Studien durchgeführt. Während die mitochondriale SOD2 aus *S. cerevisiae*, die mitochondrialen SOD-2 und SOD-3 aus *C. elegans* sowie die cytoplasmatische SOD3 aus *A. fumigatus* als Tetramere vorliegen, wurden in *C. albicans* sowohl Dimere als auch „lockere Tetramere“ der cytoplasmatischen SOD3 nachgewiesen (Flückiger et al. 2002, Ravindranath und Fridovich 1975, Sheng et al. 2013, Trinh et al. 2008). Bei Kristallisationsstudien waren für die *C. albicans* SOD3 ausschließlich Tetramere detektierbar (Sheng et al. 2011). Wahrscheinlich kommt es in *P. anserina*, wie für *C. albicans* gezeigt, zu der Bildung von zwei unterschiedlichen Oligomeren: Dimere und Tetramere der PaSOD2. Aufgrund der geringeren PaSOD2-Proteinmenge ist im Wildtyp vermutlich nur das Dimer nachweisbar. Wird *PaSod2* überexprimiert können sowohl PaSOD2-Dimere als auch -Tetramere detektiert werden. Das PaSOD2-Tetramer, welches in *PaSod2*_OEx-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp in großen Mengen vorkommt, ist bei SOD-Aktivitätsfärbungen oberhalb der PaSOD1-Bande nachweisbar. Multimere sind unter denaturierenden Bedingungen für gewöhnlich instabil und folglich wären nur Monomere zu finden. Eine Western Blot-Analyse mit eluierten Proteinen aus der oberhalb von PaSOD1-laufenden Aktivitätsbande, durchgeführt unter denaturierenden Bedingungen, detektierte auch PaSOD2-Proteinbanden, welche ein größeres Molekulargewicht als das des Monomers aufwiesen (Abbildung 9 B). Vermutlich reichen die gewählten denaturierenden Bedingungen nicht aus, um die enormen PaSOD2-Mengen vollständig zu dissoziieren. Ggfs. würden höhere Konzentrationen SDS, DTT und β-Mercapto-ethanol sowie eine längere Inkubation bei 95 °C dazu führen, dass alle PaSOD2-Multimere dissoziieren. Auch möglich wäre, dass es sich um SDS-stabile Dimere handelt, wie sie für *S. cerevisiae* beschrieben wurden (Ravindranath und Fridovich 1975). Die tetramere MnSOD besteht aus zwei Dimeren. Diese zwei Dimere sind über wenig stabile, nicht-kovalente Bindungen miteinander verknüpft. Die Untereinheiten der Dimere werden hingegen durch Disulfid-brückenbindungen stabilisiert. Während die nicht-kovalenten Bindungen unter denaturierenden Bedingungen nahezu vollständig dissoziierten, waren die intramolekularen Disulfidbrücken der MnSOD aus *S. cerevisiae* selbst bei 25 - 30 min bei 100 °C und 1 % SDS noch stabil. Nach dieser Behandlung wurden überwiegend Dimere, in geringeren Mengen aber auch Monomere und Tetramere, der MnSOD nachgewiesen (Ravindranath und Fridovich 1975). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die genetische Veränderung einer *Sod* nicht nur die entsprechende Proteinmenge und -aktivität, sondern auch die Menge der unterschiedlichen Oligomer-Formen eines Proteins beeinflussen kann.

Zur Überprüfung, ob die in *P. anserina* gefundenen gemeinsamen Veränderungen auf Aktivitätsebene auch in einem anderen Organismus nachweisbar sind, wurde die Bäckerhefe *S. cerevisiae* untersucht. Nach Überprüfung der *ScSod*-Mutantenstämme auf Korrektheit konnten diese mittels *in vitro* SOD-Aktivitätsmessungen und „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen charakterisiert werden (Abbildung 11 und Abbildung 12). Durch diese Analysen wurde gezeigt, dass der Großteil der in *S. cerevisiae* vorliegenden SOD-Aktivität auf ScSOD1 zurückzuführen ist: In Δ*ScSod1*-Stämmen wurde eine Reduktion der gesamten SOD-Aktivität um etwa 75 % ermittelt, wohingegen die Deletion der *MnSod* lediglich zu einer Verringerung um etwa 15 % führte. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den für *S. cerevisiae* publizierten Werten, welche die MnSOD für etwa 15 % der gesamten SOD-Aktivität verantwortlich macht (Chang et al. 1991, Galiazzo und Labbe-Bois 1993). SOD-Aktivitätsfärbungen schließen einen möglichen kompensatorischen Effekt – die gesteigerte Aktivität einer ScSOD bei Fehlen der zweiten SOD – aus. Die *ScSod*-überexprimierenden Stämme zeigten bei Aktivitätsfärbungen deutlich stärkere Banden für beide ScSODs, unabhängig davon, welches der entsprechenden Gene überexprimiert wurde. Dies liefert einen ersten Hinweis darauf, dass sich die SODs gegenseitig beeinflussen können.

Da unter den getesteten Bedingungen sowohl für *P. anserina* als auch für *S. cerevisiae* die Überexpression des Gens, welches die mitochondrial lokalisierte SOD kodiert, in einer gesteigerten Aktivität der Cu/ZnSOD resultiert, kann ein genereller Regulationsmechanismus vermutet werden. Dies trifft aber nur für gesteigerte Aktivitäten zu. Eine Deletion der *MnSod* führt zu keiner Aktivitätsveränderung der Cu/ZnSOD. Weitere Analysen zur Kompensation des Verlustes von PaSOD3 können Kapitel 5.4 entnommen werden. Studien an *D. melanogaster*-Mutanten mit reduzierten mitochondrialen MnSOD-Mengen konnten ebenfalls keine veränderte Cu/ZnSOD-Aktivität nachweisen (Paul et al. 2007). Ferner wurde in Zelllinien, Karzinomzellen von Hamstern und in unterschiedlichen Gewebearten der Maus kein direkter Zusammenhang zwischen der Reduktion oder Zunahme der Cu/ZnSOD und einer daraus resultierenden Aktivitätsveränderung der mitochondrialen SOD gezeigt, wie es auch für *P. anserina* der Fall ist (Lam et al. 1999, Tanaka et al. 1997, White et al. 1993). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivitätssteigerung der mitochondrialen SOD, welche zu einer gesteigerten Wasserstoffperoxid-Menge in der Zelle führt, ausreicht, um weitere Schutzmechanismen, wie die Aktivitätssteigerung der Cu/ZnSOD, zu induzieren. Diese Annahme wird durch eine Studie in *P. anserina* gestützt, in der eine gesteigerte PaSOD1-Proteinmenge und -Aktivität bei Anzucht des Wildtyps auf Wasserstoffperoxid-haltigem Medium nachweisbar war (Thoms 2011).

Insgesamt wurde bei der durchgeführten umfassenden Charakterisierung von *Sod*-Mutanten ein unerwarteter Zusammenhang zwischen den SODs sowohl für *P. anserina* als auch für *S. cerevisiae* entdeckt: Die Überexpression der *MnSod* (*PaSod3* bzw. *ScSod2*) resultiert in einer erhöhten Cu/ZnSOD-Aktivität (PaSOD1 bzw. ScSOD1).

5.2 Es wurde kein weiteres Protein mit SOD-Aktivität gefunden

Die in Kapitel 5.1 beschriebene gemeinsame Regulation von SODs zeigt, dass es bei der Interpretation von Ergebnissen wichtig ist, alle an der Detoxifizierung von Superoxid beteiligten Enzyme zu berücksichtigen. Wird beispielsweise ein Protein mit SOD-Aktivität übersehen, kann dies zu fehlerhaften Rückschlüssen führen.

In einer vorangegangenen Arbeit konnte ein Δ*PaSod1/2/3*-Stamm hergestellt werden, dem alle zu Beginn der vorliegenden Dissertation bekannten aktiven PaSODs fehlen (Zintel 2012). Dieser Stamm ist lebensfähig (Zintel 2012). Da die Δ*PaSod1/2/3*-Mutante lebensfähig ist und in anderen Pilzen wie *A. fumigatus* und *C. albicans* Hinweise auf mehr als die in *P. anserina* bekannten drei SODs gefunden wurden, stellte sich die Frage, ob der Verlust der PaSOD1-3 durch eine bis dato unentdeckte PaSOD kompensiert werden könnte. Eine Suche nach Homologien von *P. anserina*-Proteinen zu bekannten Cu/ZnSODs bzw. Mn/FeSODs sowie eine GO-Suche in Transkriptomdaten von *P. anserina* (Philipp et al. 2013, Wiemer und Osiewacz 2014) lieferte erste Hinweise, dass *Pa_1_10620*, *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300* putative *PaSods* darstellen könnten.

5.2.1 Pa_1_10620

Die Suche nach homologen *P. anserina*-Proteinen zu bekannten SODs aus anderen Organismen zeigte eine hohe Identitäten von 33,02 % von Pa_1_10620 zu der putativen AfSOD4 aus *A. fumigatus* (Abbildung 39) (Lambou et al. 2010).

```
Pa_1_10620   --MLRPR------LRIPRASSPFALP-ASRSSTAGQLLPLAYRSSYHTVPVLEN-----IPEKESEDGQKYRSIDGFLSPMA
AfSOD4       MEILRPLSCSPVNVQNPQSHTLVMLNRLLRPQTPLRALSALSQKPVAALPRFQTRQLHRVPQLTHDAYFKANGIPELLSPEA

Pa_1_10620   FTTAWDYYQTHVLSNLNRLCAETNNDSLLLKDVVLATARDPAQAATFNYASAAHNNHFFFKCLSPTETKAEDMPAQLKDALV
AfSOD4       FDFAWTQYQTLLIDKLNLLTQDTVDADTKPGDLLIKYSRRPEMASVFNYASMAHNNHFFFNCLSPTPT---QIPDKFAKDII

Pa_1_10620   KSFGSLDALKELMVNTATSMFGPGFVWLVRSDRPKDPHQFRVLTTYLSGSPYPAAHWRKQSLNTATDVGESSERGIQAGKQY
AfSOD4       DICSSVESLKLDFLATANAMFGPGFVWLAKN--LEREGLMHIFCTYNAGSPYPAAHSRRQPVDMATHSPDAPLGNMYAG---

Pa_1_10620   LENSARGAGWNASAYKKDDFAPGGVLLEPVLCLNTWEHAWLFEYGFGGSPKSVLDKVKGGQAGVAENQKSGKEVYAERWWDF
AfSOD4       --------SMGAHSLNQKNMAPGAVDVQPILCVNTWEHVWMMDYGIGG-KAEYLERWWDRINWETVYDNYNAVSSLKGGRHA

Pa_1_10620   VDWNVVARLAFPGGTKI  Identität zu AfSOD4: 33,02 %
AfSOD4       ANRNRSLSYL-------
```

Abbildung 39: Homologievergleich von *P. anserina* Pa_1_10620 und *A. fumigatus* AfSOD4 (AFUA_6G07210).

Das Protein Pa_1_10620, welches mit 34,1 kDa bzw. 36,7 kDa (mit MLS) ein deutlich höheres Molekulargewicht als die drei in *P. anserina* bekannten SODs aufweist, wurde auf der *P. anserina*-Genomseite (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) als mitochondrial lokalisiertes SSU („small subunit“) ribosomales Vorläuferprotein S26 annotiert. BLAST-Analysen und Protein-Motivsuchen zeigten, dass Pa_1_10620 ein – im Vergleich zu PaSOD2 und PaSOD3 – verkürztes Mn-Bindemotiv enthält (Abbildung 13). In der menschlichen MnSOD werden die Histidine His-26 und His-74 (Position bezieht sich auf das prozessierte Protein) als wichtige Aminosäuren für die Aktivität beschrieben (Borgstahl et al. 1992, Zhang et al. 2006). Der durch eine Mutation eingeführte Austausch von Histidin (CAC) zu Leucin (CTC) an Position 26 resultiert in einer

deutlichen Reduktion der SOD-Aktivität (Zhang et al. 2006). Dies bestätigt die wichtige Rolle von His-26 für die Aktivität der MnSOD. Diese Aminosäure, welche in PaSOD2 und PaSOD3 konserviert ist, existiert in Pa_1_10620 nicht. Da die Mutation in der menschlichen MnSOD nicht zu einem vollständigen Verlust der SOD-Aktivität führt, wird auch dem His-74, welches in PaSOD2 sowie PaSOD3 konserviert ist und vermutlich dem Histidin an Position 103 des prozessierten Pa_1_10620-Proteins entspricht, eine Funktion für die SOD-Aktivität zugesprochen.

Neben AfSOD4 weist das Volllängenprotein Pa_1_10620 sowohl hohe Homologien zu den aus anderen Organismen bekannten Mn/FeSODs als auch zu mitochondrial lokalisierten ribosomalen Proteinen auf. Die aufgrund der MLS vorhergesagte mitochondriale Lokalisation von Pa_1_10620 konnte von Lena Böhl bestätigt werden (Böhl 2013, Grimm et al. 2015). Zur detaillierteren Charakterisierung wurden von Frau Böhl und mir *Pa_1_10620*_OEx-Stämme erstellt, für welche eine erhöhte *Pa_1_10620*-Transkriptmenge (Abbildung 14) sowie eine gesteigerte Pa_1_10620-Proteinmenge (Abbildung 15) im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde. SOD-Aktivitätsfärbungen mit verschiedenen Mengen mitochondrialer Extrakte konnten keine Pa_1_10620-spezifische SOD-Aktivität in *Pa_1_10620*_OEx-Stämme nachweisen (Abbildung 16).

Zusammenfassend deuten das höhere Molekulargewicht, die Abwesenheit des konservierten His-26, das verkürzte Mn-Bindemotiv und die nicht nachweisbare SOD-Aktivität darauf hin, dass *Pa_1_10620* für keine funktionelle SOD kodiert. Die Herstellung einer *Pa_1_10620*-Deletionsmutante war nicht erfolgreich (Böhl 2013). Eine Deletion des Gens der zu Pa_1_10620 homologen AfSOD4 ist homozygot letal (Lambou et al. 2010). Diese Befunde deuten auf eine essentielle Funktion von *Pa_1_10620* hin und bestärken die Annahme, dass *Pa_1_10620*, wie auch *AfSod4*, nicht für eine funktionelle Superoxid-Dismutase kodiert, da bereits in verschiedenen Organismen, wie *P. anserina*, *S. cerevisiae* und *C. elegans*, gezeigt wurde, dass die Deletion einer einzelnen *Sod* nicht letal ist (Lambou et al. 2010, Unlu und Koc 2007, van Raamsdonk und Hekimi 2009, Zintel et al. 2010).

Obwohl es sich bei Pa_1_10620 um keine aktive SOD handelt, führt die Überexpression des entsprechenden Gens zu einer verlängerten Lebensspanne auf M2-Medium, ohne dass die Wuchsrate beeinträchtigt wird (Abbildung 17). Möglicherweise kodiert *Pa_1_10620*, wie auf der *P. anserina*-Genomseite annotiert, für eine Komponente der mitochondrialen Ribosomen. Mitochondriale Ribosomen erfüllen eine wichtige Aufgabe bei der Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion und spielen eine zentrale Rolle bei der Alterung, da diese Kompartimente für die Energiekonversion und Biosynthese essentiell sind (Heeren et al. 2009, Houtkooper et al. 2013). Für AfSOD4 wird eine Funktion ähnlich zu dem mitochondrialen ribosomalen Hefeprotein ScRSM26 angenommen (Lambou et al. 2010), zu welchem auch Pa_1_10620 eine hohe Homologie zeigt. ScRSM26 wird als ein mitochondriales Protein der kleinen Untereinheit des Ribosoms beschrieben, welches, wie Pa_1_10620, Homologien zu Proteinen der SOD-Familie aufweist (Saveanu et al. 2001). Neben ScRSM26 sind für Pa_1_10620 Homologien zu anderen ribosomalen Proteinen, wie zu dem mitochondrialen

RSM26-ähnlichen Protein aus *Fusarium fujikuroi*, einem 37S ribosomalen Protein S26 in Mitochondrien von *Fusarium oxysporum* oder einem putativen 37S ribosomalen Protein aus *Chaetonium thermophilum* nachweisbar.

Es wurde bereits gezeigt, dass eine gesteigerte Genauigkeit von mitochondrialen Ribosomen, induziert durch eine Erythromycin-Behandlung, die replikative Lebensspanne von *S. cerevisiae* verlängert (Holbrook und Menninger 2002). Dieser Befund bestärkt die Annahme, dass mitochondriale Ribosomen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Lebensspanne in der Hefe und vermutlich auch in *P. anserina* einnehmen. Vielleicht ermöglicht die Überexpression von *Pa_1_10620* eine langsamere und genauere Synthese von mitochondrialen Proteinen, welche sich in der beobachteten Lebensspannenverlängerung (Abbildung 17 B) äußern könnte.

Für Pa_1_10620, welches nicht als aktive SOD wirkt, wird also aufgrund der Annotation auf der *P. anserina*-Genomseite, der mitochondrialen Lokalisation und der vermutlich essentiellen Funktion eine Aufgabe als mitochondriales ribosomales Protein vermutet.

5.2.2 Pa_1_10630 und Pa_1_6300

Die Suche nach den GO-Bezeichnungen „Superoxid metabolische Prozesse“, „Entfernung von Superoxidradikalen“ und „SOD-Aktivität“ in Transkriptomdaten von *P. anserina* lieferte erste Anhaltspunkte, dass es sich bei Pa_1_10630 und Pa_1_6300 um SODs handeln könnte (Philipp et al. 2013, Wiemer und Osiewacz 2014). Den Proteinen konnte auf der *P. anserina*-Genomseite (http://podospora.igmors.u-psud.fr/) keine Funktion zugeordnet werden. Eine bioinformatische Untersuchung zeigte, dass *Pa_1_10630* bzw. *Pa_1_6300* für 276 bzw. 178 Aminosäuren lange Proteine mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 28,2 kDa bzw. 18,6 kDa kodieren. Beide putativen PaSODs enthalten je ein Cu/ZnSOD-Bindemotiv, aber keine MLS. Neben einer geringen Identität von Pa_1_10630 und Pa_1_6300 zu PaSOD1 wurden höhere Übereinstimmungen der Volllängenproteine mit den aus *C. albicans* bekannten CaSOD4, CaSOD5 und CaSOD6 (Tabelle 25) sowie einem putativen Cu/ZnSOD-ähnlichen Protein aus *Glarea lozoyensis* ATCC 20868 (Identität zu Pa_1_10630: 52,08 %, Identität zu Pa_1_6300: 36,72 %) nachgewiesen. Das Genom des humanpathogenen Pilzes *C. albicans* kodiert für eine Familie von extrazellulären Proteinen mit GPI-Anker, CaSOD4-6, die Ähnlichkeiten zu Cu/ZnSODs aufweisen und den Organismus vor extrazellulärem Superoxid schützen. Für CaSOD4 und CaSOD5 konnte bereits eine SOD-Aktivität ermittelt werden, während eine entsprechende Bestätigung für CaSOD6 noch aussteht (Frohner et al. 2009, Martchenko et al. 2004). Die extrazellulären Cu/ZnSOD-ähnlichen Proteine sind im Reich der Pilze weit verbreitet (Gleason et al. 2014). Für gewöhnlich dient Kupfer den SODs als Katalysator für die Disproportionierungsreaktion und Zink stabilisiert das jeweilige Protein. Es gibt allerdings Befunde, dass Zink nicht essentiell ist: CaSOD5, welche die höchsten Identitätswerte zu Pa_1_10630 und Pa_1_6300 aufweist, ist die erste bekannte SOD, die ausschließlich Kupfer bindet (Gleason et al. 2014).

In *P. anserina* konnten sowohl *Pa_1_10630*-Transkripte in juvenilen und seneszenten Wildtypen (Tabelle 26) (Wiemer und Osiewacz 2014), als auch das Pa_1_10630-Protein in isolierten mitochondrialen Extrakten nachgewiesen werden (Zusammenarbeit mit AK Rögner, Ruhr-Universität Bochum, persönliche Mitteilung). Ferner war Pa_1_10630 auch in Sekretomanalysen nachweisbar (Luce, AK Osiewacz, Daten nicht publiziert). Aufgrund des Nachweises von Pa_1_10630 in Sekretomanalysen ist davon auszugehen, dass es sich bei Pa_1_10630 um ein sekretiertes Protein handelt. Die Anwesenheit von Pa_1_10630 in den vom AK Rögner durchgeführten Proteomanalysen ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die verwendeten mitochondrialen Extrakte nicht vollständig vom ER separiert werden können. Da das Protein nach der Synthese im Cytoplasma in das ER befördert und von dort weitergeleitet wird, ist es auch in diesem Kompartiment nachweisbar. SOD-Aktivitätsfärbungen mit Gesamtproteinextrakten, mitochondrialen Extrakten sowie aufkonzentrierten sekretierten Proteinen (Zintel 2012) zeigten keine SOD-Aktivität, die nicht auf PaSOD1, PaSOD2 oder PaSOD3 zurückzuführen war. Zum jetzigen Zeitpunkt kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei Pa_1_10630 um ein Protein mit SOD-Aktivität handeln könnte, welches beispielsweise unter den gewählten Anzuchtbedingungen in zu geringen Mengen vorlag, oder entwicklungsspezifisch exprimiert wird und daher keine SOD-Aktivität nachzuweisen war. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass Pa_1_10630 ein sekretiertes bzw. extrazelluläres Protein ist.

Für *Pa_1_6300* wurden in einer Transkriptomstudie nur sehr geringe Transkriptmengen im juvenilen und seneszenten Wildtyp ermittelt (Wiemer und Osiewacz 2014). Möglicherweise waren die gewählten Anzuchtbedingungen nicht optimal: Bei einer extrazellulären SOD wird vielleicht ein direkter Konkurrent benötigt, um die Expression des entsprechenden Gens zu induzieren. Trotz geringer Transkriptmengen war Pa_1_6300 in Proteomanalysen von isolierten mitochondrialen Extrakten, jedoch nicht in Sekretomanalysen, detektierbar (Luce, AK Osiewacz, Daten nicht publiziert; Zusammenarbeit mit AK Rögner, Ruhr-Universität Bochum, persönliche Mitteilung). Da für Pa_1_6300 keine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt wird, wäre es möglich, dass auch dieses Protein sekretiert wird und lediglich aufgrund der geringen Expression in den Sekretomstudien nicht nachgewiesen werden konnte. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass es sich um ein mitochondrial lokalisiertes Protein mit einer alternativen MLS handeln könnte, wie beispielsweise die SODs von *Toxoplasma gondii* und *Plasmodium falciparum*, welche von den herkömmlichen Algorithmen zur Berechnung einer mitochondrialen Lokalisation nicht erkannt werden (Brydges und Carruthers 2003, Sienkiewicz et al. 2004). Um die Lokalisation von Pa_1_6300 abschließend zu klären, wäre eine *eGfp*-Fusion des Gens unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors hilfreich. Wie für Pa_1_10630 wurde auch für Pa_1_6300 mittels „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbung kein Hinweis auf eine SOD-Aktivität gefunden, welche nicht PaSOD1-3 zugeordnet werden konnte.

Es lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig ausschließen, dass es sich bei Pa_1_10630 und Pa_1_6300 um funktionelle und aktive SODs handelt. Zur Verifizierung wäre eine Über-

expression der Gene hilfreich, sodass die entsprechenden Proteine in höheren Mengen vorliegen und genauer charakterisiert werden können.

5.3 Oxidativer Stress beeinflusst die Lebensspannen der *PaSod3*-Mutanten

Der Großteil des in einer heterotrophen Zelle entstehenden Superoxids wird auf die Elektronentransportkette in den Mitochondrien zurückgeführt (Lenaz 2001, Turrens und Boveris 1980). Aufgrund seiner negativen Ladung kann das Superoxid die Membranen dieses Kompartiments nicht passieren (Muller et al. 2004). Das Genom von *P. anserina* kodiert für eine mitochondriale MnSOD, PaSOD3, die mitochondriales Superoxid abbauen kann. Neben PaSOD3 können auch geringe Mengen der hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisierten Cu/ZnSOD im Intermembranraum der Mitochondrien nachgewiesen werden (diese Arbeit, Zintel et al. 2010). Der Hauptanteil des mitochondrialen Superoxids wird vermutlich von PaSOD3 detoxifiziert, sodass angenommen wurde, dass eine genetische Modifikation von *PaSod3* zu starken Auswirkungen auf den entsprechenden Stamm führen würde. Ähnliches wurde bereits für andere Organismen gezeigt. In der Bäckerhefe resultiert die Deletion der mitochondrialen *MnSod* in einer Reduktion der replikativen Lebensspanne (Unlu und Koc 2007). Bei Mäusen führt der Verlust der mitochondrialen SOD u. a. dazu, dass die entsprechenden Individuen innerhalb von zehn Tagen nach der Geburt sterben (Li et al. 1995). In *P. anserina* wurde hingegen keine negative Auswirkung der Deletion von *PaSod3* beobachtet (Zintel et al. 2010). Dieser Befund erschien zunächst widersprüchlich. Aber auch in anderen Organismen sind unerwartete Auswirkungen bei dem Verlust der mitochondrialen SOD bekannt. Z. B. in *C. elegans* resultiert die Deletion einer der beiden mitochondrialen *Sod*-Gene, *Sod-2*, in einer Lebensspannenverlängerung, trotz vermehrter oxidativer Proteinschäden. Eine Verlust der mitochondrialen Sod-3 führt hingegen zu keinen Lebensspannenveränderungen im Vergleich zum Wildtyp (van Raamsdonk und Hekimi 2009, Yang et al. 2007). Im Gegensatz zu der Deletion der *PaSod3*, welche keine Beeinflussung der Überlebensrate hervorruft, resultiert eine entsprechende Überexpression in *P. anserina* in einer deutlichen Verkürzung der Lebensspanne (Zintel et al. 2010). Während in *PaSod3*_OEx-Stämmen u. a. eine erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge für den negativen Effekt auf das Überleben verantwortlich gemacht wird (Kowald et al. 2012, Zintel et al. 2010) ist unklar, wieso der ∆*PaSod3*-Stamm keine offensichtlichen Veränderungen aufweist.

Zur Klärung der offenen Befunde wurden deshalb im Rahmen dieser Doktorarbeit Lebensspannenanalysen der *PaSod3*-Mutanten auf Medium sowohl mit als auch ohne den Stressoren Paraquat bzw. Wasserstoffperoxid durchgeführt, welche Superoxid- bzw. Wasserstoffperoxid-Stress induzieren. Während die Überlebensrate der *PaSod3*-Deletionsmutante auf PASM-Medium ohne Stressor (Abbildung 18 A) keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp aufwies, zeigten die beiden *PaSod3*_OEx-Stämme, *PaSod3*_OEx1 und *PaSod3*_OEx3, eine signifikant

verkürzte Lebensspanne. Diese Verkürzung ist auf die gesteigerte Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid und die im Folgenden durch Wasserstoffperoxid induzierten Schäden zurückzuführen (Grimm und Osiewacz 2015, Zintel et al. 2010).

Eine Anzucht auf Medium mit 5 µM, 10 µM oder 15 µM Paraquat (Abbildung 18 B - D), welches zur Generierung intrazellulären Superoxids führt, zeigte keine Auswirkungen auf die Lebensspanne des Wildtyps. Dies galt auch bei Zugabe von 3 mM bzw. 6 mM Wasserstoffperoxid zu dem Anzuchtmedium (Abbildung 19 A - B). Die Kultivierung auf der höchsten in dieser Arbeit getesteten Wasserstoffperoxid-Konzentration (9 mM) resultierte allerdings in einer reduzierten Überlebensrate des Wildtyps (Abbildung 19 C).

Im Gegensatz zu dem Wildtyp wies der Δ*PaSod3*-Stamm auf allen getesteten Paraquat-Konzentrationen eine verkürzte Lebensspanne auf. Eine Kultivierung auf Wasserstoffperoxid-haltigem Medium zeigte bei den untersuchten Konzentrationen hingegen keine signifikanten Veränderungen der Überlebensraten im Vergleich zu PASM-Medium. Dies kann durch das Fehlen der PaSOD3 erklärt werden (Abbildung 40 links). Aufgrund der *PaSod3*-Deletion wird das in der Matrix der Mitochondrien entstehende Superoxid nicht in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Somit liegt in dem entsprechenden Stamm weniger Wasserstoffperoxid als im Wildtyp vor. Daher kann der Deletionsstamm höhere dem Medium zugegebene H_2O_2-Konzentrationen als der Wildtyp detoxifizieren, ohne Auswirkungen auf die Überlebensrate zu zeigen. Die Lebensspannenverkürzung auf Paraquat-haltigem Medium ist ebenfalls auf das Fehlen der PaSOD3 zurückzuführen. Das in der Matrix entstehende Superoxid, welches durch Paraquat vermehrt gebildet wird, kann die Mitochondrien wegen seiner Eigenladung nicht verlassen (Muller et al. 2004), kann in dem Δ*PaSod3*-Stamm aber auch nicht detoxifiziert werden. Lediglich im Intermembranraum gebildetes Superoxid ist möglicherweise in der Lage, die äußere Mitochondrienmembran über spannungsabhängige Anionenkanäle oder den TOM-Komplex zu passieren (Budzińska et al. 2009, Han et al. 2003), um im Cytoplasma detoxifiziert zu werden, oder durch die im Intermembranraum vorkommende PaSOD1 (Anhang Abbildung S48) abgebaut zu werden. Das beim Abbau von Superoxid entstehende Wasserstoffperoxid ist membrangängig, kann deshalb den Ort der Entstehung verlassen und im Cytoplasma in unschädliche Produkte umgewandelt werden. Im Vergleich zu PaSOD3 ist die PaSOD1-Menge in Mitochondrien gering. Daher lässt sich vermuten, dass die *PaSod3*-Deletion nicht durch PaSOD1 im Intermembranraum ausgeglichen werden kann. Auf Medium ohne zusätzlichen Stressor kann *P. anserina* die *PaSod3*-Deletion scheinbar tolerieren bzw. kompensieren, ohne eine Beeinträchtigung der Überlebensrate zu zeigen. Wird die intrazelluläre Superoxid-Menge durch Paraquat erhöht und kann nicht effizient abgebaut werden, führt dies zu einer erheblichen Zunahme an zellulären Schäden, was wiederum in einer Abnahme der medianen Lebensspanne resultiert. Ähnliches wurde auch für *C. elegans* gezeigt: Eine Doppelmutante, welcher beide mitochondrial lokalisierten SODs fehlen, zeigt keine Veränderung der Lebensspanne unter Normalbedingungen (Honda et al. 2008). Die Induktion von oxidativem Stress durch einen Sauerstoffgehalt von 98 %,

Medium mit 50 mM Paraquat und der Inhibition der DNA-Synthese durch Zugabe von dFUR (5´-Fluoro-deoxyuridin) führt bei *C. elegans* allerdings im letzten Larvalstadium (L4) im Vergleich zum Wildtyp zu einer reduzierten Überlebensrate (Honda et al. 2008).

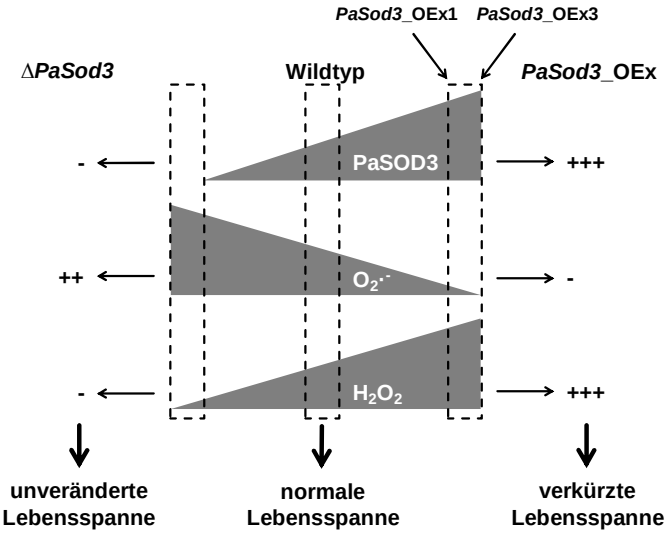


Abbildung 40: Übersicht zur Auswirkung der Modifikation von *PaSod3*. Die Deletion des für die mitochondrial lokalisierte SOD kodierenden Gens, *PaSod3* (links), resultiert in einer Akkumulation von mitochondrialem Superoxid ($O_2^{\cdot -}$). Durch PaSOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien können geringe Mengen des hier entstehenden Superoxids in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt werden. Aufgrund der geringen Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid ist die in Δ*PaSod3*-Stämmen vorhandene Wasserstoffperoxid-Menge gering. Die Lebensspanne des Δ*PaSod3*-Stammes wird im Vergleich zum Wildtyp (Mitte) nicht beeinflusst. In *PaSod3*_OEx-Stämmen (rechts) wird aufgrund der hohen PaSOD3-Menge und -Aktivität (der *PaSod3*_OEx3-Stamm hat eine etwas höhere PaSOD3-Aktivität als der *PaSod3*_OEx1-Stamm) mitochondriales Superoxid effizient in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Da die Wasserstoffperoxid-detoxifizierenden Enzyme aber nicht in der Lage sind, diese enorme entstehende ROS-Menge in unschädliche Produkte umzuwandeln, werden zellulären Schäden durch Wasserstoffperoxid induziert, was in einer Lebensspannenverkürzung der *PaSod3*_OEx-Stämme resultiert.

Die auf PASM gezeigte verkürzte Lebensspanne des *PaSod3*_OEx1-Stammes wurde durch Supplementation des Mediums mit Paraquat weiter reduziert. Neben der ohnehin schon hohen Umwandlungsrate von Superoxid in Wasserstoffperoxid in *PaSod3*_OEx-Stämmen wird dieser Prozess durch Paraquat noch weiter verstärkt. Dies resultiert in einer sehr hohen Wasserstoffperoxid-Konzentration. Da die H_2O_2-detoxifizierenden Prozesse nicht im selben Maß erhöht werden, wie die Entstehung von Wasserstoffperoxid (Grimm und Osiewacz 2015), führt die Akkumulation dieser ROS zu einem frühzeitigen Sterben der *PaSod3*_OEx1-Stämme. Der zweite unabhängige, *PaSod3*-überexprimierende Stamm, *PaSod3*_OEx3, zeigte ein etwas anderes Verhalten. Zunächst starben bei den untersuchten Paraquat-Konzentrationen etwa die Hälfte der getesteten Individuen früher als die des Wildtyps. Die verbleibende Hälfte der Individuen schien in der Lage zu sein, das Paraquat tolerieren zu können und wies sogar eine längere maximale Lebensspanne als der Wildtyp auf. Allerdings sind die Unterschiede zwischen den Lebensspannen des *PaSod3*_OEx3-Stammes und des Wildtyps nicht signifikant. Möglicherweise stellt dies eine Art Resistenzentwicklung einiger Individuen des *PaSod3*_OEx3-Stammes gegenüber Paraquat dar.

Eine Anzucht auf Medium mit Wasserstoffperoxid führte ab einer Konzentration von 6 mM zu einer verkürzten Lebensspanne bei dem *PaSod3*_OEx1-Stamm. Der *PaSod3*_OEx3-Stamm wies bereits bei 3 mM H_2O_2 eine signifikante Verringerung der relativen Überlebensrate im Vergleich zum Wildtyp auf. Die *PaSod3*_OEx-Stämme, die aufgrund der genetischen Modifikation bereits eine erhöhte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge enthalten, können das zusätzliche exogene Wasserstoffperoxid nicht effizient abbauen. Dieser gesteigerte oxidative Stress resultiert in einer Lebensspannenverkürzung im Vergleich zu *PaSod3*_OEx-Stämmen auf PASM (Abbildung 40 rechts). Die geringere Toleranz des *PaSod3*_OEx1-Stammes gegenüber Paraquat bei einer gleichzeitig höheren Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid im Vergleich zum *PaSod3*_OEx3-Stamm ist möglicherweise auf eine etwas höhere PaSOD3-Aktivität im *PaSod3*_OEx3-Stamm als im *PaSod3*_OEx1-Stamm zurückzuführen. Diese Hypothese wird durch Daten von Sandra Zintel gestützt, bei der eine „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung auf eine etwas stärkere PaSOD3-Aktivität in *PaSod3*_OEx3-Stämmen als in *PaSod3*_OEx1-Stämmen hinweist (Zintel et al. 2010).
Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Auswirkungen der *PaSod3*-Deletion durch PaSOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien reduziert, aber, zumindest bei zusätzlichem oxidativen Stress, nicht vollständig kompensiert werden können. In *PaSod3*_OEx-Stämmen kommt es aufgrund der hohen PaSOD3-Menge und -Aktivität zu einer effizienten Umwandlung von mitochondrialem Superoxid in Wasserstoffperoxid. Letzteres kann jedoch nicht im selben Maß detoxifiziert werden, wie es generiert wird. Die durch Wasserstoffperoxid entstehenden zellulären Schäden sind vermutlich ein Grund dafür, dass die Lebensspannen der *PaSod3*_OEx-Stämme verkürzt sind. Die gewonnenen Ergebnisse liefern auch Hinweise darauf, dass das entstehende Wasserstoffperoxid einen negativeren Effekt auf *PaSod3*_OEx-Stämme hat, als die erhöht Superoxid-Menge in dem Δ*PaSod3*-Stamm. Detailliertere Untersuchungen der *PaSod3*_OEx-Stämme sind in Kapitel 5.5 beschrieben.

5.4 Energie-abhängige Prozesse kompensieren den Verlust der PaSOD3

Aufgrund der bisherigen Analysen des Δ*PaSod3*-Stammes konnte nicht abschließend geklärt werden, wie dieser Stamm den Verlust der PaSOD3 kompensiert. Transkriptomanalysen von juvenilen und seneszenten Δ*PaSod3*-Stämmen und Wildtypen zeigten bei einem Vergleich von juveniler Mutante mit juvenilem Wildtyp sowie seneszenter Mutante mit seneszentem Wildtyp keine deutlich veränderten Transkriptmengen (≥ Faktor zwei) für *PaSod1* und *PaSod2*, sodass eine Kompensation des Verlustes der PaSOD3 durch die verbleibenden SODs auf transkriptioneller Ebene ausgeschlossen wird. Die Auswertung der Transkriptdaten sowie eine „GO-enrichment" Analyse zeigten, dass Transkripte, welche im Δ*PaSod3*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp eine um mindestens Faktor drei erhöhte Expression aufwiesen, dem Energiemetabolismus und der Detoxifizierung zugeordnet werden konnten. Im Gegensatz dazu wiesen

mit Transportprozessen, mit der Zellwand sowie mit der Proteolyse assoziierte Transkripte eine deutlich reduzierte Expression auf. Zudem wurde deutlich, dass viele der differentiell exprimierten Transkripte im Zusammenhang mit mitochondrialen Prozessen stehen, und, dass diese in juvenilen sowie seneszenten Δ*PaSod3*-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp ausschließlich vermehrt vorlagen (Tabelle 28). Es konnten diverse Komponenten der Elektronentransportkette detektiert werden, die an der Umwandlung des Protonengradienten in ATP beteiligt sind. Diese Ergebnisse liefern Hinweise darauf, dass der Verlust der PaSOD3 durch Energie-abhängige Prozesse sowie eine erhöhte Detoxifizierung kompensiert werden kann.

Es liegt nahe anzunehmen, dass der Δ*PaSod3*-Stamm, der mitochondriales Superoxid nicht effizient detoxifizieren kann, Veränderungen in ähnlichen Transkripten aufweist, wie der Wildtyp, der mit Paraquat behandelt wurde, welches überwiegend zur Generierung von mitochondrialem Superoxid führt (Cochemé und Murphy 2008). Eine „GO-enrichment" Analyse der Transkriptomdaten von Paraquat-behandelten Wildtypen wies eine Anhäufung mitochondrialer Komponenten (mitochondriale Matrix, innere Mitochondrienmembran, mitochondrialer Intermembranraum) nach (Wiemer und Osiewacz 2014). Diese entspricht aber nicht den in Δ*PaSod3*-Stämmen hochregulierten Transkripten, welche überwiegend Komponenten der Atmungskette darstellen, sodass die Deletion von *PaSod3* nicht direkt mit einer Paraquat-Behandlung gleichgesetzt werden kann.

Zusammenfassend deuten die Analysen der Transkriptomdaten darauf hin, dass hauptsächlich mit der mitochondrialen Elektronentransportkette und der Detoxifizierung in Verbindung stehende Prozesse in dem *PaSod3*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp hochreguliert werden. Hingegen werden extrazelluläre sowie Transport-Prozesse herunterreguliert. Das Zusammenspiel der veränderten Expressionsniveaus – Induktion von Energie-abhängigen und detoxifizierenden Prozessen und verminderte Expression nicht unbedingt benötigter Prozesse – sind vermutlich dafür verantwortlich, dass der Δ*PaSod3*-Stamm keine offensichtlichen negativen Auswirkungen im Vergleich zum Wildtyp aufweist.

5.5 Mangan ist wichtig für die Detoxifizierung von ROS

Seit bekannt ist, dass SODs für den ersten Schritt der Detoxifizierung von Superoxid notwendig sind, wird ihnen eine zentrale Rolle bei der Entgiftung dieser ROS zugeordnet. Diverse Studien an unterschiedlichen Organismen mit genetisch veränderten, für SODs kodierenden, Genen resultierten allerdings in kontroversen Ergebnissen. Die zunächst aufgestellte Hypothese, dass eine erhöhte SOD-Menge einen positiven, und eine reduzierte SOD-Menge einen negativen Effekt auf den jeweiligen Organismus haben würde, konnte durch diese Studien nicht generell bestätigt werden (Li et al. 1995, Melov et al. 1999, van Raamsdonk und Hekimi 2009). Auch für *P. anserina* traf die Hypothese nicht zu. Erste Studien von Frau Zintel zeigten, dass die Überexpression von *PaSod3* negative Auswirkungen nach sich zog, wohingegen die Deletion keinen offensichtlichen Einfluss hatte (Zintel 2012, Zintel et al. 2010). Da sowohl die Deletion als

auch die Überexpression der *PaSod3* in einer Veränderung der intrazellulären ROS-Menge und -Zusammensetzung resultieren, wurde angenommen, dass die negativen Auswirkungen, die lediglich für *PaSod3*_OEx-Stämme auftraten, nicht ausschließlich auf eine Veränderung der ROS-Zusammensetzung zurückgeführt werden können. Eine mögliche Erklärung für die in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen beobachteten Einschränkungen (bezüglich Wuchsrate, Lebensspanne und Stress-Resistenz) wäre eine Veränderung im Mangan-Haushalt, da Mangan in diesen Stämmen in viel größeren Mengen als Co-Faktor in PaSOD3 eingebaut wird und somit anderen Mn-abhängigen Enzymen nicht mehr zur Verfügung steht. Wuchsratenanalysen bestätigten den vermuteten Mangan-Mangel (Abbildung 20 A): Während in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2-Medium eine signifikant verringerte Wuchsrate im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde, führte die Supplementation des Mediums mit 80 µM $MnSO_4$ zu der Wildtyp-Wuchsrate. Diese verbesserte Wuchsrate konnte auch bei Verwendung von 80 µM $MnCl_2$ erzielt werden (Anhang Abbildung S49), sodass der Effekt auf Mangan und nicht auf den Substituenten zurückzuführen ist. Die *PaSod3*-Deletionsmutante, welche auf M2-Medium keinen Unterschied zum Wildtyp aufweist, und der Wildtyp zeigen mit 80 µM $MnSO_4$ eine etwas bessere Wuchsrate als auf Medium ohne Supplementation, welche aber nicht mit der gesteigerten Wuchsrate der *PaSod3*_OEx-Stämme vergleichbar ist.

Neben der reduzierten Wuchsrate weisen *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2 eine stärkere Pigmentierung als der Wildtyp auf. Durch Supplementation mit $MnSO_4$ konnte das wildtypische Aussehen wiederhergestellt werden (Abbildung 20 B), sodass vermutet wird, dass die veränderte Pigmentierung ein Resultat des Mangan-Mangels bzw. einer gestörten Mangan-Homöostase in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2 ist. Für *P. anserina* wurde bereits gezeigt, dass eine gestörte Kupfer-Homöostase ebenfalls die Pigmentierung beeinflusst: In der grisea-Mutante resultiert der Kupfer-Mangel in einer Hypopigmentierung, welche durch Kupfer-Supplementation wieder behoben werden kann (Marbach et al. 1994, Servos et al. 2012). Dies ist darauf zurückzuführen, dass an der Melanin-Synthese beteiligte Enzyme Kupfer als Co-Faktor benötigen (Servos et al. 2012).

Nicht nur die Wuchsrate ist verringert, sondern auch die Lebensspanne ist in den beiden *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2 signifikant verkürzt. Der Δ*PaSod3*-Stamm zeigt dagegen keine Unterschiede zum Wildtyp. Durch Zugabe von 80 µM $MnSO_4$, welches keinen Einfluss auf die Lebensspanne des Wildtyps oder des Δ*PaSod3*-Stammes hat, wird die verkürzte Lebensspanne der *PaSod3*_OEx-Stämme auf Wildtyp-Niveau erhöht. Ein genereller positiver Effekt von Mangan auf kurzlebige *P. anserina*-Stämme liegt diesem Befund nicht zugrunde: Für die kurzlebigen Mutanten Δ*PaMth1* und *PaCypD*_OEx war keine positive Beeinflussung durch Mangan-Supplementation nachweisbar; im Gegenteil wiesen diese Stämme auf M2(+) im Vergleich zu M2 sogar eine Lebensspannenverkürzung auf (Abbildung 25). Diese Ergebnisse zeigen, dass Mangan einen positiven Effekt spezifisch auf *PaSod3*_OEx-Stämme hat.

Um diesen positiven Effekt explizit auf Mangan zurückführen zu können, wären Studien mit einem spezifischen Chelator optimal. Zur Zeit ist aber kein Mangan-Chelator bekannt, welcher nicht auch andere divalente Ionen chelatiert (Kehl-Fie et al. 2011, Missy et al. 2000, Tando und Singh 1975). Um dennoch zu bestätigen, dass der positive Effekt auf *PaSod3*-überexprimierende Stämme durch Mangan und nicht durch einen generellen Mangel an divalenten Ionen bedingt ist, wurden Wuchsratenanalysen mit $MgSO_4$- bzw. $ZnSO_4$-Supplementation durchgeführt. Da die getesteten $MgSO_4$- und $ZnSO_4$-Konzentrationen nicht in der Lage sind, die durch $MnSO_4$ hervorgerufene Wuchsratensteigerung zu erzielen (Abbildung 22), wird ein genereller Mangel an divalenten Ionen in *PaSod3*_OEx-Stämmen ausgeschlossen.

Diverse Publikationen beschäftigen sich mit Mangan und dessen Einfluss auf verschiedene Organismen oder Prozesse und postulieren unterschiedliche Wirkweisen. Beispielsweise wurde beschrieben, dass Mangan zusammen mit zellulären Liganden wie Phosphaten oder Laktaten für den katalytischen Schutz vor ROS verantwortlich ist (Al-Maghrebi et al. 2002, Archibald und Fridovich 1982, Inaoka et al. 1999), oder eine antioxidative Wirkung ohne Interaktion mit Proteinen aufweist (Aguirre et al. 2013, Seib et al. 2004). Neuere Studien deuten darauf hin, dass die schützende Wirkung darauf zurückzuführen sein könnte, dass Mangan Eisen-Ionen in mononukleären Metalloenzymen ersetzt (Anjem et al. 2009). Mangan vermindert so Proteinschäden, da in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid weniger mit Eisen-beladene Proteine vorliegen, die die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion eingehen könnten (Anjem et al. 2009). Der genaue Wirkmechanismus von Mangan ist allerdings bis heute nicht geklärt.
In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde $MnSO_4$ verwendet, da dieses bereits standardmäßig in Spuren (296 nM) im M2-Medium vorliegt. Für Untersuchungen in anderen Organismen, die mit $MnSO_4$ durchgeführt wurden, gibt es widersprüchliche Ergebnisse: Bei *C. elegans* führt eine Kultivierung auf NGM-Medium mit 0,5 mM Mangan zu einer gesteigerten Resistenz gegenüber oxidativem Stress und einer verkürzten Lebensspanne. Die Autoren vermuten, dass Mangan Superoxid abfangen oder detoxifizierende Enzyme hochregulieren könnte und so die beobachteten Effekte auslöst (Lin et al. 2006). In Makrophagen-Zelllinien aus Mäusen wurde hingegen keine Superoxid-abfangende Wirkung von $MnSO_4$ nachgewiesen (Failli et al. 2009).
Um zu untersuchen, ob die durch Mangan hervorgerufene Lebenspannenverlängerung der *PaSod3*_OEx-Stämme auf einer antioxidativen Wirkweise beruht, wurde die Wirkung von aus der Literatur bekannten Antioxidantien (L-Ascorbinsäure und N-Acetyl-L-Cystein) auf *PaSod3*-Stämme analysiert. L-Ascorbinsäure ist z. B. aus Studien an Hühnern bekannt: Wird in DT40-Zellen *Sod1* oder *Sod2* deletiert, kann L-Ascorbinsäure die durch den Verlust der SODs hervorgerufenen Effekte, wie erhöhten oxidativen Stress oder eine reduzierte Wuchsrate, minimieren (Tamari et al. 2013). Für N-Acetyl-L-Cystein war ein positive Wirkung auf die Telomerase-Aktivität und die Glutathion-Synthese nachweisbar (Liu et al. 2012, Voghel et al. 2008). Die Wuchsraten-

analysen mit verschiedenen Konzentrationen der beiden Antioxidantien (Abbildung 23) zeigten zwar einen positiven Effekt, allerdings konnte für die *PaSod3*_OEx-Stämme die Wildtyp-Wuchsrate nicht wiederhergestellt werden, wie es für Supplementation mit Mangan möglich war. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die durch Mangan hervorgerufene Lebensspannen-verlängerung nicht auf eine antioxidative Wirkung zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung, ob die Mangan-Limitierung einen Einfluss auf die MnSOD-Aktivitäten hat, wurden *in vitro* SOD-Aktivitätsmessungen durchgeführt. Diese zeigten, dass ausschließlich mitochondriale Proteinextrakte von *PaSod3*_OEx3-Stämmen, welche eine etwas höhere PaSOD3-Menge enthalten als *PaSod3*_OEx1-Stämme (Daten nicht gezeigt), aber nicht von *PaSod3*_OEx1-Stämmen, von M2(+) im Vergleich zu M2 eine gesteigerte PaSOD3-Aktivität aufwiesen. In Gesamtproteinextrakten waren keine veränderten Gesamt-SOD-Aktivitäten in Abhängigkeit der Mangan-Menge nachweisbar (Abbildung 26). Die Aktivitätssteigerung in der *PaSod3*_OEx3-Mutante, welche auf PaSOD3 zurückzuführen ist, ist möglicherweise durch eine vermehrte Verfügbarkeit des Co-Faktors Mangan zu erklären. Wahrscheinlich ist in *PaSod3*_OEx3-Stämmen, die auf M2-Medium wachsen, nicht ausreichend Mangan vorhanden, um die gesamte Menge des PaSOD3-Apoproteins mit dem Co-Faktor zu beladen. Mit zusätzlichem Mangan durch die Supplementation ist dies möglich. In Gehirnen von Mäusen, die unter Mangan-Mangel angezogen wurden, zeigte sich, wie in *PaSod3*_OEx3-Stämmen, ebenfalls eine geringere MnSOD-Aktivität: Nur 50 % der Aktivität verblieben. In Leberzellen waren es nur noch 17 % der MnSOD-Aktivität im Vergleich zu Mäusen ohne Mangan-Mangel (de Rosa et al. 1980). In anderen Organismen war eine Regulation von *MnSods* auf transkriptioneller oder translationaler Ebene nachweisbar: In *Streptococcus pneumoniae* wurde eine Abnahme der Transkriptmenge der *MnSod SodA* unter Mangan-Mangel gezeigt (Eijkelkamp et al. 2014). In Herzmuskelzellen von Masthähnchen kam es zu einer Dosis-abhängigen Induktion der *MnSod* mRNA-, sowie der entsprechenden Protein-Menge, als auch der MnSOD-Aktivität bei Mn-Supplementation (Gao et al. 2011). Da in *P. anserina* keine Unterschiede in der PaSOD3-Proteinmenge isolierter Mitochondrien in *PaSod3*_OEx-Stämmen in Abhängigkeit von Mangan im Medium festgestellt wurden, ist die erhöhte PaSOD3-Aktivität bei Anzucht auf mit Mangan supplementiertem Medium vermutlich auf eine bessere Beladung des Apoproteins mit Mangan zurückzuführen. Das bedeutet, dass in der *PaSod3*_OEx3-Mutante auf M2-Medium ein Teil des PaSOD3-Proteins in inaktiver Form vorliegt.

Die gesteigerte MnSOD-Aktivität in *PaSod3*_OEx-Stämmen führt im Zuge des Abbaus von Superoxid zu der Entstehung von großen Mengen Wasserstoffperoxid. Wird Letzteres nicht detoxifiziert, kann es, wie auch Superoxid, zu intrazellulären Schäden führen. Dies ist für *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2-Medium der Fall (Abbildung 41 links): Die deutlich erhöhte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge wird nicht effizient in unschädliche Produkte um-gewandelt, da die H_2O_2-abbauenden Enzyme nicht im selben Maß eine gesteigerte Aktivität aufweisen wie PaSOD3. Eine Supplementation mit Mangan führt in *PaSod3*-überexprimierenden

Stämmen zur Induktion des Wasserstoffperoxid-Abbaus (Abbildung 41 rechts), indem die Aktivität von Katalasen und Peroxidasen gesteigert wird (Abbildung 29). Eine Transkriptomstudie des Wildtyps im Vergleich zu der Δ*PaSod3*-Mutante, welche keinen Mangan-Mangel aufweist, zeigte eine gesteigerte Transkriptmenge der vermutlich Mangan-haltigen *PaCatP* (Tabelle 27) um Faktor 4,6 bzw. 3,6 bei dem Vergleich juveniler Deletionsmutante mit Wildtyp bzw. seneszenter Deletionsmutante mit Wildtyp. Für *PaCatA* war eine Steigerung um das 3,1- fache bzw. 2,2-fache bei demselben Vergleich nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Es wäre also denkbar, dass die in *PaSod3*_OEx-Stämmen begrenzte Mangan-Menge im Medium limitierend auf die Expression dieser Gene wirkt. Für die Garnele *Neocaridina hetropoda* wurde eine erhöhte Glutathion-Peroxidase- sowie Katalase-Aktivität (Wang et al. 2010) und in HeLa-Zellen eine gesteigerte Katalase-Aktivität bei Mangan-Supplementation nachgewiesen (Oubrahim et al. 2001). Der Wirkmechanismus ist allerdings unbekannt.

Neben der erhöhten Katalase- und Peroxidase-Aktivität ist die Peroxiredoxin-Menge in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen von M2(+) im Vergleich zu M2 erhöht (Abbildung 28). Die mittels Western Blot-Analyse nachgewiesene Zunahme der Peroxiredoxin-Menge wurde ebenfalls in Proteomanalysen detektiert. Untersuchungen von isolierten Mitochondrien sechs Tage alter Stämme zeigten, dass der Wildtyp 3,6 fmol und der *PaSod3*_OEx3-Stamm 6,7 fmol PaPRX enthielten (Plohnke et al. 2014).

Insgesamt resultieren die nachgewiesenen Veränderungen in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2(+) in einer gesteigerten Wasserstoffperoxid-Abbaurate (Abbildung 30), sodass die erhöhte H_2O_2-Menge entsprechend ihrer vermehrten Entstehung detoxifiziert werden kann. Die Ergebnisse machen deutlich, dass die Modifikation eines einzelnen Gens, dessen Genprodukt Bestandteil eines Netzwerkes von Prozessen ist, weitreichende Auswirkungen haben kann. Nicht nur das Genprodukt selbst, sondern auch alle darauffolgenden Prozesse werden beeinflusst, was zu gravierenden Auswirkungen auf den Organismus führen kann: Durch die Überexpression von *PaSod3* ist das gesamte Detoxifizierungsnetzwerk aus dem Gleichgewicht geraten. Eine detaillierte Übersicht der hier beschriebenen Auswirkungen auf *PaSod3*_OEx-Stämme bei Anzucht auf M2 bzw. M2(+) ist Abbildung 41 zu entnehmen.

Neben dem Detoxifizierungsnetzwerk sind im Speziellen die Mitochondrien von *PaSod3*_OEx-Stämmen betroffen: Auf M2-Medium weisen sie eine deutlich stärkere Fragmentierung auf (Abbildung 31), zeigen einen geringeren Sauerstoffverbrauch sowie eine vermehrte Atmung über die alternative Oxidase (Abbildung 32). In jungen, gesunden Zellen besteht für gewöhnlich ein Gleichgewicht zwischen mitochondrialen Fusions- und Fissionsereignissen. Dies sichert, dass geschädigte Mitochondrien abgebaut werden und eine gesunde Mitochondrien-Population aufrecht erhalten wird. Lange filamentöse Mitochondrien stehen dabei für metabolisch aktive Zellen (Merz et al. 2007). Eine vermehrte Fragmentierung kann beispielsweise durch oxidativen Stress, wie Wasserstoffperoxid, induziert werden (Palermo et al. 2007). Die Verschiebung des

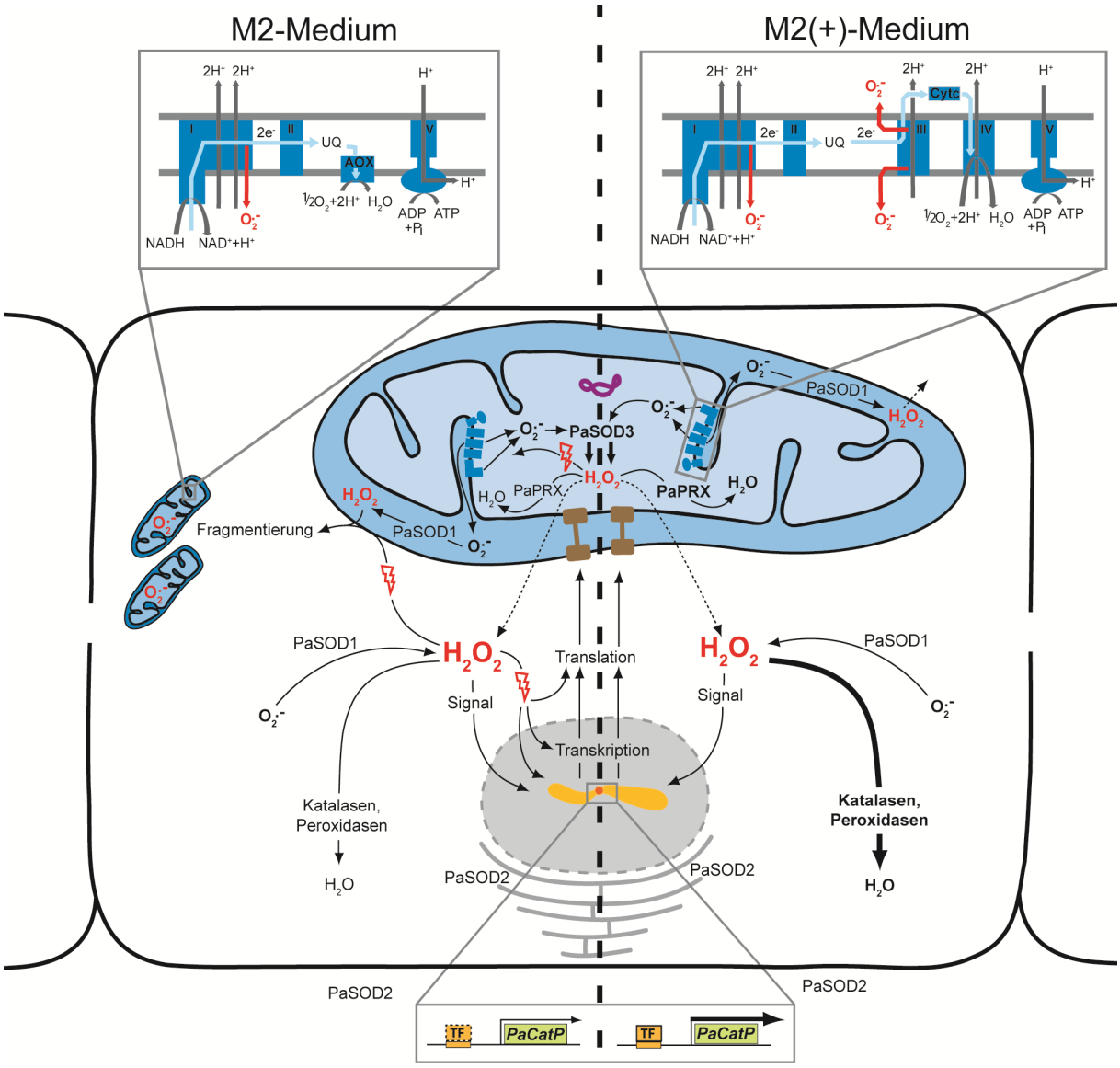


Abbildung 41: Schematische Darstellung der durch Mangan veränderten Prozesse in *PaSod3*_OEx-Stämmen. Dargestellt ist ein Hyphenabschnitt mit den darin ablaufenden Prozessen und den durch die Kultivierung auf M2- oder M2(+)-Medium veränderten Abläufen. An der Elektronentransportkette der Mitochondrien entstehendes Superoxid wird durch die mitochondrial lokalisierte PaSOD3 in der Matrix bzw. durch PaSOD1 im Intermembranraum in Wasserstoffperoxid umgewandelt. Das in den Mitochondrien von *PaSod3*_OEx-Stämmen aufgrund der hohen PaSOD3-Aktivität vermehrt entstehende Wasserstoffperoxid kann von Peroxiredoxin (PaPRX) detoxifiziert werden oder dieses Kompartiment verlassen. Im Cytoplasma stehen Wasserstoffperoxid-detoxifizierende Enzyme wie Katalasen und Peroxidasen bereit, die diese ROS in Wasser umwandeln. **Links:** Auf M2-Medium sind die H_2O_2-abbauenden Enzyme nicht in der Lage, die großen Mengen Wasserstoffperoxid vollständig zu entgiften. Daher kann es sowohl in den Mitochondrien als auch außerhalb dieser zu Schäden (symbolisiert durch Blitze) an molekularen Komponenten kommen. Dies kann in einer negativen Beeinflussung der Transkription, Translation sowie in einer Fragmentierung der Mitochondrien resultieren. Die Transkription von H_2O_2-abbauenden Enzymen läuft auf einem basalen Niveau ab, kann aber vermutlich durch Mangan induziert werden. Die Fragmentierung der Mitochondrien resultiert in einer vermehrten Atmung über die AOX. Dies führt zu einer geringeren Superoxid-Entstehung sowie einer reduzierten ATP-Bildung. **Rechts:** In Anwesenheit von ausreichenden Mengen Mangan werden vermehrt die für Katalase P und Katalase A kodierenden Gene transkribiert. Ferner kommt es zu einer Steigerung der PaPRX-Menge und einer erhöhten Katalase- und Peroxidase-Aktivität bei Mangan-Supplementation. Dies führen zu einer der Entstehung von Wasserstoffperoxid entsprechenden Entgiftungsrate, sodass keine erhöhten intrazellulären Wasserstoffperoxid-Mengen vorliegen. Eine Schädigung der Mitochondrien tritt nicht ein. Die Atmung wird wie im Wildtyp überwiegend über Komplex IV, der Cytochrom c-Oxidase, vollzogen. AOX: Alternative Oxidase, H_2O_2: Wasserstoffperoxid, Mn: Mangan, $O_2^{\cdot-}$: Superoxid, *PaCatP*: Katalase P-Gen, PaSOD1: cytoplasmatische Cu/ZnSOD die auch im Intermembranraum der Mitochondrien gefunden wird (Zintel et al. 2010), PaSOD2: sekretiere MnSOD, PaSOD3: mitochondrial lokalisierte MnSOD, TF: Transkriptionsfaktor.

Gleichgewichts zwischen Fusions- und Teilungsereignissen hin zu Teilungen wird mit Alterungs-, Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen von Zellen in Verbindung gebracht (Labrousse et al. 1999, Li et al. 2004, Scheckhuber et al. 2007) und geht mit einer erhöhten ROS-Produktion einher (Yu et al. 2006).

In Mitochondrien aus Rattengehirnen wurde gezeigt, dass Mangan zu einem Anstieg der Kalzium-Konzentration führt, indem die Ca^{2+}-Aufnahme in die Mitochondrien erhöht und der Ca^{2+}-Efflux inhibiert wird (Gavin et al. 1990). Diese Daten lassen vermuten, dass Mangan eine Rolle bei der Kalzium-Homöostase in *P. anserina*, im speziellen in den *PaSod3*_OEx-Stämmen, spielen und einen Einfluss auf die Apoptose haben könnte. In einer früheren Dissertation wurde bereits belegt, dass die zwei vom Genom von *P. anserina* kodierten Metacaspasen durch Kalzium aktiviert werden. Die aktivierten Metacaspasen können dann Substrate spalten und beispielsweise die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welche an der DNA-Reparatur beteiligt ist, proteolytisch prozessieren, was schlussendlich zum Tod des Individuums führen kann (Strobel 2014).

Neben der veränderten Struktur der Mitochondrien in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2 wurde auch ein verringerter Sauerstoffverbrauch sowie eine vermehrte Atmung über die AOX im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Der geringere Sauerstoffverbrauch steht möglicherweise in direktem Zusammenhang mit dem Mangan-Mangel. Bereits 1970 konnten Hurley und Kollegen einen ähnlichen Zusammenhang nachweisen: In Mitochondrien von Leberzellen aus Mäusen, die unter Mangan-Mangel litten, detektierten sie eine um 34 % reduzierte Sauerstoffaufnahme (Hurley et al. 1970). Die vermehrte Atmung über die AOX in *PaSod3*_OEx-Stämmen ist vermutlich auf die reduzierte Komplex IV-Menge in diesen Stämmen zurückzuführen (Abbildung 33 sowie Plohnke et al. 2014). Die Atmung über die alternative Oxidase resultiert im Vergleich zur Atmung über die Cytochrom c-Oxidase in einer geringeren Superoxid-Entstehung an der Elektronentransportkette. Auf diese Weise wird ein weiterer Anstieg der ROS-Menge in *PaSod3*_OEx-Stämmen, welche eine ohnehin hohe Wasserstoffperoxid-Menge enthalten, vermindert. Neben der geringeren ROS-Entstehung führt die vermehrte Atmung über die AOX für gewöhnlich auch zu einer reduzierten ATP-Bildung. Allerdings kann die ATP-Menge trotz vermehrter AOX-Atmung auch dem Wildtyp-Level entsprechen, wenn beispielsweise die AOX-Gesamtmenge oder die Mitochondrienzahl erhöht ist (Lorin et al. 2001). Eine verringerte ATP-Menge wäre eine mögliche Erklärung für die reduzierte Wuchsrate der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2. Für weitere *P. anserina*-Stämme, wie etwa die Δ*PaRcf1*-, grisea- und Δ*PaCox17*-Mutanten, wurde ebenfalls eine vermehrte Atmung über die AOX sowie eine reduzierte Wuchsrate nachgewiesen. Ferner haben diese Stämme eine verminderte Fertilität (Filippis 2013, Marbach et al. 1994, Stumpferl et al. 2004). Wodurch genau die Fertilität beeinträchtigt ist, ist noch nicht abschließend geklärt, aber es wird angenommen, dass diese auf eine verringerte ATP-Menge zurückzuführen ist (Lorin et al. 2001, Stumpferl et al. 2004). Auch für *PaSod3*-überexprimierende Stämme auf M2-Medium, aber nicht für den Δ*PaSod3*-Stamm, wurde eine Beeinträchtigung der

Fertilität (Abbildung 21) nachgewiesen. Die Anzucht auf M2(+)-Medium, welche die ATP-Bildung positiv beeinflussen könnte, verbessert in *PaSod3*_OEx-Stämmen die Fertilität, aber die Wildtyp-Fertilität wird nicht erreicht.

Die Anzucht auf Medium mit zusätzlichem Mangan verändert nicht nur den Sauerstoffverbrauch und das COX : AOX-Verhältnis, sondern führt auch zu einer vermehrten Bildung von Atmungskettensuperkomplexen in den *PaSod3*_OEx-Stämmen und dem Wildtyp (Abbildung 33). Es wird vermutet, dass Atmungskettensuperkomplexe einen besseren Elektronenfluss aufweisen als einzeln vorliegende Atmungskettenkomplexe. Dies ermöglicht eine höhere Aktivität (Schägger und Pfeiffer 2000). Diese Befunde deuten darauf hin, dass das für die Anzucht von *P. anserina* verwendete M2-Medium, zumindest im Bezug auf die Mangan-Konzentration, limitierend wirken kann. Im Besonderen wird das für *PaSod3*_OEx-Stämme deutlich. Eine ausreichende Menge an Mangan im Medium genügt, um den Wildtyp-Sauerstoffverbrauch, das COX : AOX-Verhältnis und damit vermutlich auch die ATP-Bildung auf Wildtyp-Niveau wiederherzustellen.

Die vermehrte Atmung über die AOX und die daraus vermutlich resultierende verminderte ATP-Bildung in *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2 könnte auch eine Ursache dafür sein, dass diese Stämme auf M2-Medium im Vergleich zu M2(+)-Medium mehr unprozessierte mitochondriale Proteine enthalten (Abbildung 36). Eine veränderte Proteinmenge, abhängig vom Anzuchtmedium, wurde ausgeschossen. Der Import von cytoplasmatischen Proteinen in die Mitochondrien erfolgt über TOM („translocase of the outer membrane“) und TIM („translocase of the inner membrane“) sowie assoziierte HSPs („heat shock proteins“). Damit Eintransport und Prozessierung der mitochondrialen Proteine erfolgreich ablaufen, wird ein ausreichend hohes Membranpotenzial und Energie in Form von ATP benötigt (Pfanner et al. 1988, van Loon et al. 1988). Neben einer geringeren ATP-Menge in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2 könnte aber auch das Membranpotenzial verändert sein und den Import sowie die Prozessierung der mitochondrialen Proteine, wie in dieser Arbeit für PaSOD3 und PaCYPD gezeigt (Abbildung 36), beeinträchtigen. Um diese Annahme bestätigen oder verwerfen zu können, müssten Experimente durchgeführt werden, die das Membranpotenzial der Mitochondrien bestimmt.

Untersuchungen mit dem Wildtyp auf Medium mit Wasserstoffperoxid zeigten, dass extrazelluläres Wasserstoffperoxid ähnliche Auswirkungen auf den Wildtyp hat, wie die durch Überexpression der *PaSod3* bedingte erhöhte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge. Auch im Wildtyp wird die durch Wasserstoffperoxid verkürzte Lebensspanne durch Mangan revertiert, sowie die Aktivität von H_2O_2-detoxifizierenden Enzymen gesteigert. Somit stellen *PaSod3*_OEx-Stämme ein Modell für gesteigerte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Mengen in *P. anserina* dar.

Zusammenfassend führt die Kultivierung von *PaSod3*_OEx-Stämmen auf M2-Medium zu einer stark erhöhten Wasserstoffperoxid-Menge, die, vermutlich aufgrund von ausgelasteten Kapazitäten von Wasserstoffperoxid-detoxifizierenden Enzymen, nicht effizient eliminiert werden kann.

Die hohen Mengen dieser ROS können zu Schäden an molekularen Komponenten führen und dadurch u. a. Transkription und Translation beeinflussen sowie in einer Fragmentierung der Mitochondrien resultieren. Ferner ist wahrscheinlich die hohe Wasserstoffperoxid-Menge für die verkürzte Lebensspanne der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2-Medium mitverantwortlich. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente geben Hinweise darauf, dass Mangan bei hohen Wasserstoffperoxid-Mengen benötigt wird, um diese effizient zu detoxifizieren, indem beispielsweise die Expression von an der H_2O_2-Detoxifizierung beteiligten Enzymen vermehrt abläuft. Ist Mangan hingegen limitiert und der Abbau von Wasserstoffperoxid nicht mehr im benötigten Ausmaß möglich, wird vermehrt über die alternative Oxidase geatmet, um die Generierung von weiteren ROS an der Elektronentransportkette der Mitochondrien zu minimieren. Dies kann allerdings auch mit einer geringeren ATP-Menge und dadurch mit weiteren Limitierungen einhergehen. Eine detaillierte Übersicht der in *PaSod3*_OEx-Stämmen vorliegenden Prozesse unter limitierenden (links) sowie Mangan-Überschuss-Bedingungen (rechts) ist Abbildung 41 zu entnehmen.
Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen Spekulationen zu, ob es in *P. anserina* einen Mangan- und Wasserstoffperoxid-abhängigen Sensor, ähnlich zu dem aus *B. subtilis* bekannten PerR, welches ein Metall-abhängiger transkriptioneller Regulator darstellt, der Peroxid-Stress mit der Metall-Homöostase verknüpft (Zuber 2009), geben könnte. Um solch einen möglichen Sensor in *P. anserina* zu identifizieren müssten weitere Studien mit verschiedenen Konzentrationen Mangan und Wasserstoffperoxid durchgeführt werden.

Insgesamt bietet der hier erstmals gezeigte Zusammenhang zwischen dem Detoxifizierungsnetzwerk sowie der erhöhten Atmung über die AOX in Abhängigkeit der intrazellulären Mangan-Menge eine gute Grundlage für weitere Studien bezüglich des Einflusses von Mangan auf *P. anserina*.

6. Ausblick

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Rolle der Superoxid-Dismutasen, im Besonderen mit PaSOD3 in *P. anserina*. Aus in dieser Arbeit erhaltenen Befunden ergeben sich eine Reihe von Perspektiven für weitergehende Untersuchungen:

1) Für Pa_1_10620, ein Protein, welches sowohl Homologien zu bekannten SODs als auch zu mitochondrialen ribosomalen Proteinen aufweist, wurde keine SOD-Aktivität nachgewiesen. Die Überexpression von *Pa_1_10620* äußerte sich in einem lebensverlängernden Effekt. Die in dieser Arbeit und in einer vorhergehenden Masterarbeit durchgeführten Untersuchungen (Böhl 2013) deuten darauf hin, dass Pa_1_10620 ein mitochondriales ribosomales Protein sein könnte. Dies müsste in weiteren Studien spezifiziert werden. Ein erster Ansatz wäre, das Protein in mitochondrialen Ribosomen nachzuweisen.
2) Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Hinweise darauf, dass die putativen SODs Pa_1_10630 und Pa_1_6300 eine SOD-Aktivität aufweisen. Zur Verifizierung dieses Befundes sollten SOD-Aktivitätsmessungen durchgeführt werden, die sensitiver als die in dieser Arbeit verwendeten „In-Gel“ SOD-Aktivitätsfärbungen sind, beispielsweise *in vitro* Messungen mit dem SOD-Aktivitäts-Kit. Auch sollten verschiedene Anzuchtbedingungen, z. B. mit einem direkten Konkurrenten, analysiert werden. Des Weiteren gilt es, die zelluläre Lokalisation der Proteine abschließend zu bestimmen. Dazu wären GFP-Fusionsproteine unter einem starken, konstitutiven Promotor hilfreich.
3) Für den Δ*PaSod3*-Stamm ergab die Auswertung einer Transkriptomstudie, dass der Verlust der PaSOD3 durch Energie-abhängige und detoxifizierende Prozesse kompensiert wird. Viele der Transkripte, die eine veränderte Expression im Δ*PaSod3*-Stamm im Vergleich zum Wildtyp zeigten, stehen mit Prozessen der mitochondrialen Atmungskette in Verbindung. Zur Bestätigung der Transkriptomdaten könnten BN-PAGEs und Atmungsmessungen mit isolierten Mitochondrien durchgeführt werden.
4) Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Zusammenhang zwischen der Mangan-Menge und dem Detoxifizierungsnetzwerk sowie der Atmung in *P. anserina* gefunden. Mangan steht im Verdacht, auch die Kalzium-Homöostase (Gavin et al. 1990) zu beeinflussen. Ein möglicher Einfluss von Mangan diesbezüglich sollte in *P. anserina* analysiert werden.
5) Zweidimensionale Gelelektrophoresen mit Gesamtproteinextrakten des Wildtyps von M2 sowie der *PaSod3*_OEx1-Stämme von M2(+) zeigten neben einer veränderten Prozessierung mitochondrialer Proteine auch eine Häufung von PaHEX1 in *PaSod3*_OEx1-Stämmen. Bei PaHEX1 handelt es sich um das am häufigsten in Woronin-Körperchen vorkommende Protein. Woronin-Körperchen dienen der Begrenzung des Cytoplasmaverlusts bei Verwundungen, indem sie die in Septen vorhandenen Poren verschließen

(Collinge und Markham 1985). Weiterführende Studien sollten klären, warum PaHEX1 in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2(+) vermehrt vorkommt, und ob die Menge in denselben Stämmen von M2 möglicherweise noch höher ist. Dies würde auf eine protektive Rolle von PaHEX1 bei oxidativem Stress hinweisen.

6) Die durchgeführten Analysen deuten darauf hin, dass die *PaSod3*_OEx-Stämme ein gutes Modell für hohe intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Mengen in *P. anserina* darstellen. Um diese Aussage weiter zu verifizieren, sollten Atmungsmessungen mit dem Wildtyp auf M2- bzw. M2(+)-Medium bei gleichzeitigem Wasserstoffperoxid-Stress durchgeführt werden, um zu untersuchen, ob dies ebenfalls zu einer veränderten Atmung wie in *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2-Medium führt.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit zur Untersuchung der Rolle der Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* lieferten die durchgeführten Analysen folgende Ergebnisse:

1) Sowohl in *P. anserina* als auch in *S. cerevisiae* wurde eine gemeinsame Regulation von SODs nachgewiesen: Stämme, die die mitochondriale *MnSod* (*PaSod3* bzw. *ScSod2*) überexprimieren zeigen eine erhöhte Cu/ZnSOD-Aktivität (PaSOD1 bzw. ScSOD1).
2) Es konnte keine SOD-Aktivität für die putativen SODs Pa_1_10620, Pa_1_10630 und Pa_1_6300 detektiert werden. Für *Pa_1_10620*, dessen Überexpression unter Standardbedingungen zu einer Lebensverlängerung führt, wird eine Funktion als mitochondriales ribosomales Protein angenommen.
3) Der Δ*PaSod3*-Stamm weist keinen Unterschied im Phänotyp, der Wuchsrate und der Lebensspanne unter Standardbedingungen zum Wildtyp auf. Paraquat-Stress führt allerdings zu einer Kurzlebigkeit des Δ*PaSod3*-Stammes, wohingegen diese Mutante eine höhere Resistenz gegenüber Wasserstoffperoxid aufweist als der Wildtyp.
4) Transkriptomanalysen des Wildtyps und der Δ*PaSod3*-Mutante lassen vermuten, dass eine Hochregulation von Detoxifizierungs- und Energie-abhängigen Prozessen die durch den Verlust der mitochondrialen PaSOD3 vermuteten negativen Auswirkungen kompensieren.
5) *PaSod3*_OEx-Stämme weisen unter Standardbedingungen aufgrund der erhöhten intrazellulären Wasserstoffperoxid-Menge, bedingt durch die vermehrte Umsetzung von Superoxid, diverse negative Auswirkungen auf: Eine reduzierte Wuchsrate, verkürzte Lebensspanne, geringere Fertilität, stärkere Pigmentierung, vermehrt fragmentierte Mitochondrien, mehr unprozessierte mitochondriale Proteine und weniger Komplex IV der Atmungskette als der Wildtyp. Zusätzlich wird vermehrt über die alternative Oxidase geatmet, um die ROS-Generierung zu reduzieren.
6) Oxidativer Stress in Form von Paraquat führt in *PaSod3*_OEx-Stämmen zu einer weiteren Verkürzung der medianen Lebensspanne, während die maximale Lebensspanne von *PaSod3*_OEx3-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp sogar verlängert ist. Wasserstoff-peroxid resultiert in stark verringerten medianen und maximalen Lebensspannen beider *PaSod3*-überexprimierenden Stämme.
7) Die Anzucht auf Medium mit zusätzlichem Mangan (80 µM $MnSO_4$) kann die beobachteten Defekte der *PaSod3*_OEx-Stämme fast vollständig auf Wildtyp-Niveau revertieren: Die Wuchsrate, die Lebensspanne, der Phänotyp, die Mitochondrien-morphologie, die Prozessierung mitochondrialer Proteine und die Atmung entsprechen dem Wildtyp. Lediglich die Fertilität erreicht nicht das Wildtyp-Niveau. Diese positiven Effekte von Mangan werden erzielt, da die erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge in

*PaSod3*_OEx-Stämmen entsprechend ihrer Entstehung detoxifiziert wird, denn Mangan führt zu einer gesteigerten Transkription bzw. Aktivität von Katalasen und Peroxidasen sowie zu einer erhöhten Peroxiredoxin-Menge.

8) Die Anzucht des Wildtyps unter Wasserstoffperoxid-Stress resultiert in einer Lebensspannenverkürzung. Diese kann durch Supplementation mit Mangan revertiert werden. Unter diesen Bedingungen weisen u. a. Peroxidasen eine erhöhte Aktivität auf.

Insgesamt ließen die gewonnenen Daten den Schluss zu, dass das Genom von *P. anserina* für drei aktive SODs kodiert. Ein Verlust der einzigen mitochondrial lokalisierten SOD kann durch die Induktion von Energie-abhängigen Prozessen sowie von Detoxifizierungsprozessen kompensiert werden. Ferner weisen die durchgeführten Studien darauf hin, dass *PaSod3*_OEx-Stämme als Modell für erhöhte intrazelluläre Wasserstoffperoxid-Mengen in *P. anserina* verwendet werden können. Darüber hinaus wurde ein Zusammenhang zwischen Mangan und dem Detoxifizierungsnetzwerk in *P. anserina* nachgewiesen. Dabei können zwei Mechanismen zur Reduktion der Wasserstoffperoxid-Mengen unterschieden werden: Bei Vorhandensein ausreichender Mengen Mangan kommt es zu einer stärkeren Detoxifizierung von Wasserstoffperoxid. Ist Mangan allerdings limitiert und die Detoxifizierung kann nicht gesteigert werden, wird eine Umstellung der Atmung eingeleitet, um die neu entstehende ROS-Menge zu minimieren.

8. Literaturverzeichnis

Aaseth J, Skaug M A, Cao Y, Andersen O (2014) Chelation in metal intoxication - principles and paradigms. J Trace Elem Med Biol: DOI 10.1016/j.jtemb.2014.10.001.

Acín-Pérez R, Enriquez J A (2014) The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. Biochim Biophys Acta 1837: 444 - 450.

Acín-Pérez R, Fernández-Silva P, Peleato M L, Pérez-Martos A, Enriquez J A (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes. Mol Cell 32: 529 - 539.

Aguirre J D, Clark H M, McIlvin M, Vazquez C, Palmere S L, Grab D J, Seshu J, Hart P J, Saito M, Culotta V C (2013) A manganese-rich environment supports superoxide dismutase activity in a Lyme disease pathogen, *Borrelia burgdorferi*. J Biol Chem 288: 8468 - 8478.

Al-Maghrebi M, Fridovich I, Benov L (2002) Manganese supplementation relieves the phenotypic deficits seen in superoxide-dismutase-null *Escherichia coli*. Arch Biochem Biophys 402: 104 - 109.

Ames B N, Atamna H, Killilea D W (2005) Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. Mol Aspects Med 26: 363 - 378.

Anderson G L (1982) Superoxide dismutase activity in dauerlarvae of *C. elegans* (Nematoda: Rhabditidae). Can J Zool 60: 288 - 291.

Anjem A, Varghese S, Imlay J A (2009) Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 72: 844 - 858.

Archibald F S, Fridovich I (1981) Manganese and defenses against oxygen toxicity in *Lactobacillus plantarum*. J Bacteriol 145: 422 - 451.

Archibald F S, Fridovich I (1982) The scavenging of superoxide radical by manganous complexes *in vitro*. Arch Biochem Biophys 214: 452 - 463.

Aschner M (2000) Manganese: brain transport and emerging research needs. Environ Health Perspect 108: 429 - 432.

ATSDR (2012) Toxicological profile for manganese. Department of Health and Human Services, Public Service. Atlanta, GA, USA.

Averbeck N B, Borghouts C, Hamann A, Specke V, Osiewacz H D (2001) Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. Mol Gen Genet 264: 604 - 612.

Back P, Matthijssens F, Vlaeminck C, Braeckman B P, Vanfleteren J R (2010) Effects of *sod* gene overexpression and deletion mutation on the expression profiles of reporter genes of major detoxification pathways in *Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol 45: 603 - 610.

Barnese K, Gralla E B, Cabelli D E, Valentine J S (2008) Manganous phosphate acts as a superoxide dismutase. J Am Chem Soc 130: 4604 - 4606.

Barnese K, Gralla E B, Valentine J S, Cabelli D E (2012) Biologically relevant mechanism for catalytic superoxide removal by simple manganese compounds. Proc Natl Acad Sci U S A: DOI 10.1073/pnas.1203051109.

Baud L, Ardaillou R (1986) Reactive oxygen species: production and role in the kidney. Am J Physiol Real Physiol 251: 765 - 776.

Bedard K, Krause K H (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. Physiol Rev 87: 245 - 313.

Benedetto A, Au C, Aschner M (2009) Manganese-induced dopaminergic neurodegeneration: insights into mechanisms and genetics shared with Parkinson's disease. Chem Rev 109: 4862 - 4884.

Benov L T, Fridovich I (1994) *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. J Biol Chem 269: 25310 - 25314.

Berlett B S, Chock P B, Yim M B, Stadtman E R (1990) Manganese(II) catalyzes the bicarbonate-dependent oxidation of amino acids by hydrogen peroxide and the amino acid-facilitated dismutation of hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 389 - 393.

Bermingham-McDonogh O, Gralla E B, Valentine J S (1988) The copper, zinc-superoxide dismutase gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning, sequencing, and biological activity. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 4789 - 4793.

Bewley G C (1988) cDNA and deduced amino acid sequence of murine Cu-Zn superoxide dismutase. Nucleic Acids Res 16: 2728.

Bezlepkin V G, Sirota N P, Gaziev A I (1996) The prolongation of survival in mice by dietary antioxidants depends on their age by the start of feeding this diet. Mech Ageing Dev 92: 227 - 234.

Bielsk B H J, Chan P C (1978) Products of reaction of superoxide and hydroxyl radicals with Mn^{2+} cation. J Am Chem Soc 100: 1920 - 1921.

Böhl L (2013) Masterarbeit: Untersuchungen zur Rolle von Enzymen zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies bei Alterungs- und Entwicklungsprozessen von *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Bonawitz N D, Clayton D A, Shadel G S (2006) Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. Mol Cell 24: 813 - 825.

Borghouts C, Scheckhuber C Q, Werner A, Osiewacz H D (2002) Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. Biogerontology 3: 143 - 153.

Borghouts C, Werner A, Elthon T, Osiewacz H D (2001) Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina.* Mol Cell Biol 21: 390 - 399.

Borgstahl G E, Parge H E, Hickey M J, Beyer W F, Hallewell R A, Tainer J A (1992) The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles. Cell 71: 107 - 118.

Brachmann C B, Davies A, Cost G J, Caputo E, Li J, Hieter P, Boeke J D (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR mediated gene disruption and other applications. Yeast 14: 115 - 132.

Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248 - 254.

Brieger K, Schiavone S, Miller F J, Krause K H (2012) Reactive oxygen species: from health to disease. Swiss Med Wkly 142: w13659.

Brust D (2011) Dissertation: Die Bedeutung von Zelltod-Prozessen während der Alterung des filamentösen Ascomyzeten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Brydges S D, Carruthers V B (2003) Mutation of an unusual mitochondrial targeting sequence of SODB2 produces multiple targeting fates in *Toxoplasma gondii*. J Cell Sci 116: 4675 - 4685.

Budzińska M, Gałgańska H, Karachitos A, Wojtkowska M, Kmita H (2009) The TOM complex is involved in the release of superoxide anion from mitochondria. J Bioenerg Biomembr 41: 361 - 367.

Castello P R, Drechsel D A, Patel M (2007) Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. J Biol Chem 282: 14186 - 14193.

Chae H J, Park J M, Lee G Y, Park H R, Chae S W, Jeong G S, Kim H M, Kim S B, Yoo S K, Kim H R (2004) Yuk-Hap-Tang induces apoptosis by intervening Mn-SOD in human cervical carcinoma HeLa cells. Am J Chin Med 32: 883 - 895.

Chakraborty S, Aschner M (2012) Altered manganese homeostasis: implications for BLI-3-dependent dopaminergic neurodegeneration and SKN-1 protection in *C. elegans*. J Trace Elem Med Biol 26: 183 - 187.

Chang E C, Crawford B F, Hong Z, Bilinski T, Kosman D J (1991) Genetic and biochemical characterization of Cu,Zn superoxide dismutase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 266: 4417 - 4424.

Chang E C, Kosman D J (1989) Intracellular Mn(II) associated superoxide scavenging activity protects Cu,Zn superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* against dioxygen stress. J Biol Chem 264: 12172 - 12178.

Chen C, Dickman M B (2005) Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 3459 - 3464.

Chen P, Parmalee N, Aschner M (2014) Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. Front Genet 5: 265.

Choudhary M, Coulthart M B, Singh R S (1992) A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. VI. Patterns and processes of genic divergence between *D. melanogaster* and its sibling species, *Drosophila simulans*. Genetics 130: 843 - 853.

Chtourou Y, Trabelsi K, Fetoui H, Mkannez G, Kallel H, Zeghal N (2011) Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells *in vitro*: protective role of silymarin. Neurochem Res 36: 1546 - 1557.

Chun Y S, Kim J H, Lee H T, Chung K S (1994) Effect of superoxide dismutase on the development of preimplantation mouse embryos. Theriogenology 41: 511 - 520.

Claros M G, Vincens P (2004) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Eur J Biochem 241: 779 - 786.

Cochemé H M, Murphy M P (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. J Biol Chem 283: 1786 - 1798.

Collinge A J, Markham P (1985) Woronin bodies rapidly plug septal pores of severed *Penicillium chrysogenum* hyphae. Exp Mycol 9: 80 - 85.

Cos P, Ying L, Calomme M, Hu J P, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck A J, Vanden Berghe D (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. J Nat Prod 61: 71 - 76.

Creagan R, Tischfield J, Ricciuti F, Ruddle F H (1973) Chromosome assignments of genes in man using mouse-human somatic cell hybrids: mitochondrial superoxide dismutase (indophenol oxidase-B, tetrameric) to chromosome 6. Humangenetik 20: 203 - 209.

Criswell S R, Perlmutter J S, Huang J L, Golchin N, Flores H P, Hobson A, Aschner M, Erikson K M, Checkoway H, Racette B A (2012) Basal ganglia intensity indices and diffusion weighted imaging in manganese-exposed welders. Occup Environ Med 69: 437 - 443.

Cross A R, Parkinson J F, Jones O T G (1984) The superoxide-generating oxidase of leucocytes. Biochem J 223: 337 - 344.

Culotta V C, Daly M J (2013) Manganese complexes: diverse metabolic routes to oxidative stress resistance in prokaryotes and yeast. Antioxid Redox Signal 19: 933 - 944.

Culotta V C, Yang M, Hall M D (2005) Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell 4: 1159 - 1165.

Culotta V C, Yang M, O'Halloran T V (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. Biochim Biophys Acta 1763: 747 - 758.

Cummings D J, Belcour L, Grandchamp C (1979) Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. Mol Gen Genet 171: 239 - 250.

Cummings D J, McNally K L, Domenico J M, Matsuura E T (1990) The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospora anserina*. Curr Genet 17: 375 - 402.

de Rosa G, Keen C L, Leach R M, Hurley L S (1980) Regulation of superoxide dismutase activity by dietary manganese. J Nutr 110: 795 - 804.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard J F, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J M, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res 36: 465 - 469.

Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung, Schweizerische Vereinigung für Ernährung (2013) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, 5. korrigierter Nachdruck, Neuer Umschau Buchverlag, Neustadt an der Weinstraße.

Duttaroy A, Meidinger R, Kirby K, Carmichael S, Hilliker A, Phillips J (1994) A manganese superoxide dismutase-encoding cDNA from *Drosophila melanogaster*. Gene 143: 223 - 225.

Duttaroy A, Parkes T, Emtage P, Kirby K, Boulianne G L, Wang X, Hilliker A J, Phillips J P (1997) The manganese superoxide dismutase gene of *Drosophila*: structure, extression and evidence for regulation by MAP kinase. DNA Cell Biol 16: 391 - 399.

Eijkelkamp B A, Morey J R, Ween M P, Ong C L, McEwan A G, Paton J C, McDevitt C A (2014) Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One 9: DOI 10.1371/journal.pone.0089427.

Elmadfa I, Leitzmann C (2004) Ernährung des Menschen. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.

Emri T, Molnár Z, Pusztahelyi T, Rosén S, Pócsi I (2004) Effect of vitamin E on autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. Appl Biochem Biotechnol 118: 337 - 348.

Esser K, Tudzynski P (1980) Senescence in fungi. In: Senescence in plants (Thimann KV) Vol. II. Boca Raton, CRC Press: 67 - 83.

Fabrizio P, Liou L L, Moy V N, Diaspro A, Valentine J S, Gralla E B, Longo V D (2003) *SOD2* functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. Genetics 163: 35 - 46.

Fabrizio P, Longo V D (2003) The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. Aging Cell 2: 73 - 81.

Failli P, Bani D, Bencini A, Cantore M, Di Cesare Mannelli L, Ghelardini C, Giorgi C, Innocenti M, Rugi F, Spepi A, Udisti R, Valtancoli B (2009) A novel manganese complex effective as superoxide anion scavenger and therapeutic agent against cell and tissue oxidative injury. J Med Chem 52: 7273 - 7283.

Faulkner K M, Liochev S I, Fridovich I (1994) Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase *in vitro* and substitute for it *in vivo*. J Biol Chem 269: 23471 - 23476.

Fenton H J H (1894) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J Chem Soc 65: 899 - 910.

Filippis C (2013) Masterarbeit: Untersuchungen zur Rolle von PaRCF1 und PaRCF2 bei der Organisation von Atmungskettensuperkomplexen bei *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Fischer F, Hamann A, Osiewacz H D (2012) Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. Trends Biochem Sci 37: 284 - 292.

Flückiger S, Mittl P R, Scapozza L, Fijten H, Folkers G, Grütter M G, Blaser K, Crameri R (2002) Comparison of the crystal structures of the human manganese superoxide dismutase and the homologous *Aspergillus fumigatus* allergen at 2-A resolution. J Immunol 168: 1267 - 1272.

Friedel F C, Lieb D, Ivanović-Burmazović I (2012) Comparative studies on manganese-based SOD mimetics, including the phosphate effect, by using global spectral analysis. J Inorg Biochem 109: 26 - 32.

Frohner I E, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K (2009) *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. Mol Microbiol 71: 240 - 252.

Führs H, Hartwig M, Molina L E, Heintz D, van Dorsselaer A, Braun H P, Horst W J (2008) Early manganese-toxicity response in *Vigna unguiculata* L. - a proteomic and transcriptomic study. Proteomics 8: 149 - 159.

Fujii M, Ishii N, Joguchi A, Yasuda K, Ayusawa D (1998) A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. DNA Res 5: 25 - 30.

Galiazzo F, Labbe-Bois R (1993) Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 315: 197 - 200.

Gao T, Wang F, Li S, Luo X, Zhang K (2011) Manganese regulates manganese-containing superoxide dismutase (MnSOD) expression in the primary broiler myocardial cells. Biol Trace Elem Res 144: 695 - 704.

Gavin C E, Gunter K K, Gunter T E (1990) Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria. Relevance to manganese toxicity. Biochem J 266: 329 - 334.

Gebicka L, Gebicki J L (2000) Reactions of heme peroxidases with peroxynitrite. IUBMB Life 49: 11 - 15.

Gene Ontology Consortium (2006) The Gene Ontology (GO) project in 2006. Nucleic Acids Res 34: D322 - D326.

Georgiou C D, Petropoulou K P (2001) Effect of the antioxidant ascorbic acid on sclerotial differentiation in *Rhizoctonia solani*. Plant Pathol 50: 594 - 600.

Gladyshev V N (2014) The free radical theory of aging is dead. Long live the damage theory! Antioxid Redox Signal 20: 727 - 731.

Gleason J E, Galaleldeen A, Peterson R L, Taylor A B, Holloway S P, Waninger-Saroni J, Cormack B P, Cabelli D E, Hart P J, Culotta V C (2014) *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. Proc Natl Acad Sci U S A 111: 5866 - 5871.

Gralla E B, Kosman D J (1992) Molecular genetics of superoxide dismutases in yeast and related fungi. Adv Genet 30: 251 - 319.

Gray B, Carmichael A J (1992) Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. Biochem J 281: 795 - 802.

Gredilla R, Grief J, Osiewacz H D (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. Exp Gerontol 41: 439 - 447.

Grief J (2007) Dissertation: Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Grimm C, Böhl L, Osiewacz H D (2015) Overexpression of *Pa_1_10620* encoding a mitochondrial *Podospora anserina* protein with homology to superoxide dismutases and ribosomal proteins leads to lifespan extension. Curr Genet 61: 73 - 86.

Grimm C, Osiewacz H D (2015) Manganese rescues adverse effects on lifespan and development in *Podospora anserina* challenged by excess hydrogen peroxide. Exp Gerontol 63: 8 - 17.

Haber F, Weiss J (1932) On the catalysis of hydroperoxide. Naturwissenschaften 20: 948 - 950.

Hamanaka R B, Chandel N S (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. Trends Biochem Sci 35: 505 - 513.

Han D, Antunes F, Canali R, Rettori D, Cadenas E (2003) Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. J Biol Chem 278: 5557 - 5563.

Harman D (1956) A theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11: 298 - 300.

Harman D (1972) The biologic clock: the mitochondria? J Am Geriatr Soc 20: 145 - 147.

Heeren G, Rinnerthaler M, Laun P, von Seyerl P, Kössler S, Klinger H, Hager M, Bogengruber E, Jarolim S, Simon-Nobbe B, Schüller C, Carmona-Gutierrez D, Breitenbach-Koller L, Mück C, Jansen-Dürr P, Criollo A, Kroemer G, Madeo F, Breitenbach M (2009) The mitochondrial ribosomal protein of the large subunit, Afo1p, determines cellular longevity through mitochondrial back-signaling via TOR1. Aging 1: 622 - 636.

Ho Y S, Crapo J D (1998) Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. FEBS 229: 256 - 260.

Holbrook M A, Menninger J R (2002) Erythromycin slows aging of *Saccharomyces cerevisiae*. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 57: B29 - B36.

Honda Y, Tanaka M, Honda S (2008) Modulation of longevity and diapause by redox regulation mechanisms under the insulin-like signaling control in *Caenorhabditis elegans*. Exp Gerontol 43: 520 - 529.

Horsburgh M J, Wharton S J, Karavolos M, Foster S J (2002) Manganese: elemental defence for a life with oxygen? Trends Microbiol 10: 496 - 501.

Horton P, Nakai K (1997) Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol 5: 147 - 152.

Houtkooper R H, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams R W, Auwerx J (2013) Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. Nature 497: 451 - 457.

Hunter T, Bannister W H, Hunter G J (1997) Cloning, expression, and characterization of two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. J Biol Chem 272: 28652 - 28659.

Hurley L S, Theriault L L, Dreosti I E (1970) Liver mitochondria from manganese-deficient and pallid mice: function and ultrastructure. Science 18: 1316 - 1318.

Hwang C S, Rhie G, Kim S T, Kim Y R, Huh W K, Baek Y U, Kang S O (1999) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 1427: 245 - 255.

Imlay J A (2008) Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annu Rev Biochem 77: 755 - 776.

Imlay J A, Fridovich I (1991) Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. J Biol Chem 266: 6957 - 6965.

Inaoka T, Matsumura Y, Tsuchido T (1999) SodA and manganese are essential for resistance to oxidative stress in growing and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol 181: 1939 - 1943.

Jakubovics N S, Jenkinson H F (2001) Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria. Microbiology 147: 1709 - 1718.

Jazwinski S M (1996) Longevity, genes, and aging. Science 273: 54 - 59.

Jensen L T, Ajua-Alemanji M, Culotta V C (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by PHO84 also functions in manganese homeostasis. J Biol Chem 278: 42036 - 42040.

Jensen L T, Culotta V C (2005) Activation of Cu/Zn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. J Biol Chem 280: 41373 - 41379.

Jung I, Kim T Y, Kim-Ha J (2011) Identification of *Drosophila* SOD3 and its protective role against phototoxic damage to cells. FEBS 585: 1973 - 1978.

Keele B B, McCord J M, Fridovich I (1970) Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B: a new manganese containing enzyme. J Biol Chem 245: 6176 - 6181.

Kehl-Fie T W, Chitayat S, Hood M I, Damo S, Restrepo N, Garcia C, Munro K A, Chazin W J, Skaar E P (2011) Nutrient metal sequestration by calprotectin inhibits bacterial superoxide defense enhancing neutrophil killing of *Staphylococcus aureus*. Cell Host Microbe 10: 158 - 164.

Kirkwood T B, Austad S N (2000) Why do we age? Nature 408: 233 - 238.

Kono Y, Takahashi M A, Asada K (1976) Oxidation of manganous pyrophosphate by superoxide radicals and illuminated spinach chloroplasts. Arch Biochem Biophys 174: 454 - 462.

Koppenol W H, Levine F, Hatmaker T L, Epp J, Rush J D (1986) Catalysis of superoxide dismutase by manganese aminopolycarboxylate complexes. Arch Biochem Biophys 251: 594 - 599.

Kowald A, Hamann A, Zintel S, Ullrich S, Klipp E, Osiewacz H D (2012) A systems biological analysis links ROS metabolism to mitochondrial protein quality control. Mech Ageing Dev 133: 331 - 337.

Krause F, Scheckhuber C Q, Werner A, Rexroth S, Reifschneider N H, Dencher N A, Osiewacz H D (2004) Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. J Biol Chem 279: 26453 - 26461.

Krause K H (2007) Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. Exp Gerontol 42: 256 - 262.

Kubik S (2005) Radikal-Ionen. In: Römpp, Version 4.0.12. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Kunstmann (2009) Dissertation: Analyse differentiell-gebildeter mitochondrialer Proteine während des Alterns in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina* und Charakterisierung der O-Methyltransferase PaMTH1. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Kwan W P, Voelker B M (2003) Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. Environ Sci Technol 37: 1150 - 1158.

Labrousse A M, Zappaterra M D, Rube D A, van der Bliek A M (1999) *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. Mol Cell 4: 815 - 826.

Lam E W, Zwacka R, Seftor E A, Nieva D R, Davidson B L, Engelhardt J F, Hendrix M J, Oberley L W (1999) Effects of antioxidant enzyme overexpression on the invasive phenotype of hamster cheek pouch carcinoma cells. Free Radic Biol Med 27: 572 - 579.

Lamarre C, LeMay J D, Deslauriers N, Bourbonnais Y (2001) *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. J Biol Chem 276: 43784 - 43791.

Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latge J P (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol 75: 910 - 923.

Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R (2008) Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. Mol Syst Biol 4: 222.

Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg S L (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. Genome Biol 10: R25.

Lapointe J, Hekimi S (2010) When a theory of aging ages badly. Cell Mol Life Sci 67: 1 - 8.

Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Valentin F, Wallace I M, Wilm A, Lopez R, Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947 - 2948.

Larsen P L (1993) Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci U S A 90: 8905 - 8909.

Lee Y M, Ayala F J, Misra H P (1981) Purification and properties of superoxide dismutase from *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem 25: 8506 - 8509.

Lenaz G (2001) The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. IUBMB Life 52: 159 - 164.

Levanon D, Lieman-Hurwitz J, Dafni N, Wigderson M, Sherman L, Bernstein Y, Laver-Rudich Z, Danciger E, Stein O, Groner Y (1985) Architecture and anatomy of the chromosomal locus in human chromosome 21 encoding the Cu/Zn superoxide dismutase. EMBO J 4: 77 - 84.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The sequence alignment/map format and SAMtools. Bioinformatics 25: 2078 - 2079.

Li Y, Huang T T, Carlson E J, Melov S, Ursell P C, Olson J L, Noble L J, Yoshimura M P, Berger C, Chan P H, Wallace D C, Epstein C J (1995) Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. Nat Genet 11: 376 - 381.

Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. Cell 119: 873 - 887.

Lin Y T, Hoang H, Hsieh S I, Rangel N, Foster A L (2006) Manganous ion supplementation accelerates wild type development, enhances stress resistance, and rescues the life span of a short-lived *Caenorhabditis elegans* mutant. Free Radic Biol Med 40: 1185 - 1193.

Lin Y R, Kim K, Yang Y, Ivessa A, Sadoshima J, Park Y (2011) Regulation of longevity by regulator of G-protein signaling protein, Loco. Aging Cell 10: 438 - 447.

Liu J, Liu M, Ye X, Liu K, Huang J, Wang L, Ji G, Liu N, Tang X, Baltz J M, Keefe D L, Liu L (2012) Delay in oocyte aging in mice by the antioxidant N-Acetyl-L-Cysteine (NAC). Hum Reprod 27: 1411 - 1420.

Liu X F, Culotta V C (1999) Post-translational control of Nramp metaltransport in yeast: role of metal ions and the BSD2 gene. J Biol Chem 274: 4863 - 4868.

Liu X F, Supek F, Nelson N, Culotta V C (1997) Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae BSD2* gene. J Biol Chem 272: 11763 - 11769.

Lorin S, Dufour E, Boulay J, Begel O, Marsy S, 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: 1259 - 1267.

Lucchini R G, Martin C J, Doney B C (2009) From manganism to manganese-induced parkinsonism: a conceptual model based on the evolution of exposure. Neuromolecular Med 11: 311 - 321.

Luce K, Osiewacz H D (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. Nat Cell Biol 11: 852 - 858.

Mandelli F, Yamashita F, Pereira J L, Mercadante A Z (2012) Evaluation of biomass production, carotenoid level and antioxidant capacity produced by *Thermus filiformis* using fractional factorial design. Braz J Microbiol 43: 126 - 134.

Mao G D, Poznansky M J (1992) Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. FEBS Lett 305: 233 - 236.

Maranzana E, Barbero G, Falasca A I, Lenaz G, Genova M L (2013) Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. Antioxid Redox Signal 19: 1469 - 1480.

Marbach K, Fernández-Larrea J, Stahl U (1994) Reversion of a long-living, undifferentiated mutant of *Podospora anserina* by copper. Curr Genet 26: 184 - 186.

Marklund S L (1982) Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. Proc Natl Acad Sci U S A 79: 7634 - 7638.

Marklund S L (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. Biochem J 222: 649 - 655.

Martchenko M, Alarco A M, Harcus D, Whiteway M (2004) Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced *SOD5* gene. Mol Biol Cell 15: 456 - 467.

Martino E, Franco B, Piccoli G, Stocchi V, Perotto S (2002) Influence of zinc ions on protein secretion in a heavy metal tolerant strain of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. Mol Cell Biochem 231: 179 - 185.

McBride H M, Neuspiel M, Wasiak S (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr Biol 16: R551 - R560.

McNaughton R L, Reddi A R, Clement M H, Sharma A, Barnese K (2010) Probing *in vivo* Mn^{2+} speciation and oxidative stress resistance in yeast cells with electron-nuclear double resonance spectroscopy. Proc Natl Acad Sci U S A 107: 15335 - 15339.

Medvedev Z A (1990) An attempt at a rational classification of theories of ageing. Biol Rev Camb Philos Soc 65: 375 - 398.

Melov S, Coskun P, Patel M, Tuinstra R, Cottrell B, Jun A S, Zastawny T H, Dizdaroglu M, Goodman S I, Huang T T, Miziorko H, Epstein C J, Wallace D C (1999) Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 846 - 851.

Merz S, Hammermeister M, Altmann K, Durr M, Westermann B (2007) Molecular machinery of mitochondrial dynamics in yeast. Biol Chem 388: 917 - 926.

Missy P, Lanhers M C, Grignon Y, Joyeux M, Burnel D (2000) *In vitro* and *in vivo* studies on chelation of manganese. Hum Exp Toxicol 19: 448 - 456.

Muller F L, Yuhong L, van Remmen H (2004) Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem 279: 49064 - 49073.

Munkres K D (1990) Histochemical detection of superoxide radicals and hydrogen peroxide by *Age-1* mutants of *Neurospora*. Fungal Genet Newsl 37: 24 - 25.

Naranuntarat A, Jensen L T, Pazicni S, Penner-Hahn J E, Culotta V C (2009) The interaction of mitochondrial iron with manganese superoxide dismutase. J Biol Chem 284: 22633 - 22640.

Nickla H, Anderson J, Palzkill T (1983) Enzymes involved in oxygen detoxification during development of *Drosophila melanogaster*. Experientia 39: 610 - 612.

Orgel L E (1963) The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. Proc Natl Acad Sci U S A 49: 517 - 521.

Ose D E, Fridovich I (1976) Superoxide dismutase. Reversible removal of manganese and its substitution by cobalt, nickel or zinc. J Biol Chem 251: 1217 - 1218.

Oubrahim H, Stadtman E R, Chock P B (2001) Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 9505 - 9510.

Palermo V, Falcone C, Mazzoni C (2007) Apoptosis and aging in mitochondrial morphology mutants of *S. cerevisiae*. Folia Microbiol 52: 479 - 483.

Paul A, Belton A, Nag S, Martin I, Grozewiel M S, Duttoray A (2007) Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging. Mech Ageing Dev 128: 706 - 716.

Pérez V I, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y, Richardson A (2009) Is the oxidative stress theory of aging dead? Biochim Biophys Acta 1790: 1005 - 1014.

Pfaffl M W (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: e45.

Pfanner N, Hartl F U, Neupert W (1988) Import of proteins into mitochondria: a multi-step process. Eur J Biochem 175: 205 - 212.

Philipp O, Hamann A, Servos J, Werner A, Koch I, Osiewacz H D (2013) A genome-wide longitudinal transcriptome analysis of the aging model *Podospora anserina*. PLoS One 8: e83109.

Plohnke N, Hamann A, Poetsch A, Osiewacz H D, Rögner M, Rexroth S (2014) Proteomic analysis of mitochondria from senescent *Podospora anserina* casts new light on ROS dependent aging mechanisms. Exp Gerontol 56: 13 - 25.

Portnoy M E, Liu X F, Culotta V C (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the Nramp family of metal transporters. Mol Cell Biol 20: 7893 - 7902.

Priya B, **Premanandh J**, **Dhanalakshmi R T**, **Seethalakshmi T**, **Uma L**, **Prabaharan D, Subramanian G (2007)** Comparative analysis of cyanobacterial superoxide dismutases to discriminate canonical forms. BMC Genomics 8: 435.

Pryor W A (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Annu Rev Physiol 48: 657 - 667.

Punt P J, Oliver R P, Dingemanse M A, Pouwels P H, van den Hondel C A (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. Gene 56: 117 - 124.

Racette B A, Criswell S R, Lundin J I, Hobson A, Seixas N, Kotzbauer P T, Evanoff B A, Perlmutter J S, Zhang J, Sheppard L, Checkoway H (2012) Increased risk of parkinsonism associated with welding exposure. Neurotoxicology 33: 1356 - 1361.

Rao G, Xia E, Nadakavukaren M J, Richardson A (1990) Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. J Nutr 120: 602 - 609.

Ravindranath S D, Fridovich I (1975) Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. J Biol Chem 250: 6107 - 6112.

Reddi A R, Culotta V C (2011) Regulation of manganese antioxidants by nutrient sensing pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 189: 1261 - 1270.

Reddi A R, Jensen L T, Culotta V C (2009) Manganese homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. Chem Rev 109: 4722 - 4732.

Rhie G E, Hwang C S, Brady M J, Kim S T, Kim Y R, Huh W K, Baek Y U, Lee B H, Lee J S, Kang S O (1999) Manganese-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 1426: 409 - 419.

Rizet G (1953) Longevity of strains of *Podospora anserina*. C R Hebd Seances Acad Sci 237: 1106 - 1109.

Saveanu C, Fromont-Racine M, Hartington A, Ricard F, Namane A, Jacquier A (2001) Identification of 12 new yeast mitochondrial ribosomal proteins including 6 that have no prokaryotic homologues. J Biol Chem 276: 15861 - 15867.

Scarpa M, Rigo A, Viglino P, Stevanato R, Bracco F, Battistin L (1987) Age dependence of the level of the enzymes involved in the protection against active oxygen species in the rat brain. Proc Soc Exp Biol Med 185: 129 - 133.

Schägger H, Cramer W A, von Jagow G (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. Anal Biochem 217: 220 - 230.

Schägger H, de Coo R, Bauer M F, Hofmann S, Godinot C, Brandt U (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. J Biol Chem 279: 36349 - 36353.

Schägger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. EMBO J 19: 1777 - 1783.

Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. Anal Biochem 199: 223 - 231.

Scheckhuber C Q, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T, Osiewacz H D (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. Nat Cell Biol 9: 99 - 105.

Schmidt O, Pfanner N, Meisinger C (2010) Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. Nat Rev Mol Cell Biol 11: 655 - 667.

Schwitalla D (2007) Diplomarbeit: Rolle der Superoxid-Dismutasen PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3 bei Alterungsprozessen im Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Seib K L, Tseng H J, McEwan A G, Apicella M A, Jennings M P (2004) Defenses against oxidative stress in *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*: distinctive systems for different lifestyles. J Infect Dis 190: 136 - 147.

Servos J, Hamann A, Grimm C, Osiewacz H D (2012) A differential genome-wide transcriptome analysis: impact of cellular copper on complex biological processes like aging and development. PLoS One 7: e49292.

Sheng Y, Durazo A, Schumacher M, Gralla E B, Cascio D, Cabelli D E, Valentine J S (2013) Tetramerization reinforces the dimer interface of MnSOD. PLoS One 8: e62446.

Sheng Y, Stich T A, Barnese K, Gralla E B, Cascio D, Britt R D, Cabelli D E, Valentine J S (2011) Comparison of two yeast MnSODs: mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* versus cytosolic *Candida albicans*. J Am Chem Soc 133: 20878 - 20889.

Shibamura A, Ikeda T, Nishikawa Y (2009) A method for oral administration of hydrophilic substances to *Caenorhabditis elegans*: effects of oral supplementation with antioxidants on the nematode lifespan. Mech Ageing Dev 130: 652 - 655.

Sienkiewicz N, Daher W, Dive D, Wrenger C, Viscogliosi E, Wintjens R, Jouin H, Capron M, Müller S, Khalife J (2004) Identification of a mitochondrial superoxide dismutase with an unusual targeting sequence in *Plasmodium falciparum*. Mol Biochem Parasitol 137: 121 - 132.

Silar P, Picard M (1994) Increased longevity of EF-1 alpha high-fidelity mutants in *Podospora anserina*. J Mol Biol 235: 231 - 236.

Sinclair D A, Mills K A, Guarente L (1998) Aging in *Saccharomyces cerevisiae*. Annu Rev Microbiol 52: 533 - 560.

Sitzmann H (2006) Chelate. In: Römpp, Version 4.0.12. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Sohal R S, Farmer K J, Allen R G (1987) Correlates of longevity in two strains of the housefly, *Musca domestica*. Mech Ageing Dev 40: 171 - 179.

Southern E M (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 98: 503 - 517.

Spasojević I, Batinić-Haberle I, Stevens R D, Hambright P, Thorpe A N, Grodkowski J, Neta P, Fridovich I (2001) Manganese(III) biliverdin IX dimethyl ester: a powerful catalytic scavenger of superoxide employing the Mn(III)/Mn(IV) redox couple. Inorg Chem 40: 726 - 739.

Stahl U, Lemke P A, Tudzynski P, Kück U, Esser K (1978) Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. Mol Gen Genet 162: 341 - 343.

Steffen K K, Kennedy B K, Kaeberlein M (2009) Measuring replicative life span in the budding yeast. J Vis Exp: DOI 10.3791/1209.

Stevens C, Goldblatt M J, Freedman J C (1975) Lack of erythrocyte superoxide dismutase change during human senescence. Mech Ageing Dev 4: 415 - 421.

Strobel I (2014) Dissertation: Metacaspasen in *Podospora anserina*: Biochemische Eigenschaften und Identifizierung von Substraten. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Stumpferl S W, Stephan O, Osiewacz H D (2004) Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. Eukaryot Cell 3: 200 - 211.

Sturtz L A, Diekert K, Jensen L T, Lill R, Culotta V C (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: 38084 - 38089.

Sun J, Folk D, Bradley T J, Tower J (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. Genetics 161: 661 - 672.

Supek F, Supekova L, Nelson H, Nelson N (1996) A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 5105 - 5110.

Tamari Y, Nawata H, Inoue E, Yoshimura A, Yoshii H, Kashino G, Seki M, Enomoto T, Watanabe M, Tano K (2013) Protective roles of ascorbic acid in oxidative stress induced by depletion of superoxide dismutase in vertebrate cells. Free Radic Res 47: 1 - 7.

Tanaka M, Kogawa K, Nishihori Y, Kuribayashi K, Nakamura K, Muramatsu H, Koike K, Sakamaki S, Niitsu Y (1997) Suppression of intracellular Cu-Zn SOD results in enhanced motility and metastasis of Meth A sarcoma cells. Int J Cancer 73: 187 - 192.

Tando S K, Singh J (1975) Removal of manganese by chelating agents from brain and lover of manganese treated rats: an *in vitro* and *in vivo* study. Toxicology 5: 237 - 241.

Thoms A M (2011) Bachelorarbeit: Untersuchungen zur Rolle der Superoxid-Dismutase 1 in Entwicklung und Alterung des Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Trinh C H, Hunter T, Stewart E E, Phillips S E, Hunter G J (2008) Purification, crystallization and X-ray structures of the two manganese superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun 64: 1110 - 1114.

Troxell B, Xu H, Yang X F (2012) *Borrelia burgdorferi*, a pathogen that lacks iron, encodes manganese-dependent superoxide dismutase essential for resistance to streptonigrin. J Biol Chem 287: 19284 - 19293.

Tsang C K, Liu Y, Thomas J, Zhang Y, Zheng X F (2014) Superoxide dismutase 1 acts as a nuclear transcription factor to regulate oxidative stress resistance. Nat Commun 5: 3446.

Tudzynski P, Esser K (1977) Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete *Podosprora anserina*. Mol Gen Genet 153: 111 - 113.

Turrens J F, Boveris A (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem J 191: 421 - 427.

Unlu E S, Koc A (2007) Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. Ann N Y Acad Sci 1100: 505 - 509.

van Loon A P, Eilers M, Baker A, Verner K (1988) Transport of proteins into yeast mitochondria. J Cell Biochem 36: 59 - 71.

van Raamsdonk J M, Hekimi S (2009) Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase *sod-2* extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. PLOS Genet 5: e1000361.

van Raamsdonk J M, Hekimi S (2012) Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 5785 - 5790.

Vance C K, Miller A F (1998) A simple proposal that can explain the inactivity of metal-substituted superoxide dismutases. J Am Chem Soc 120: 461 - 467.

Vanlerberghe G C, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: from gene to function. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 703 - 734.

Vignais P V (2002) The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. Cell Mol Life Sci 59: 1428 - 1459.

Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi A M, Villeneuve L, Fortier A, Perrault L P, Carrier M, Thorin E (2008) Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. Mech Ageing Dev 129: 261 - 270.

Wang H W, Cai D B, Zhao C L, Xiao G H, Wang Z H, Xu H M, Yang L K, Ma L, Ma J L (2010) Effects of dietary manganese supplementation on antioxidant enzyme activity in the shrimp (*Neocaridina heteropoda*). Isr J Aquacult 62: 78 - 84.

Wedler F C, Denman R B (1984) Glutamine synthetase: the major Mn(II) enzyme in mammalian brain. Curr Top Cell Regul 24: 153 - 169.

Weiss R H, Flickinger A G, Rivers W J, Hardy M M, Aston K W, Ryan U S, Riley D P (1993) Evaluation of activity of putative superoxide dismutase mimics. Direct analysis by stopped-flow kinetics. J Biol Chem 268: 23049 - 23054.

Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, Schulz E, Treiber N, Kawamoto T, Scharffetter-Kochanek K, Münzel T, Bürkle A, Bachschmid M M, Daiber A (2008) Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. Cardiovasc Res 80: 280 - 289.

West A P, Shadel G S, Ghosh S (2011) Mitochondria in innate immune responses. Nat Rev Immunol 11: 389 - 402.

White C W, Nguyen D H, Suzuki K, Taniguchi N, Rusakow L S, Avraham K B, Groner Y (1993) Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. Free Radic Biol Med 15: 629 - 636.

Wiemer M, Grimm C, Osiewacz H D. Molecular control of fungal senescence and longevity. In: The Mycota Vol. I, 3. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokyo, angenommen.

Wiemer M, Osiewacz H D (2014) The proteasome activity reporter GFP-Cl1 is degraded by autophagy in the aging model *Podospora anserina*. F1000Res 3: 230.

Wittig I, Schägger H (2008) Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. Proteomics 8: 3974 - 3990.

Wood Z A, Schröder E, Robin Harris J, Poole L B (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci 28: 32 - 40.

Woronin M (1864) Entwicklungsgeschichte des *Ascobolus pulcherrimus* Cr. und einiger Pezizen. Abh Senkenb Naturforsch 5: 333 - 344.

Wu Z, Liang F, Hong B, Young J C, Sussman M R, Harper J F, Sze H (2002) An endoplasmic reticulum-bound Ca^{2+}/Mn^{2+} pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress. Plant Physiol 130: 128 - 137.

Yang M, Cobine P A, Molik S, Naranuntarat A, Lill R, Winge D R, Culotta V C (2006) The effects of mitochondrial iron homeostasis on cofactor specificity of superoxide dismutase 2. EMBO J 25: 1775 - 1783.

Yang W, Li J, Hekimi S (2007) A measurable increase in oxidative damage due to reduction in superoxide detoxification fails to shorten the life span of long-lived mitochondrial mutants of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 177: 2063 - 2074.

Yocum C F, Pecoraro V L (1999) Recent advances in the understanding of the biological chemistry of manganese. Curr Opin Chem Biol 3: 182 - 187.

Yost F J, Fridovich I (1973) An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. J Biol Chem 248: 4905 - 4908.

Youn H D, Kim E J, Roe J H, Hah Y C, Kang S O (1996) A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp.. Biochem J 318: 889 - 896.

Yu D, Danku J M C, Baxter I, Kim S, Vatamaniuk O K, Vitek O, Ouzzani M, Salt D E (2012) High-resolution genome-wide scan of genes, gene-networks and cellular systems impacting the yeast ionome. BMC Genomics 13: 623.

Yu T, Robotham J L, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 2653 - 2658.

Zhang Y, Smith B J, Oberley L W (2006) Enzymatic activity is necessary for the tumor-suppressive effects of MnSOD. Antioxid Redox Signal 8: 1283 - 1293.

Zidenberg-Cherr S, Keen C L, Lonnerdal B, Hurley L S (1983) Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. J Nutr 113: 2498 - 2504.

Zintel S (2012) Dissertation: Untersuchungen zur Bedeutung von Superoxid-Dismutasen für die Alterung von *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Zintel S, Bernhardt D, Rogowska-Wrzesinska A, Osiewacz H D (2011) PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. Aging 3: 768 - 781.

Zintel S, Schwitalla D, Luce K, Hamann A, Osiewacz H D (2010) Increasing mitochondrial superoxide dismutase abundance leads to impairments in protein quality control and ROS scavenging systems and to lifespan shortening. Exp Gerontol 45: 525 - 532.

Zuber P (2009) Management of oxidative stress in *Bacillus*. Annu Rev Microbiol 63: 575 - 597.

9. Anhang

9.1 Überprüfung der *S. cerevisiae*-Deletionsstämme

Vor Verwendung der *S. cerevisiae*-Stämme wurden diese auf Richtigkeit überprüft. Zu diesem Zweck fanden Kolonie-PCRs mit spezifischen Oligonukleotiden Anwendung. Die jeweils verwendeten Oligonukleotidpaare (Abbildung S42) sind entweder spezifisch für das jeweilige Gen, welches im Wildstamm BY4742 noch vorhanden ist (Sc*Sod1* bzw. *ScSod2*) oder können spezifisch nur dann ein Produkt der erwarteten Größe ergeben, wenn das entsprechende Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt wurde (PCR-1 bis PCR-4).

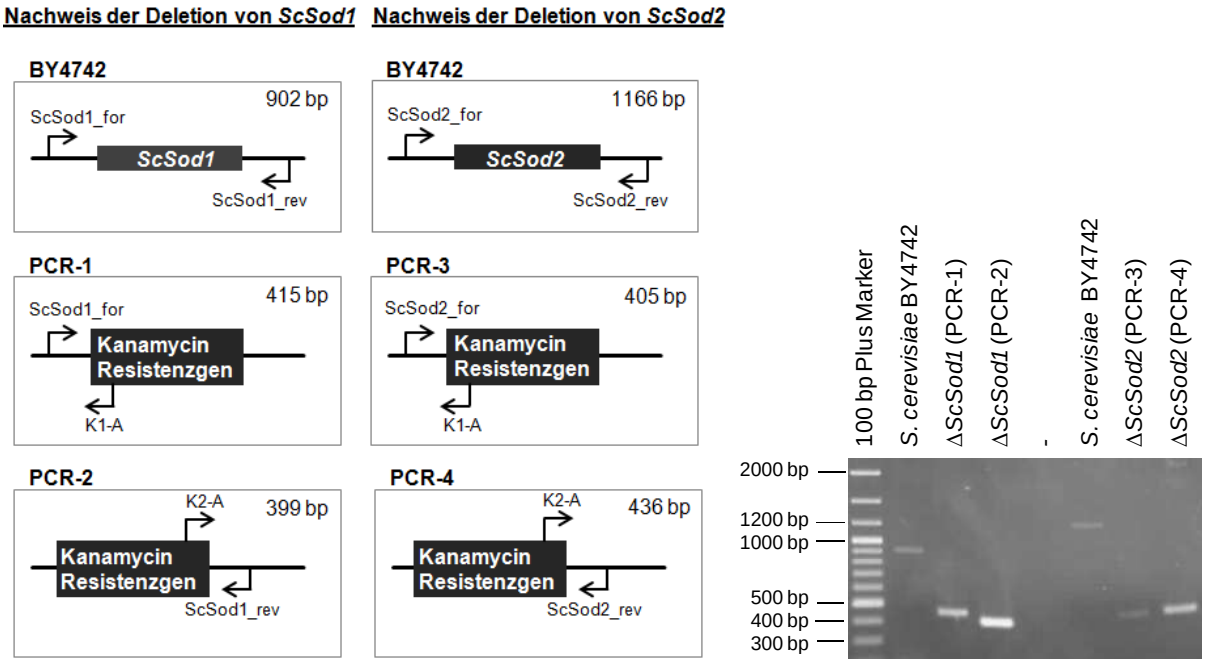


Abbildung S42: Verifizierung der *S. cerevisiae*-Stämme über PCR. Schematisch dargestellt sind die Nachweisreaktionen für die Deletion der Gene *ScSod1* (PCR-1 und PCR-2) sowie *ScSod2* (PCR-3 und PCR-4). Dabei können die beiden für das Gen spezifischen PCR-Produkte nur dann entstehen, wenn eine homologe Rekombination mit der Kanamycin-Resistenzkassette zu einer Deletion des jeweiligen Gens geführt hat. Es wurde je eine PCR der angegebenen *S. cerevisiae*-Stämme mit den im Schema gezeigten Oligonukleotidpaaren durchgeführt. Die Proben wurden im Anschluss an die PCR in einem 1 % igen Agarosegel bei 80 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente der 100 bp Plus Marker.

9.2 Southern Blot-Analysen

9.2.1 Verifizierung der Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx-Stämme

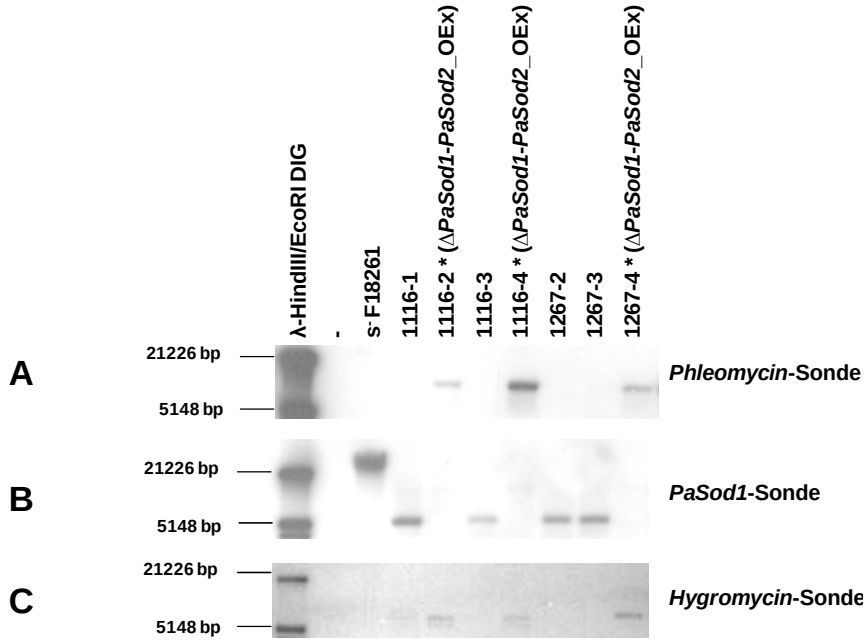


Abbildung S43: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der Δ*PaSod1-PaSod2*_OEx-Stämme. Jeweils 1 µg genomische DNA des Wildtyps und der Sporen von Asci, welche putative Doppelmutanten enthielten (zwei Hyg^R und $Phleo^R$ sowie zwei Hyg^S und $Phleo^S$ Sporen), wurden mit HindIII verdaut. Alle Proben wurden in einem 1 % igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V für 1,5 h aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard diente der DIG-markierter λ-HindIII/EcoRI-Marker. **A:** Nachweis der Deletion von *PaSod1* mittels *Phleomycin*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Phleomycin*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu keiner Bande. Lediglich durch Einbringen einer Deletionskassette war diese Resistenz in *P. anserina* vorhanden, sodass bei der Deletion von *PaSod1* ein 10,7 kbp großes Fragment nachgewiesen werden konnte. **B:** Zur Verifizierung der in A detektierten Fragmente wurde die mit HindIII verdaute DNA der entsprechenden Stämme mit einer DIG-markierten *PaSod1*-Sonde überprüft. Bei Stämmen, welche keine Deletion des *PaSod1*-Gens aufwiesen, war ein 5,3 kbp großes, endogenes Fragment nachweisbar. **C:** Überprüfung der Aufnahme des *PaSod2*-Überexpressionskonstrukts anhand einer DIG-markierten *Hygromycin*-Sonde. Bei Vorhandensein des *PaSod2*_OEx-Konstrukts führte dies zur Entstehung eines 5,9 kbp großen Fragments bei einem HindIII-Verdau. Die korrekten Transformanden wurden mit einem "*" markiert. Für weitere Analysen wurden Sekundärtransformanden aus dem Ascus 1116-2 gewonnen.

9.2.2 Verifizierung der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme

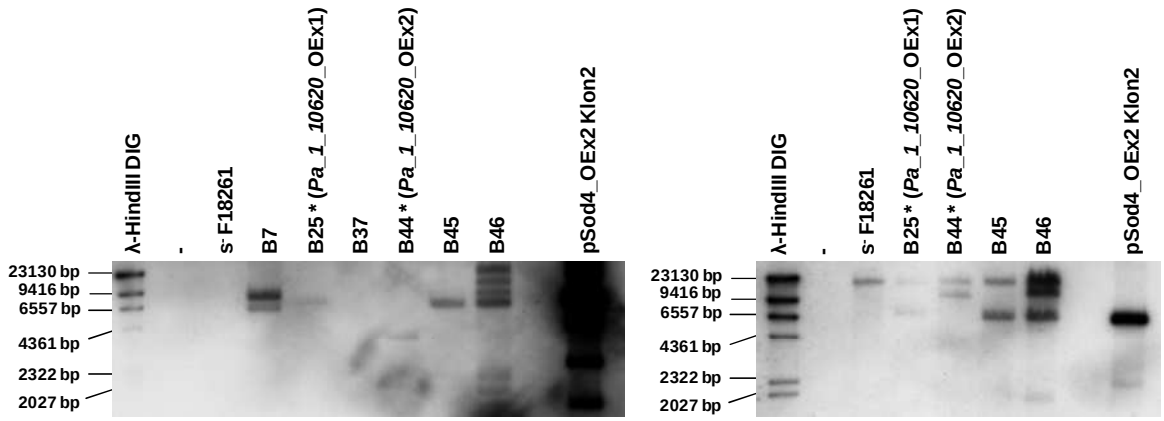


Abbildung S44: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. Jeweils 1 µg genomische DNA des Wildtyps und der putativen *Pa_1_10620*_OEx-Stämme sowie des Plasmids pSod4OEx2 Klon2 wurden mit NcoI verdaut. Alle Proben wurden in einem 1 % igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V für 1,5 h aufgetrennt und anschließend auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard diente der DIG-markierter λ-HindIII-Marker. **Links:** Nachweis des *Pa_1_10620*-Überexpressionskonstrukts mittels *Hygromycin*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Hygromycin*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-

DNA zu keiner Bande. Lediglich durch Einbringen des Überexpressionskonstrukts konnte diese Resistenz in *P. anserina* eingebracht werden, sodass bei DNA von *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen eine Bande ≥ 3 kbp für die erfolgreiche Integration des Überexpressionskonstrukts (Mt-Promotor, *Pa_1_10620*-Gen, Terminator sowie *Hygromycin*-Resistenzkassette) erwartet wurden. **Rechts:** Nachweis des *Pa_1_10620*-Überexpressionskonstrukts mittels *Pa_1_10620*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Pa_1_10620*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu einer Bande von 13,7 kbp (Endogen). Durch das erfolgreiche Einbringen des Überexpressionskonstrukts wurde zudem eine Bande erwartet, die ≥ 3 kbp war. Dies sprach für die erfolgreiche Integration des Überexpressionskonstrukts (Mt-Promotor, *Pa_1_10620*-Gen, Terminator sowie *Hygromycin*-Resistenzkassette). Die korrekten Transformanden wurden mit einem "*" markiert und wurden im Weiteren als *Pa_1_10620*_OEx1 (Transformante B25) und *Pa_1_10620*_OEx2 (Transformante B44) bezeichnet.

9.2.3 Verifizierung der Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämme

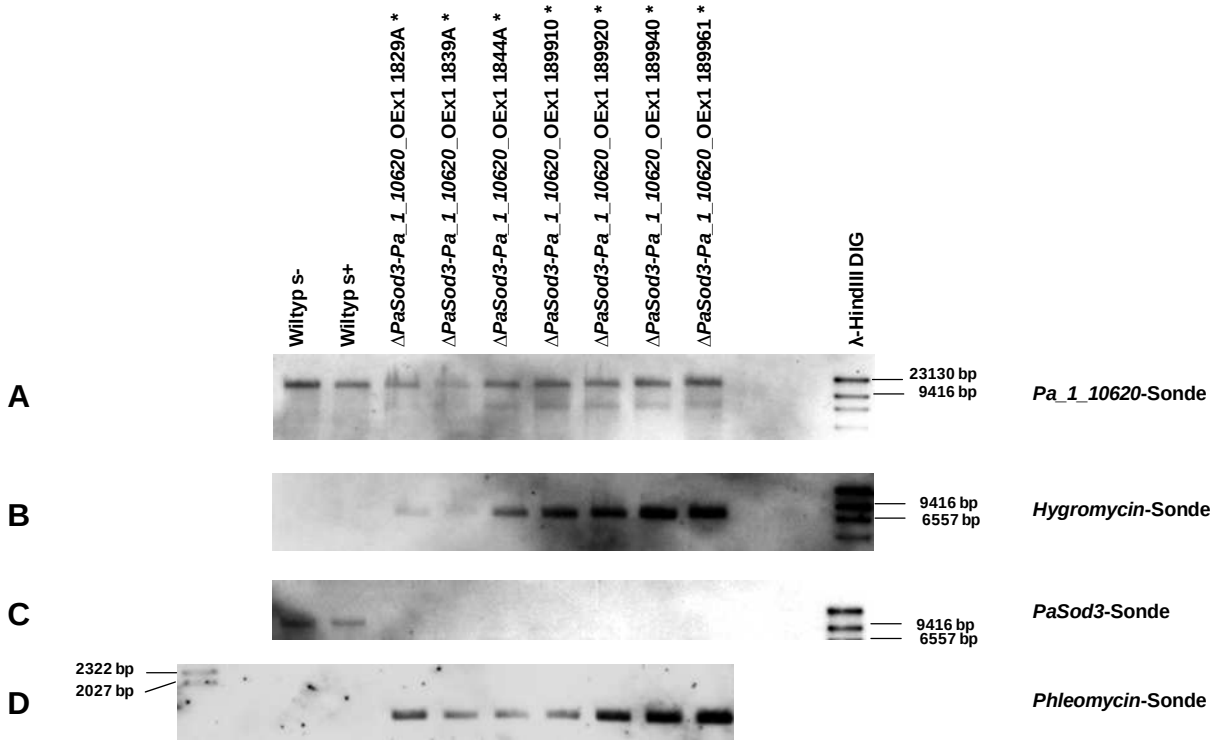


Abbildung S45: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx1-Stämme. Jeweils 1 µg genomische DNA des Wildtyps, von Sporen aus Asci, welche putative Doppelmutanten enthielten (zwei Hyg^R und $Phleo^R$ sowie zwei Hyg^S und $Phleo^S$ Sporen), sowie von Nachkommen aus diesen putativen Doppelmutanten wurden mit NcoI (A und B) bzw. mit HindIII (C und D) verdaut. Alle Proben mussten in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V für 1,5 h aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen werden. Als Größenstandard diente der DIG-markierter λ-HindIII-Marker. **A:** Nachweis des aufgenommenen *Pa_1_10620*-Überexpreskonstrukts mittels *Pa_1_10620*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Pa_1_10620*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu einer Bande von 13,7 kp (Endogen). Bei Aufnahme des Überexpressionskonstrukts wurde zudem eine Bande von ~ 7 kbp erwartet (dies entspricht der Größe des integrierten Überexpressionskonstrukts in dem *Pa_1_10620*_OEx1-Stamm, siehe Abbildung S44). **B:** Nachweis des *Pa_1_10620*_OEx-Konstrukts mittels *Hygromycin*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Hygromycin*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu keiner Bande. Lediglich Stämme, die das Überexpressionskonstrukt enthielten, kodierten in der DNA auch das Resistenzgen, sodass eine Bande von ~ 7 kbp detektierbar war (dies entspricht der Größe des integrierten Überexpressionsplasmides in dem *Pa_1_10620*_OEx1-Stamm, siehe Abbildung S44). **C:** Nachweis der Deletion von *PaSod3* mittels *PaSod3*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *PaSod3*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu einer Bande von 14,9 kbp (Endogen). Bei erfolgreicher Deletion war keine Bande mehr detektierbar. **D:** Nachweis der Deletion von *PaSod3* mittels *Phleomycin*-Sonde. Die Hybridisierung mit der DIG-markierten *Phleomycin*-Sonde führte bei verdauter Wildtyp-DNA zu keiner Bande. Lediglich *PaSod3*-Deletionsstämme enthielten das Resistenzgen, sodass Letztere eine Bande von ~ 1,3 kbp aufwiesen. Die korrekten Stämme wurden mit einem "*" markiert. Für weitere Analysen wurden die Stämme 189910, 189920, 189940 und 189961 verwendet.

9.3 Quantifizierung der PaSOD-Mengen in *PaSod*-Mutantenstämmen

Tabelle S30: Quantitative Auswertung der PaSOD1-, PaSOD2- und PaSOD3-Proteinmengen in *PaSod*-Mutantenstämmen (Δ*PaSod1*, *PaSod1*_OEx1/2/3, Δ*PaSod2*, *PaSod2*_OEx1/2/4, Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1/3). PaSOD1 und PaSOD2 wurden anhand von Western Blot-Analysen mit Gesamtproteinextrakten, PaSOD3 anhand von isolierten mitochondrialen Proteinextrakten bestimmt. Der Wildtyp wurde für jedes Protein auf 100 % gesetzt und die verbleibenden Stämme relativ dazu berechnet. Die Werte der verschiedenen Überexpressionsstämme einer SOD wurden gemittelt.

Extrakt	detektiertes Protein	Stamm	Proteinmenge [%]
Gesamtprotein	PaSOD1	Δ*PaSod1*	-
Gesamtprotein	PaSOD1	*PaSod1*_OEx	259,07
Gesamtprotein	PaSOD1	Δ*PaSod2*	67,20
Gesamtprotein	PaSOD1	*PaSod2*_OEx	108,50
Gesamtprotein	PaSOD1	Δ*PaSod3*	129,39
Gesamtprotein	PaSOD1	*PaSod3*_OEx	123,39
Gesamtprotein	PaSOD2	Δ*PaSod1*	123,40
Gesamtprotein	PaSOD2	*PaSod1*_OEx	65,68
Gesamtprotein	PaSOD2	Δ*PaSod2*	-
Gesamtprotein	PaSOD2	*PaSod2*_OEx	198,82
Gesamtprotein	PaSOD2	Δ*PaSod3*	51,89
Gesamtprotein	PaSOD2	*PaSod3*_OEx	129,46
Mitochondrien	PaSOD3	Δ*PaSod1*	75,88
Mitochondrien	PaSOD3	*PaSod1*_OEx	130,27
Mitochondrien	PaSOD3	Δ*PaSod2*	63,84
Mitochondrien	PaSOD3	*PaSod2*_OEx	78,94
Mitochondrien	PaSOD3	Δ*PaSod3*	-
Mitochondrien	PaSOD3	*PaSod3*_OEx	877,84

9.4 Western Blot-Analyse zum Nachweis von Pa_1_10620

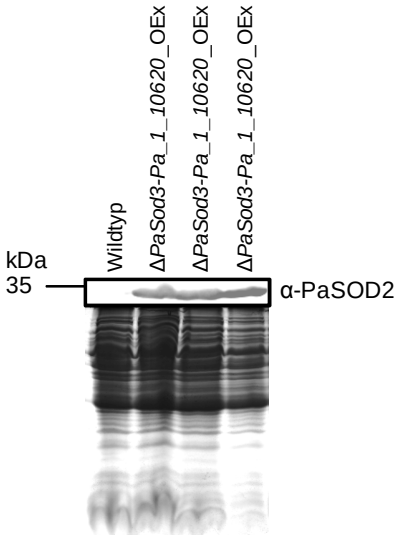
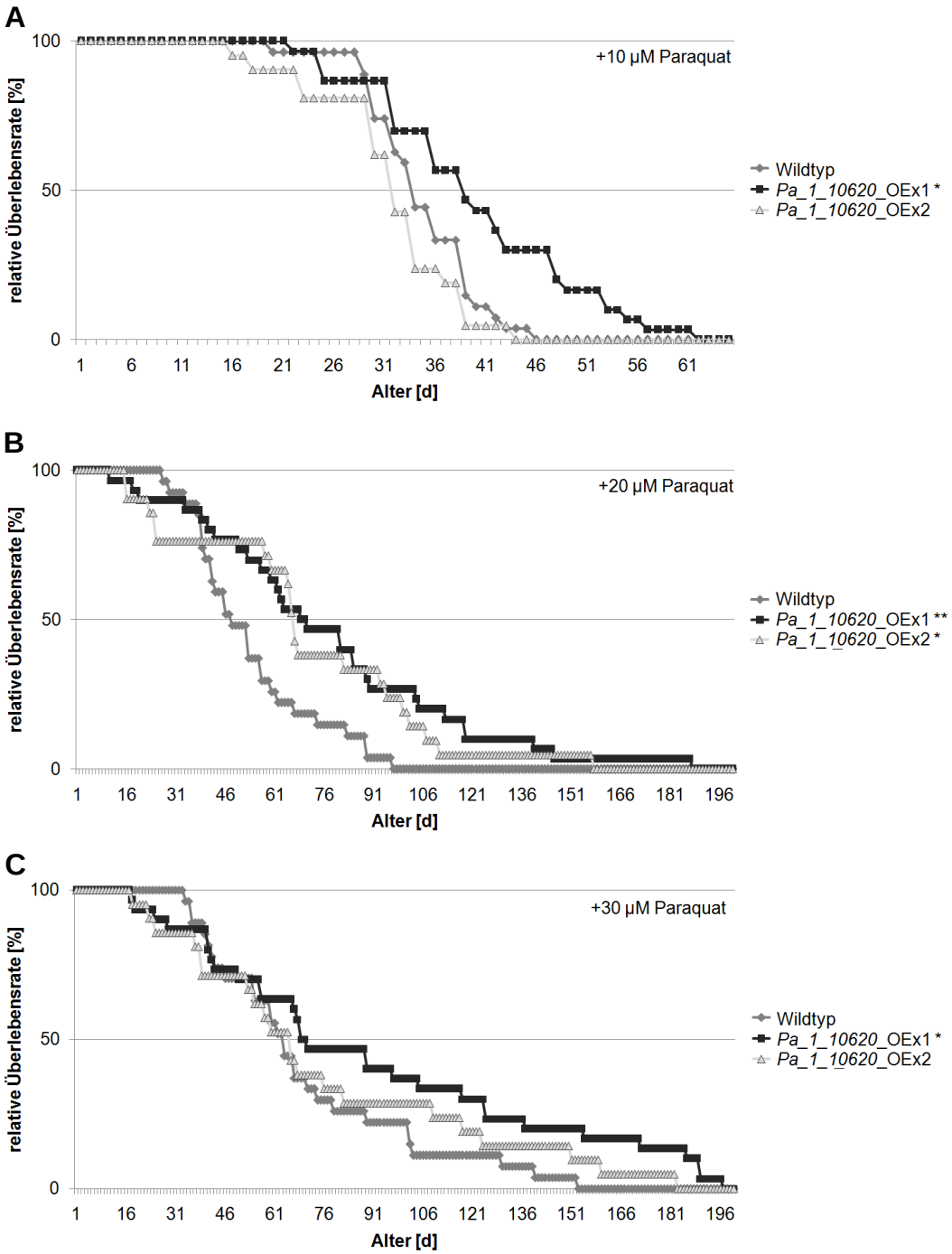


Abbildung S46: Western Blot-Analyse der Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämme. Es wurden jeweils 100 µg mitochondriale Proteinextrakte des Wildtyps und von drei Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämmen in einem 16 % igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Pa_1_10620 konnte in den Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämmen mit Hilfe des polyklonalen α-PaSOD2-Antikörpers (Pa_1_10620: 34,1 kDa, PaSOD2: 26,3 kDa) detektiert werden. Hingegen reichte die im Wildtyp vorhandene Pa_1_10620-Proteinmenge nicht aus, um ein detektierbares Signal zu erzeugen. Als Ladekontrolle diente das mit Coomassie gefärbte Gel.

9.5 Lebensspannenanalysen

In Kapitel 4.2.2 wurde bereits die Lebensspanne der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme auf M2-Medium gezeigt (Abbildung 20 B). Bei den hier aufgeführten Lebensspannenanalysen (Abbildung S47) handelt es sich um weiterführende Untersuchungen auf M2-Medium mit Paraquat bzw. Wasserstoffperoxid als oxidative Stressoren.



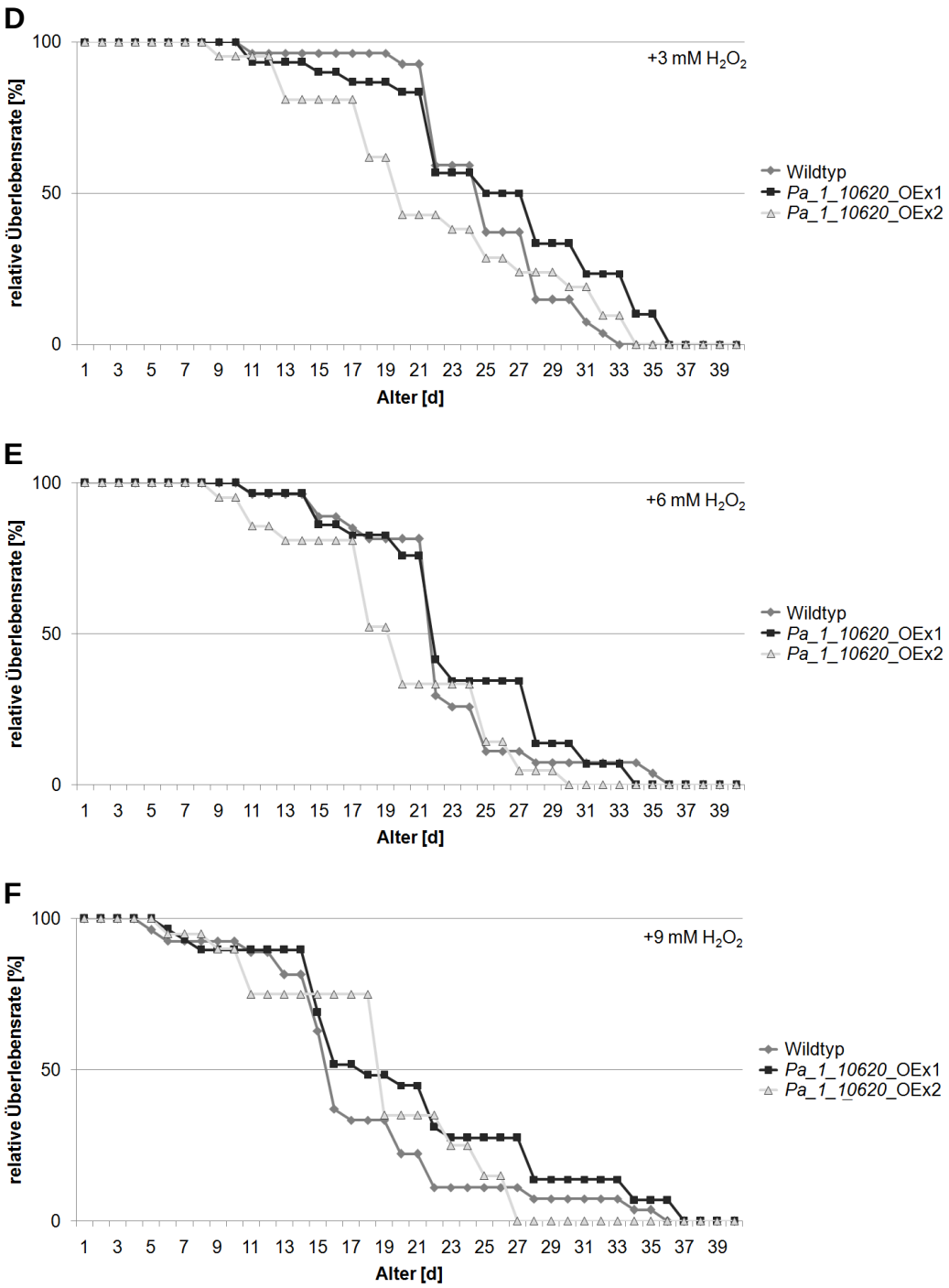


Abbildung S47: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps sowie der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme auf M2-Medium mit verschiedenen Zusätzen. Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps (n = 27), des *Pa_1_10620*_OEx1-Stammes (n = 30) und des *Pa_1_10620*_OEx2-Stammes (n = 21) auf **A:** M2-Medium mit 10 µM Paraquat, **B:** M2-Medium mit 20 µM Paraquat, **C:** M2-Medium mit 30 µM Paraquat, **D:** M2-Medium mit 3 mM Wasserstoffperoxid, **E:** M2-Medium mit 6 mM Wasserstoffperoxid und **F:** M2-Medium mit 9 mM Wasserstoffperoxid. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium wurden mit dem Student's T-Test ermittelt und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0{,}05$ und ** $p \leq 0{,}01$).

9.6 Western Blot-Analyse zur Bestimmung der PaSOD1-Menge

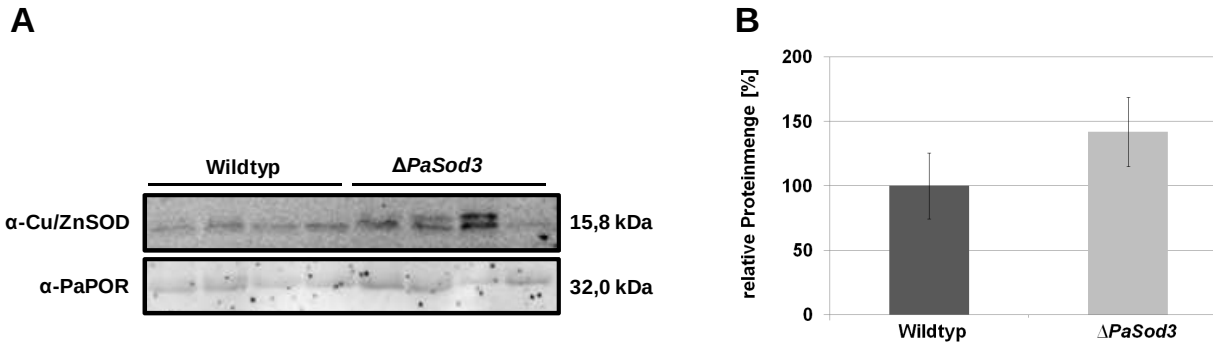


Abbildung S48: Western Blot-Analyse vom Wildtyp und der Δ*PaSod3*-Mutante sowie Quantifizierung der relativen PaSOD1-Proteinmenge in isolierten Mitochondrien. A: Exemplarische Abbildung einer Western Blot-Analyse vom Wildtyp und der Δ*PaSod3*-Mutante (je neun Tage alt). Es wurden jeweils 100 µg mitochondriale Proteinextrakte in 16 % igen SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend mussten die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Links neben dem Western Blot sind die verwendeten Primärantikörper angegeben und rechts davon die Größen der detektierten Proteine. Als Ladekontrolle diente Porin (PaPOR). **B:** Zudem sind die quantitativen Auswertungen der PaSOD1-Mengen relativ zur Ladekontrolle sowie die entsprechenden Standardfehler angegeben. Es konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden.

9.7 Transkriptomanalysen des Wildtyps und des Δ*PaSod3*-Stammes

Tabelle S31: Auflistung der um mindestens Faktor drei hochregulierten Transkripte bei dem Vergleich Δ*PaSod3* jung (juv) vs. Wildtyp jung sowie Δ*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent.

Transkript	Annotation	x-fach (Δ*PaSod3* juv vs. Wildtyp juv)	x-fach (Δ*PaSod3* sen vs. Wildtyp sen)
Pa_0_550	„Putative protein of unknown function"	6,7	4,6
Pa_1_14430	„Putative protein of unknown function"	3	4,8
Pa_1_18290	„Putative protein of unknown function"	3	4
Pa_1_22120	„Putative NAD(P)H-dependent oxidoreductase"	10,1	5,3
Pa_2_11630	„Putative formate dehydrogenase (FDH), involved in methanol metabolism"	4,2	3,1
Pa_2_50	„Putative protein similar to yrkC of *Bacillus subtilis*"	6,3	3,1
Pa_3_1020	„Putative protein of unknown function"	3	4,9
Pa_3_470	„Putative protein of unknown function"	3,4	3
Pa_4_2260	„Putative protein of unknown function"	3,9	3,7
Pa_4_4860	„PaNAT2 Arylamine N-acetyltransferase encoded by the PaNAT2 gene"	3,7	5,9
Pa_5_1390	„Putative mannose-6-phosphate isomerase"	4,1	3,8
Pa_5_5720	„Putative pyruvate decarboxylase"	4,1	4,8
Pa_5_780	„Putative protein of unknown function"	3,9	3,2
Pa_5_8020	„Putative protein of unknown function"	4,2	3,2
Pa_6_10330	„Putative polyketide synthase"	6,7	17
Pa_6_10360	„Putative cytochrome P450 E-class, group I"	3,5	3,9
Pa_6_3360	„Putative protein of unknown function"	15,5	6,3
Pa_7_1060	„CATP2 small subunit catalase encoded by the catP2 gene"	4,6	3,6
Pa_mito_cox3	„Cytochrome c oxidase subunit 3"	4,6	6,5
Pa_mito_nad4	„NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 4"	4,6	12,3
Pa_mito_nad6	„NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6"	4,2	9,1
Pa_mito_orf403	„Putative LAGLIDADG endonuclease/maturase"	9,2	9,2
Pa_mito_orf68	„Putative protein of unknown function"	31,8	164,9

Tabelle S32: Auflistung der um mindestens Faktor drei herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich ∆*PaSod3* jung (juv) vs. Wildtyp jung sowie ∆*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent.

Transkript	Annotation	x-fach (∆*PaSod3* juv vs. Wildtyp juv)	x-fach (∆*PaSod3* sen vs. Wildtyp sen)
Pa_1_13230	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_1_13940	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,2
Pa_1_23640	„Putative efflux permease"	0,2	0,3
Pa_1_5980	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_1_5990	„Putative Glycoside Hydrolase Family 5"	0,2	0,3
Pa_1_6000	„Putative cholinesterase precursor"	0,2	0,3
Pa_1_620	„Putative Glycosyltransferase Family 2"	0,2	0,3
Pa_1_750	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_1_800	„Putative endothiapepsin precursor"	0,3	0,3
Pa_1_8290	„mat-specific pheromone precursor encoded by the mfm gene"	0,1	0,1
Pa_2_1195	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_2_14110	„Putative alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase"	0,3	0,3
Pa_2_7420	„Putative NAD(P)-binding protein involved in aflatoxin biosynthesis orthologous to *A. nidulans* stcO, member of the aflatoxin cluster"	0,3	0,2
Pa_2_7680	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_3_1170	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_3_2030	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_3_2920	„IDI-1 precursor of cell wall protein encoded by the idi-1 gene"	0,2	0,2
Pa_4_1215	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_4_1240	„Putative methionine permease"	0,2	0,2
Pa_4_2120	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_4_2185	„Putative protein of unknown function"	0,1	0,1
Pa_4_3710	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,2
Pa_4_5870	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_4_9485	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_5_11300	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3
Pa_5_1420	„Putative Glycoside Hydrolase Family 31"	0,2	0,3
Pa_5_2330	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_5_2580	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_5_4730	„Putative arylsulfatase"	0,1	0,3
Pa_5_7055	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,3
Pa_5_8880	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,2
Pa_6_4110	„Putative HMG-box containing domain protein"	0,3	0,3
Pa_6_5355	„Putative protein of unknown function"	0,3	0,2
Pa_7_1140	„Putative protein of unknown function"	0,2	0,3

9.8 „GO-enrichment" Analyse des Wildtyps und des ∆*PaSod3*-Stammes

Tabelle S33: Vollständige „GO-enrichment" Analyse der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich von ∆*PaSod3* vs. Wildtyp im juvenilen und seneszenten Stadium. Als Ursprungsdaten zur Erstellung der „GO-enrichment" Analyse dienten die in Tabelle S31 und Tabelle S32 aufgeführten Transkripte.

GO-Bezeichnung	P-Wert	erwartete Anzahl	Anzahl	Größe	Bezeichnung	Regulation
Zelluläre Komponente						
GO:0005746	0,000299	0,13751919	3	62	„mitochondrial respiratory chain"	up

GO-Bezeichnung	P-Wert	erwartete Anzahl	Anzahl	Größe	Bezeichnung	Regulation
GO:0070469	0,000525	0,16635386	3	75	„respiratory chain“	up
GO:0005747	0,00305239	0,08428596	2	38	„mitochondrial respiratory chain complex I“	up
GO:0045271	0,00371976	0,09315816	2	42	„respiratory chain complex I“	up
GO:0030964	0,00371976	0,09315816	2	42	„NADH dehydrogenase complex“	up
GO:0044455	0,00458673	0,35267019	3	159	„mitochondrial membrane part“	up
GO:0005739	0,00535652	2,48643576	7	1121	„mitochondrion“	up
GO:0005576	0,0012997	0,91929705	5	449	„extracellular region“	down
Biologischer Prozess						
GO:0042773	1,6005E-05	0,16581633	4	75	„ATP synthesis coupled electron transport“	up
GO:0006119	6,5321E-05	0,23656463	4	107	„oxidative phosphorylation“	up
GO:0022904	8,0896E-05	0,24982993	4	113	„respiratory electron transport chain“	up
GO:0055114	9,1561E-05	0,85782313	6	388	„oxidation-reduction process“	up
GO:0015980	0,00015916	0,57704082	5	261	„energy derivation by oxidation of organic compounds“	up
GO:0042775	0,00032545	0,1414966	3	64	„mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport“	up
GO:0022900	0,00033467	0,36037415	4	163	„electron transport chain“	up
GO:0042402	0,00053215	0,03537415	2	16	„cellular biogenic amine catabolic process“	up
GO:0006091	0,00057962	0,76054422	5	344	„generation of precursor metabolites and energy“	up
GO:0009310	0,00092548	0,04642857	2	21	„amine catabolic process“	up
GO:0045333	0,00095806	0,47534014	4	215	„cellular respiration“	up
GO:0016310	0,00140165	0,52619048	4	238	„phosphorylation“	up
GO:0042542	0,00142338	0,05748299	2	26	„response to hydrogen peroxide“	up
GO:0006314	0,00215609	0,0707483	2	32	„intron homing“	up
GO:0042426	0,00221088	0,00221088	1	1	„choline catabolic process“	up
GO:0042183	0,00221088	0,00221088	1	1	„formate catabolic process“	up
GO:0030416	0,00221088	0,00221088	1	1	„methylamine metabolic process“	up
GO:0015942	0,00221088	0,00221088	1	1	„formate metabolic process“	up
GO:0015946	0,00221088	0,00221088	1	1	„methanol oxidation“	up
GO:0034308	0,00257678	0,07738095	2	35	„primary alcohol metabolic process“	up
GO:0006120	0,00335697	0,08843537	2	40	„mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone“	up
GO:0071462	0,00441726	0,00442177	1	2	„cellular response to water stimulus“	up
GO:0042631	0,00441726	0,00442177	1	2	„cellular response to water deprivation“	up
GO:0009414	0,00441726	0,00442177	1	2	„response to water deprivation“	up
GO:0009415	0,00441726	0,00442177	1	2	„response to water stimulus“	up
GO:0000302	0,00461199	0,10391156	2	47	„response to reactive oxygen species“	up
GO:0006793	0,00568227	0,77159864	4	349	„phosphorus metabolic process“	up
GO:0006796	0,00568227	0,77159864	4	349	„phosphate-containing compound metabolic process“	up
GO:0009081	0,00649698	0,12380952	2	56	„branched-chain amino acid metabolic process“	up
GO:0006735	0,00661912	0,00663265	1	3	„NADH regeneration“	up
GO:0000949	0,00661912	0,00663265	1	3	„aromatic amino acid family catabolic process to alcohol via Ehrlich pathway“	up
GO:0006576	0,00672485	0,12602041	2	57	„cellular biogenic amine metabolic process“	up
GO:0044106	0,00842077	0,1414966	2	64	„cellular amine metabolic process“	up

GO-Bezeichnung	P-Wert	erwartete Anzahl	Anzahl	Größe	Bezeichnung	Regulation
GO:0019673	0,00881649	0,00884354	1	4	„GDP-mannose metabolic process“	up
GO:0009298	0,00881649	0,00884354	1	4	„GDP-mannose biosynthetic process“	up
Molekulare Funktion						
GO:0016491	0,00019644	3,96639581	11	1920	„oxidoreductase activity“	up
GO:0050136	0,00021635	0,12188404	3	59	„NADH dehydrogenase (quinone) activity“	up
GO:0008137	0,00021635	0,12188404	3	59	„NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity“	up
GO:0003954	0,00025076	0,12808153	3	62	„NADH dehydrogenase activity“	up
GO:0016655	0,00039055	0,14873984	3	72	„oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, quinone or similar compound as acceptor“	up
GO:0008875	0,00059797	0,03718496	2	18	„gluconate dehydrogenase activity“	up
GO:0016651	0,00131292	0,2251756	3	109	„oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH“	up
GO:0030976	0,00178938	0,06404077	2	31	„thiamine pyrophosphate binding“	up
GO:0050177	0,00412768	0,00413166	1	2	„phenylpyruvate decarboxylase activity“	up
GO:0020037	0,00556407	0,7560942	4	366	„heme binding“	up
GO:0046906	0,00567311	0,76022586	4	368	„tetrapyrrole binding“	up
GO:0004737	0,00618555	0,00619749	1	3	„pyruvate decarboxylase activity“	up
GO:0004476	0,00618555	0,00619749	1	3	„mannose-6-phosphate isomerase activity“	up
GO:0008863	0,00618555	0,00619749	1	3	„formate dehydrogenase (NAD+) activity“	up
GO:0008873	0,00618555	0,00619749	1	3	„gluconate 2-dehydrogenase activity“	up
GO:0050662	0,00810572	1,34898774	5	653	„coenzyme binding“	up
GO:0004339	0,00057942	0,03663407	2	14	„glucan 1,4-alpha-glucosidase activity“	down
GO:0015175	0,00158846	0,06018455	2	23	„neutral amino acid transmembrane transporter activity“	down
GO:0000772	0,00261672	0,00261672	1	1	„mating pheromone activity“	down
GO:0008449	0,00261672	0,00261672	1	1	„N-acetylglucosamine-6-sulfatase activity“	down
GO:0005186	0,00261672	0,00261672	1	1	„pheromone activity“	down
GO:0047674	0,00261672	0,00261672	1	1	„apiose 1-reductase activity“	down
GO:0015179	0,00346236	0,08896846	2	34	„L-amino acid transmembrane transporter activity“	down
GO:0004065	0,00522695	0,00523344	1	2	„arylsulfatase activity“	down

9.9 Wuchsraten von *PaSod3*-Mutanten bei $MnCl_2$-Supplementation

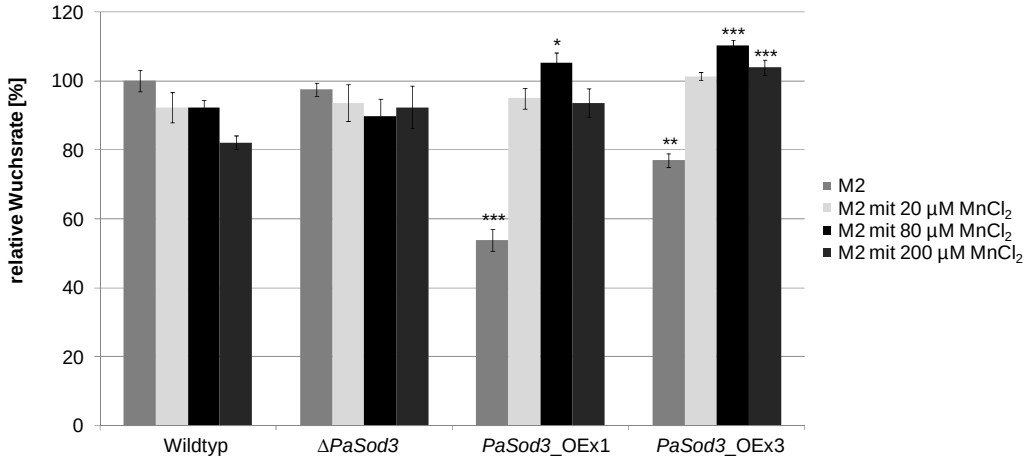


Abbildung S49: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium mit verschiedenen $MnCl_2$-Konzentrationen. Graphische Darstellung der relativen Wuchsraten des Wildtyps sowie der Δ*PaSod3*-, *PaSod3*_OEx1- und *PaSod3*_OEx3-Stämme (je n = 4) auf M2-Medium und M2-Medium mit 20 µM, 80 µM oder 200 µM $MnCl_2$. Die Wuchsraten wurden nach vier Tagen Inkubation auf dem entsprechenden Medium bei 27 °C und Dauerlicht bestimmt und relativ zum Wildtyp auf M2-Medium berechnet. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf dem entsprechenden Medium konnten mit dem Student's T-Test ermittelt werden und sind mit "*" gekennzeichnet (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$). Ferner ist der jeweilige Standardfehler eingezeichnet.

9.10 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AA	L-Ascorbinsäure
Abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Arbeitskreis
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
BMM	Biomalz-Mais-Medium
bp	Basenpaar(e)
BP	„biological process“
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
CAT	Katalase
CC	„cellular component“
Cd	Cadmium
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[3-(Cholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat
cm	Zentimeter
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxyspiro (1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro)-tricyclo[3.3.1.1]decan)-4yl)-phenylphosphat
Ct	„Cycle threshold“
Cu	Kupfer
Cu/ZnSOD	Kupfer/Zink Superoxid-Dismutase
DAB	Diaminobenzidin
dFUR	5´-Fluoro-deoxyuridin
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	2’-Desoxy-Nukleosid-5’-triphosphate
DTPA	Diethylentriaminpentaazetat
DTT	Dithiothreitol
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
Em	molarer Extinktionskoeffizient
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii/et aliae/et alia
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FeSOD	Eisen Superoxid-Dismutase
fmol	Femtomol
for	„forward“
FRTA	freie Radikal-Theorie des Alterns
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GO	Gen Ontologie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
h	Stunde(n)
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine -1-ethanesulfonic acid
HSP	„heat shock protein“
IAA	Isoamylalkohol

IEF	isoelektrische Fokussierung
IPG	immobilisierter pH-Gradient
juv	juvenil
kbp	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	Molar
M2(+)-Medium	M2-Medium mit 80 µM $MnSO_4$
MALDI-TOF-MS	„Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry“
max.	maximal
MF	„molecular function“
MFRTA	mitochondriale freie Radikal-Theorie des Alterns
mg	Milligramm
Mg	Magnesium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MLS	mitochondriale Lokalisationssequenz
mM	Millimolar
Mn	Mangan
MnSOD	Mangan Superoxid-Dismutase
Mn-TBAP	Mangan(III)-tetrakis-(4-benzoesäure)-porphyrin-chlorid
mPTP	mitochondriale Permeabilitäts-transitionspore
Mt	Metallothionein
mtDNA	mitochondriale DNA
n	Probenzahl
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblautetrazolium
ng	Nanogramm
NiSOD	Nickel Superoxid-Dismutase
nm	Nanometer
$O_2^{\cdot -}$	Superoxidanion, Superoxid
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
p-Wert	„probability value“, Signifikanzwert
p. A.	„pro analysis“, Chemikalie mit hoher Reinheit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	potentia hydrogenii
P_i	anorganisches Phosphat
PMF	„Peptide Mass Fingerprint“
pmol	Pikomol
PRX	Peroxiredoxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative „Real-Time“-PCR
rev	„revers“
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	„reactive oxygen species“, reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SHAM	Salizylhydroxaminsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
sen	seneszent
SOD	Superoxid-Dismutase
SRM	„selected reaction monitoring“
SSC	Natriumsalzcitrat
STC	Tetrachlorsilan
STET	Saccharose-Triton X 100-EDTA-Tris
TAE	Tris-Azetat-EDTA
Taq	*Thermus aquaticus*
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS
TIM	„translocase of the inner membrane“
TOM	„translocase of the outer membrane“
tpm	„tags per million“
TPS	Transformations-Phosphat-Saccharose-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRX	Thioredoxin
TRXR	Thioredoxin-Reduktase
TTHA	Triethylenetetraminhexaazetat
U	Unit
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UQ	Ubichinon
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	„volume/volume“
VDAC	„voltage-dependent anion channel“
Vol.	Volumen
vs.	versus
w/v	„weight/volume“
WST-1	(2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium)
z. B.	zum Beispiel
Zn	Zink

9.11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Hyphenabschnitts sowie dem Elektronentransport der mitochondrialen Atmungskette von *Podospora anserina*. 4

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Detoxifizierungsnetzwerkes. 6

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aufnahmemechanismen von Mangan in *S. cerevisiae*. 11

Abbildung 4: Gewinnung von monokaryotischen Sporen von *P. anserina* durch „Konfrontations-kreuzung“. 14

Abbildung 5: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der (putativen) Superoxid-Dismutasen in *P. anserina*. ... 50

Abbildung 6: Western Blot-Analysen vom Wildtyp und *PaSod*-Mutantenstämmen. ... 52

Abbildung 7: Quantifizierung der PaSOD-Mengen des Wildtyps und der *PaSod*-Mutantenstämme. ... 52

Abbildung 8: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp und *PaSod*-Mutanten. ... 54

Abbildung 9: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung und Western Blot-Analyse vom Wildtyp sowie *PaSod2*_OEx-Mutanten. ... 55

Abbildung 10: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der Superoxid-Dismutasen von *S. cerevisiae*. ... 56

Abbildung 11: Darstellung der Gesamt-SOD-Aktivitäten von *S. cerevisiae*-Stämmen. ... 57

Abbildung 12: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbungen von *ScSod*-Mutantenstämmen und den entsprechenden Wildtypen. ... 58

Abbildung 13: Darstellung des Homologievergleichs der Mn-bindenden (putativen) SODs PaSOD2, PaSOD3 sowie Pa_1_10620. ... 60

Abbildung 14: Relative *Pa_1_10620*-Transkriptmenge im Wildtyp und den *Pa_1_10620*_OEx-Stämmen. ... 61

Abbildung 15: Western Blot-Analysen des Wildtyps sowie der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. ... 62

Abbildung 16: „In-Gel" SOD-Aktivitätsfärbung vom Wildtyp und Δ*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämmen. ... 63

Abbildung 17: Analyse der Wuchsraten und Lebensspannen des Wildtyps und der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. ... 64

Abbildung 18: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutantenstämme auf PASM ohne bzw. mit Paraquat. ... 68

Abbildung 19: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutantenstämme auf PASM mit Wasserstoffperoxid. ... 70

Abbildung 20: Analyse des Wuchsverhaltens des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium sowie M2-Medium mit verschiedenen $MnSO_4$-Konzentrationen. ... 76

Abbildung 21: Fertilität des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme auf M2- und M2(+)-Medium. ... 77

Abbildung 22: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps sowie der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium und M2-Medium supplementiert mit $MgSO_4$- sowie $ZnSO_4$. ... 79

Abbildung 23: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutanten auf M2-Medium mit verschiedenen Konzentrationen L-Ascorbinsäure bzw. N-Acetyl-L-Cystein. ... 80

Abbildung 24: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Mutanten auf M2- bzw. M2(+)-Medium. ... 81

Abbildung 25: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps sowie der *PaCypD*_OEx- und Δ*PaMth1*-Stämme auf M2- bzw. M2(+). ... 82

Abbildung 26: Bestimmung der relativen SOD-Aktivitäten von mitochondrialen Proteinextrakten bzw. Gesamtproteinextrakten. ... 83

Abbildung 27: Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2- sowie M2(+)-Medium. ... 84

Abbildung 28: Western Blot-Analysen von mitochondrialen Proteinextrakten des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). ... 85

Abbildung 29: Peroxidase- und Katalase-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp und den *PaSod3*_OEx-Stämmen kultiviert auf M2 bzw. M2(+). ... 86

Abbildung 30: Relative Wasserstoffperoxid-Abbaurate des Wildtyps und des *PaSod3*_OEx1-Stammes von M2- bzw. M2(+)-Medium. ... 87

Abbildung 31: Mikroskopische Analyse der Mitochondrien des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme. 88

Abbildung 32: Sauerstoffverbrauchsmessungen vom Wildtyp und den *PaSod3*_OEx-Stämmen von M2 bzw. M2(+). ... 89

Abbildung 33: Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese des Wildtyps und der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). ... 91

Abbildung 34: Zweidimensionale Gelelektrophoresen von Gesamtproteinextrakten des Wildtyps von M2 und des *PaSod3*_OEx1-Stammes von M2(+). ... 92

Abbildung 35: Darstellung der Sequenzabdeckung bei der Identifizierung ausgewählter Proteinspots. ... 93

Abbildung 36: Western Blot-Analysen mitochondrialer Proteinextrakte der *PaSod3*_OEx-Stämme von M2 bzw. M2(+). ... 94

Abbildung 37: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps auf M2 sowie M2(+) mit und ohne Wasserstoffperoxid. ... 95

Abbildung 38: Peroxidase- und Katalase-Aktivitätsfärbungen vom Wildtyp auf M2-/M2(+)-Medium bzw. M2-/M2(+)-Medium mit 9 mM Wasserstoffperoxid. ... 96

Abbildung 39: Homologievergleich von *P. anserina* Pa_1_10620 und *A. fumigatus* AfSOD4 (AFUA_6G07210). ... 102

Abbildung 40: Übersicht zur Auswirkung der Modifikation von *PaSod3*. ... 108

Abbildung 41: Schematische Darstellung der durch Mangan veränderten Prozesse in *PaSod3*_OEx-Stämmen. ... 115

Abbildung S42: Verifizierung der *S. cerevisiae*-Stämme über PCR. ... 136

Abbildung S43: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der ∆*PaSod1-PaSod2*_OEx-Stämme. ... 137

Abbildung S44: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme. ... 137

Abbildung S45: Southern Blot-Analysen zur Verifizierung der ∆*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx1-Stämme. ... 138

Abbildung S46: Western Blot-Analyse der ∆*PaSod3-Pa_1_10620*_OEx-Stämme. ... 139

Abbildung S47: Darstellung der relativen Überlebensraten des Wildtyps sowie der *Pa_1_10620*_OEx-Stämme auf M2-Medium mit verschiedenen Zusätzen. ... 141

Abbildung S48: Western Blot-Analyse vom Wildtyp und der Δ*PaSod3*-Mutante sowie Quantifizierung der relativen PaSOD1-Proteinmenge in isolierten Mitochondrien. ... 142

Abbildung S49: Analyse der Wuchsraten des Wildtyps und der *PaSod3*-Stämme auf M2-Medium mit verschiedenen $MnCl_2$-Konzentrationen. ... 146

9.12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung, Lokalisation und Co-Faktoren der SODs ausgewählter Organismen. ... 7

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte. ... 16

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien. ... 17

Tabelle 4: Sonstige verwendete Materialien. ... 19

Tabelle 5: Liste der verwendeten Kits. ... 23

Tabelle 6: Liste der verwendeten Größenstandards. ... 24

Tabelle 7: Liste der verwendeten Oligonukleotide. ... 24

Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide. ... 24

Tabelle 9: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Cosmide. ... 25

Tabelle 10: Liste der verwendeten DIG-markierten DNA-Sonden. ... 25

Tabelle 11: Liste der verwendeten Enzyme. ... 25

Tabelle 12: Liste der verwendeten Primärantikörper. ... 26

Tabelle 13: Liste der verwendeten Sekundärantikörper. ... 26

Tabelle 14: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *P. anserina*-Stämme. ... 26

Tabelle 15: Liste der in dieser Arbeit verwendeten *S. cerevisiae*-Stämme. ... 27

Tabelle 16: Liste des in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stammes. ... 27

Tabelle 17: Liste der verwendeten Computerprogramme. ... 28

Tabelle 18: Komponenten der PCR mit *Taq*-DNA-Polymerase. ... 30

Tabelle 19: Verwendete PCR-Programme. 30

Tabelle 20: Standardprogramm der qRT-PCR. 34

Tabelle 21: Aufstellung der optimalen Anlagerungstemperaturen, Oligonukleotidkonzentrationen sowie Effizienzen für die verwendeten Oligonukleotidpaare. 34

Tabelle 22: Pipettierschema für je zwei SDS-Polyacrylamidgele. 37

Tabelle 23: Pipettierschema für zwei native Polyacrylamidgele. 38

Tabelle 24: Pipettierschema für ein 3,5 - 14 % iges blau-natives Polyacrylamidgele. 42

Tabelle 25: Identitäten von PaSOD1 sowie den zwei putativen SODs Pa_1_10630 und Pa_1_6300 mit *C. albicans* CaSOD4, CaSOD5 und CaSOD6. 65

Tabelle 26: Transkriptmengen von *PaSod1*, *PaSod2*, *PaSod3*, *Pa_1_10630* und *Pa_1_6300* zu unterschiedlichen Zeitpunkten 66

Tabelle 27: Auflistung der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich Δ*PaSod3* juvenil (juv) vs. Wildtyp juvenil sowie Δ*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent. 73

Tabelle 28: „GO-enrichment" Analyse der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich von Δ*PaSod3* mit dem Wildtyp im juvenilen und seneszenten Stadium. 74

Tabelle 29: Ergebnisse der MALDI-TOF-MS- und PMF-Analyse der ausgeschnittenen Proteinspots. 93

Tabelle S30: Quantitative Auswertung der PaSOD1-, PaSOD2- und PaSOD3-Proteinmengen in *PaSod*-Mutantenstämmen (Δ*PaSod1*, *PaSod1*_OEx1/2/3, Δ*PaSod2*, *PaSod2*_OEx1/2/4, Δ*PaSod3*, *PaSod3*_OEx1/3). 139

Tabelle S31: Auflistung der um mindestens Faktor drei hochregulierten Transkripte bei dem Vergleich Δ*PaSod3* jung (juv) vs. Wildtyp jung sowie Δ*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent. 142

Tabelle S32: Auflistung der um mindestens Faktor drei herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich Δ*PaSod3* jung (juv) vs. Wildtyp jung sowie Δ*PaSod3* seneszent (sen) vs. Wildtyp seneszent. 143

Tabelle S33: Vollständige „GO-enrichment" Analyse der um mindestens Faktor drei hoch- bzw. herunterregulierten Transkripte bei dem Vergleich von Δ*PaSod3* vs. Wildtyp im juvenilen und seneszenten Stadium. 143

10. Publikationsliste

Originalarbeiten

Grimm C, Osiewacz H D (2015) Manganese rescues adverse effects on lifespan and development in *Podospora anserina* challenged by excess hydrogen peroxide. Exp Gerontol 63: 8 - 17.

Grimm C, Böhl L, Osiewacz H D (2015) Overexpression of *Pa_1_10620* encoding a mitochondrial *Podospora anserina* protein with homology to superoxide dismutases and ribosomal proteins leads to lifespan extension. Curr Genet 61: 73 - 86.

Servos J, Hamann A, **Grimm C**, Osiewacz H D (2012) A differential genome-wide transcriptome analysis: Impact of cellular copper in complex biological processes like aging and development. PLoS ONE 7: e49292.

Zuccaro A, Lahrmann U, Güldener U, Langen G, Pfiffi S, Biedenkopf D, Wong P, Samans B, **Grimm C**, Basiewicz M, Murat C, Martin F, Kogel K H (2011) Endophytic life strategies decoded by genome and transcriptome analyses of the mutualistic root symbiont *Piriformospora indica*. PLoS Pathog 7: e1002290.

Übersichtsartikel

Wiemer M, **Grimm C**, Osiewacz H D. Molecular control of fungal senescence and longevity. In: The Mycota Vol. I, 3. Auflage. Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokyo, angenommen.