

**Untersuchungen zum Einfluss von Naturstoffen auf
die Mitochondrienfunktion und die Alterung von
*Podospora anserina***

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Verena Warnsmann
aus Ostercappeln

Frankfurt am Main 2018
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

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

2. Gutachter: Prof. Dr. Donat Kögel

Datum der Disputation: 07.09.2018

Erfolg ist nichts endgültiges, Misserfolg nichts fatales: was zählt, ist der Mut weiterzumachen.

Winston Churchill (1874-1965)

Konventionen zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen:

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

- **Gene** werden kursiv geschrieben (z. B. *CypD*, *Mth1*). Soll ein Gen einer bestimmten Art bezeichnet werden, so wird der Artnamen als Abkürzung vorangestellt. So wird z. B. *Podospora anserina Mth1* als *PaMth1* bezeichnet.
- **Proteine** werden in Großbuchstaben und nicht kursiv geschrieben (z. B. CYPD, MTH1). Soll ein Protein einer bestimmten Art bezeichnet werden, so wird auch hier der Artnamen als Abkürzung vorangestellt (z. B. PaMTH1).
- **Deletionsstämme** werden nach dem deletierten Gen benannt (z. B. *PaCypD*-Deletionsstamm) oder in Kurzform durch den griechischen Buchstaben Δ gekennzeichnet, welcher der Bezeichnung des deletierten Gens vorangestellt wird (z. B. $\Delta PaCypD$).
- **Überexpressionsstämme** werden nach dem überexprimierten Gen benannt (z. B. *PaMth1*-Überexpressionsstamm) oder in Kurzform mit dem Suffix „_OEx“ gekennzeichnet (z. B. *PaMth1_OEx*).
- **Fusionsgene und -proteine** werden durch zwei Doppelpunkte zwischen den beiden Abschnitten gekennzeichnet, wobei der N-terminalen Abschnitt zuerst genannt wird (z. B. *PaSod1::Gfp* für das Fusionsgen, bzw. PaSOD1::GFP für das Fusionsprotein).
- **Mehrfachmutanten** werden durch einen Schrägstrich zwischen den einzelnen Mutationen gekennzeichnet (z. B. $\Delta PaCypD/PaSod1::Gfp$ oder $\Delta PaAtg1/PaSod3^{H26L}::Gfp$).
- **mutierte Varianten** von Genen und Proteinen bzw. Fusionsproteinen werden durch die ausgetauschte Aminosäure und deren Position gekennzeichnet. Diese Kennzeichnung wird als hochgestellter Index an den Gen- oder Proteinnamen gehängt (z. B. *PaSod3^{H26L}::Gfp* für die mutierte Variante des *PaSod3::Gfp* oder PaSOD3^{H26L}::GFP für die mutierte Variante des SOD3-Fusionsproteins).
- **Antikörper** erhalten die gleiche Bezeichnung wie Proteine und tragen zusätzlich das Präfix „anti-“.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Merkmale des Alterns | 1 |
| 1.2 | Mitochondrien und Altern | 4 |
| 1.3 | Mitochondrien und Krankheiten bei Menschen..... | 12 |
| 1.4 | Modulation der Mitochondrienfunktion als Therapieansatz | 13 |
| 1.4.1 | Genetische Interventionen..... | 13 |
| 1.4.2 | Interventionen durch die Applikation von Naturstoffen..... | 14 |
| 1.5 | <i>Podospora anserina</i> als Modell für die Alterns- und Mitochondrien-Forschung.... | 26 |
| 2 | Zielsetzungen der Arbeit | 28 |
| 3 | Material und Methoden | 29 |
| 3.1 | Material..... | 29 |
| 3.1.1 | Geräte..... | 29 |
| 3.1.2 | Chemikalien | 30 |
| 3.1.3 | Puffer und Lösungen | 32 |
| 3.1.4 | Anzuchtmedien | 35 |
| 3.1.5 | Kits | 36 |
| 3.1.6 | Stämme | 36 |
| 3.1.7 | Antikörper | 36 |
| 3.1.8 | Größenstandards..... | 37 |
| 3.1.9 | Computerprogramme | 37 |
| 3.1.10 | Sonstige Materialien..... | 38 |
| 3.2 | Methoden | 38 |
| 3.2.1 | <i>Podospora anserina</i> -spezifische Methoden | 38 |
| 3.2.2 | Protein-spezifische Methoden | 41 |
| 3.2.3 | Statistische Auswertung | 53 |
| 4 | Ergebnisse | 55 |
| 4.1 | Modulation von Alterungsprozessen durch genetische Veränderungen: Induktion von Kompensationsmechanismen zum Erhalt der Mitochondrienfunktion | 55 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 4.2 | Modulation von Alterungsprozessen durch exogene Faktoren: Wirkung von Polyphenolen auf die Mitochondrien..... | 58 |
| 4.2.1 | Gossypol - H ₂ O ₂ als Signal zur Induktion von Zelltod..... | 58 |
| 4.2.2 | Curcumin - H ₂ O ₂ als Signal zur Induktion von Langlebigkeit | 76 |
| 4.2.3 | Quercetin - Methyltransferase-vermittelte Lebensverlängerung | 88 |
| 5 | Diskussion | 105 |
| 5.1 | <i>P. anserina</i> als ein Modellsystem zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Polyphenolen | 105 |
| 5.2 | Veränderungen der Mitochondrienfunktion zur Kompensation von zellulären Dysfunktionen und Stressbedingungen..... | 107 |
| 5.3 | Die Wirkung von Polyphenolen beruht nicht auf einem gemeinsamen grundlegenden Wirkprinzip | 111 |
| 5.3.1 | Hormetische Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Regulation der Alterung von <i>P. anserina</i> | 112 |
| 5.3.2 | Die <i>O</i> -Methyltransferase PaMTH1 als Regulator von Lebensspannen-Effekten... | 120 |
| 6 | Ausblick | 124 |
| 7 | Zusammenfassung | 125 |
| 8 | Literatur | 127 |
| 9 | Anhang..... | 156 |
| 9.1 | Ergänzende Tabellen | 156 |
| 9.2 | Abkürzungsverzeichnis | 157 |
| 9.3 | Abbildungsverzeichnis | 158 |
| 9.4 | Tabellenverzeichnis | 160 |
| 10 | Publikationen, Konferenzen, Posterbeiträge & Kurse | 161 |

1 EINLEITUNG

1.1 Merkmale des Alterns

„It's so hard to get old without a cause“

aus „Forever Young“ von Marian Gold (Alphaville), 1984

Mit dieser Liedzeile hat Marian Gold ausgesprochen, was die meisten Menschen täglich denken und nicht wahrhaben wollen. Wir alle altern! Aber was ist Altern und warum altern wir eigentlich? Oder altern wir wie die Liedzeile andeutet „without a cause“?

Allgemeingültig wird das Altern als ein unausweichlicher, fortschreitender biologischer Prozess verbunden mit der Abnahme physiologischer Funktionen und der Anhäufung zellulärer und molekularer Schäden beschrieben, welcher unweigerlich im Tod endet (Kirkwood, 2005; Kirkwood und Austad, 2000; Vijg und Campisi, 2008).

Zur Klärung der Frage nach der Ursache haben viele Wissenschaftler seit nun mehr über 100 Jahren verschiedene Alternstheorien aufgestellt. Begonnen mit der ersten evolutionären Theorie des Alterns von dem deutschen Biologen August Weismann Ende des 19. Jahrhunderts (Weismann, 1882) wurden bis zum Ende des 20. Jahrhunderts mehr als 300 verschiedene Alternstheorien gezählt (Medvedev, 1990). Heute ist die Wissenschaft sich einig, dass das Altern nicht auf einer einzelnen Ursache beruht, sondern ein multifaktorieller Prozess ist. Dieser wird durch intrinsische Einflüsse aufgrund der zellulären und molekularen Beschaffenheit des Organismus und extrinsischer Einflüsse aufgrund der Ernährung und des Lebensstils beeinflusst (Kirkwood, 2011; Kirkwood und Austad, 2000; López-Otín *et al.*, 2016). Derweil sind einige Veränderungen und deren Ursachen, die zugrundeliegenden Mechanismen, des Alterns identifiziert worden (Aunan *et al.*, 2015; López-Otín *et al.*, 2013; Semsei, 2000).

Diese, als Merkmale des Alterns bezeichneten, Veränderungen wurden von dem spanischen Biochemiker Carlos López-Otín in seiner 2013 erschienen Publikation „The hallmark of aging“ in drei Gruppen gegliedert (Abbildung 1). Die Merkmale gelten nicht nur für Säuger, sondern größtenteils auch für andere Organismen. Daher werden sie als der gemeinsame Nenner des Alterns angesehen (López-Otín *et al.*, 2013). In der ersten Gruppe sind die primären Veränderungen zusammengefasst, deren Entstehung die Hauptursachen für die dem Altern zugrundeliegenden, zellulären und molekularen Schäden darstellen. Dazu gehören neben der Genom-Instabilität, hervorgerufen durch Schäden der nukleären und mitochondrialen DNA (Moskalev *et al.*, 2012; Park und Larsson, 2011), die Verkürzung der Telomere (Blackburn *et al.*, 2006), epigenetische Veränderungen (Talens *et al.*,

2012), wie z. B. Histon-Modifikationen, DNA-Methylierungen oder Chromatin-Remodellierungen und der Verlust der Proteostase (Koga *et al.*, 2011; Powers *et al.*, 2009). Alle diese Merkmale führen zu Veränderungen des zellulären Metabolismus.

Der Begriff Metabolismus leitet sich von dem altgriechischen Wort μεταβολισμός (metabolismós = Stoffwechsel) ab und bedeutet wörtlich Umwandlung oder Veränderung. Der Stoffwechsel eines Lebewesens umfasst die Gesamtheit aller chemischen Prozesse. Während dieser Prozesse werden chemische Stoffe in Zwischenprodukte, die sogenannten Metabolite, und Endprodukte umgewandelt. Sie dienen der Aufrechterhaltung der Körperfunktionen und umfassen den Baustoffwechsel und den Energiestoffwechsel.

Diese Veränderungen werden als Folgen bzw. Antworten auf die Schäden, verursacht durch die erste Gruppe, angesehen und in der zweiten Gruppe, den antagonistischen Merkmalen, zusammengefasst. Zu dieser Gruppe zählen eine deregulierte Nährstoff-Sensorik (Efeyan *et al.*, 2015), mitochondriale Dysfunktion (Wang und Hekimi, 2015), sowie die zelluläre Seneszenz (Sikora *et al.*, 2014; van Deursen, 2014). Alle drei Merkmale verursachen weitere Schäden im Organismus. Die letzte und somit dritte Gruppe umfasst die sogenannten integrativen Merkmale. Zu denen zählen der Verlust der Stammzellen und eine veränderte interzelluläre Kommunikation. Diese Merkmale sind die eigentlichen „Schuldigen“ des Alterns und die Folge übermäßiger Schäden, verursacht durch die primären und antagonistischen Merkmale (López-Otín *et al.*, 2013).

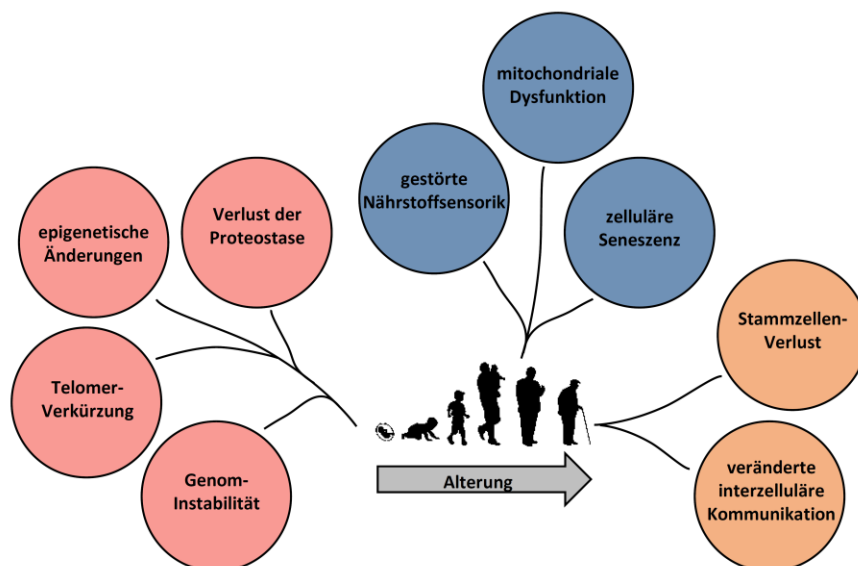


Abbildung 1: Übersicht der Merkmale des Alterns. Mit dem Alterungsprozess kommt es zu charakteristischen Veränderungen in einem Organismus. Diese Veränderungen werden als Merkmale des Alterns beschrieben und in drei Gruppen unterteilt. In der ersten Gruppe sind die primären Merkmale (rot) zusammengefasst. Diese sind ursächlich für die Anhäufung der zellulären und molekularen Schäden im Laufe des Alterns. Die zweite Gruppe umfasst die antagonistischen Merkmale (blau), welche als Folge bzw. als Antwort auf die primären Merkmale gelten. Die integrativen Merkmale (orange) bilden die dritte Gruppe. Sie sind die eigentlichen „Schuldigen“ des Alterns und die Folge der Merkmale aus den beiden vorherigen Gruppen. Abbildung modifiziert nach López-Otín *et al.* (2013).

Um übermäßige Schäden zu verhindern und das Gleichgewicht der Zelle, die Homöostase, aufrechtzuerhalten, besitzt die Zelle sogenannte Qualitätskontroll-Mechanismen.

Der Begriff Homöostase leitet sich vom altgriechischen Wort „ὁμοιοστάσις“ („homoiostásis“ = Gleichstand) ab und beschreibt die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichtszustands oder, wie in der Physiologie definiert, die Konstanzhaltung eines inneren Milieus. Beispiele sind die Blutzucker-Regulation, die Blutdruck-Regulation und die Thermo-Regulation. Das Konzept beruht auf Beschreibungen des Physiologen Claude Bernard aus dem Jahr 1860. Dieses Konzept wurde durch den Physiologen Walter Cannon und Biologen Karl Ludwig von Bertalanffy in den Jahren 1929 und 1932 geprägt.

Diese Mechanismen sind jedoch einerseits nur bis zu einem gewissen Ausmaß der Schäden in der Lage diese zu kompensieren. Und andererseits versagen diese Qualitätskontroll-Mechanismen mit dem Alter und verlieren ihre Effizienz (Campisi, 2003; Hayflick, 2007; Holliday, 2006; Kirkwood, 2011; López-Otín *et al.*, 2013; Timiras, 1975). So nehmen die molekularen Schäden mit der Zeit überhand, verursachen ein Ungleichgewicht in der Zelle und führen schlussendlich zum Zelltod (Abbildung 2).

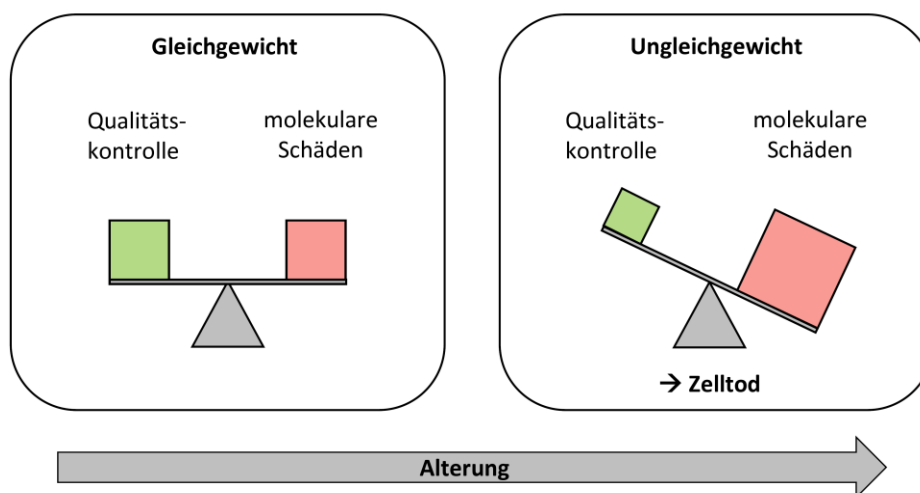


Abbildung 2: Einfluss der Qualitätskontrolle und molekularer Schäden auf das zelluläre Gleichgewicht. Zu Beginn des Alterungsprozesses ist das zelluläre System eines Organismus im Gleichgewicht. In diesem Zustand können die molekularen Schäden, welche durch verschiedene intrinsische und extrinsische Einflüsse sowie genetische Veranlagungen entstehen, durch evolutionär entwickelte Qualitätskontroll-Mechanismen minimiert werden. So hält sich die Entstehung und der Abbau der Schäden in der Waage. Im Laufe des Alterungsprozesses nehmen die molekularen Schäden zu und die Effizienz der Qualitätskontroll-Mechanismen ab. Die molekularen Schäden nehmen überhand und das System gerät in ein Ungleichgewicht, was schlussendlich zum Zelltod führt. Modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2016).

Zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase benötigt die Zelle Energie, sowohl für die normalen zellulären Prozesse als auch für die Qualitätskontroll- und Reparatur-Mechanismen. Daher ist die Energieversorgung innerhalb der Zellen von großer Bedeutung für den Alterungsprozess (Finkel und Holbrook, 2000; López-Otín *et al.*, 2013; Riera und Dillin, 2015). Die

Energieversorgung sowie andere Prozesse des zellulären Metabolismus sind eng mit der Mitochondrienfunktion verbunden. Daher gilt die mitochondriale Dysfunktion als das Schlüsselmerkmal des Alterns. Diese, auch als mitochondriale Ätiologie des Alterns bezeichnete, Schlüsselrolle wird durch Untersuchungen mit einfachen Modellorganismen, wie *Podospira anserina* (Marcour, 1961; Osiewacz, 2002; Tudzynski und Esser, 1977), *Saccharomyces cerevisiae* (Hughes und Gottschling, 2012; Lin *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2004) und komplexeren Organismen wie Säugern (Schriner *et al.*, 2005; Trifunovic *et al.*, 2004; Weindruch *et al.*, 1986) bekräftigt.

1.2 Mitochondrien und Altern

Mitochondrien - Kraftwerke der Zellen

Mitochondrien sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen vorkommende semiautonome Organellen (Ernster und Schatz, 1981). Der Begriff Mitochondrium leitet sich von den altgriechischen Wörtern *μίτος* (mitos = Faden) und *χονδρίον* (chondrion = Körnchen) ab. Als ihr Ursprung gilt heute die Endosymbionten-Theorie.

Nach der Endosymbionten-Theorie sind Mitochondrien und auch Plastiden vor ca. 1,5 Millionen Jahren durch die phagozytotische Aufnahme eines aeroben α -Proteobakterium durch eine anaerobe prä-eukaryotische Wirtszelle entstanden (Kadenbach, 2012; Margulis, 1975; Richards und Archibald, 2011; Wallin, 1923; Zimmer, 2009). Daher besitzen sie ihre eigene genetische Information, die mitochondriale DNA (mtDNA). Aufgrund evolutionärer Einflüsse hat sich das mitochondriale Genom stark verkleinert. Von den, für die Mitochondrienfunktion wichtigen, ca. 1500 Proteinen ist der größte Teil Kern-kodiert. Sie werden nach der Bildung im Zytoplasma in die Mitochondrien transportiert. Nur noch wenige Proteine, in Menschen und auch *P. anserina* 13 Proteine, sind in der mtDNA kodiert und werden in den Mitochondrien gebildet (Bonawitz *et al.*, 2006a; Chacinska *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2010).

Die Bedeutung der Mitochondrien für einen Organismus spiegelt sich in der Zahl essentieller Vorgänge, die in ihnen ablaufen oder an denen sie beteiligt sind, wider. Hierzu zählen der Aminosäuremetabolismus, die β -Oxidation von Fettsäuren, die Generierung von Eisen-Schwefel-Clustern und die Kalzium-Homöostase (Ames *et al.*, 2005; Duchon, 2000; Lill, 2009; Lill *et al.*, 2012). Darüber hinaus beherbergen die Mitochondrien den Tricarbonsäure-Zyklus (kurz: TCA-Zyklus, auch bekannt als Citrat-Zyklus), welcher das Ende des Glukose-Abbaus der Zelle ist und Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 bereitstellt (Krebs, 1970; Wallace, 2005). Die wohl bekannteste und zentrale Funktion ist die Generierung des universellen Energieüberträgers Adenosintriphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung (kurz: OXPHOS) (Mitchell, 1961). Dadurch wird der größte Teil des zellulären Energiebedarfs abgedeckt. Auf dieser Funktion beruht auch der umgangssprachliche Ausdruck „Kraftwerke der Zellen“.

Für die OXPHOS ist die, in der inneren der beiden Mitochondrienmembranen lokalisierte, Elektronentransportkette (engl. „electron transport chain“; kurz: ETC oder Atmungskette) notwendig (Hatefi, 1985; Saraste, 1999). Bestehend i. d. R. aus vier multiheteromeren Komplexen, der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), transportiert sie mit Hilfe der Elektronentransportmoleküle Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c energiereiche Elektronen, die am Ende auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Übersicht in Abbildung 3).

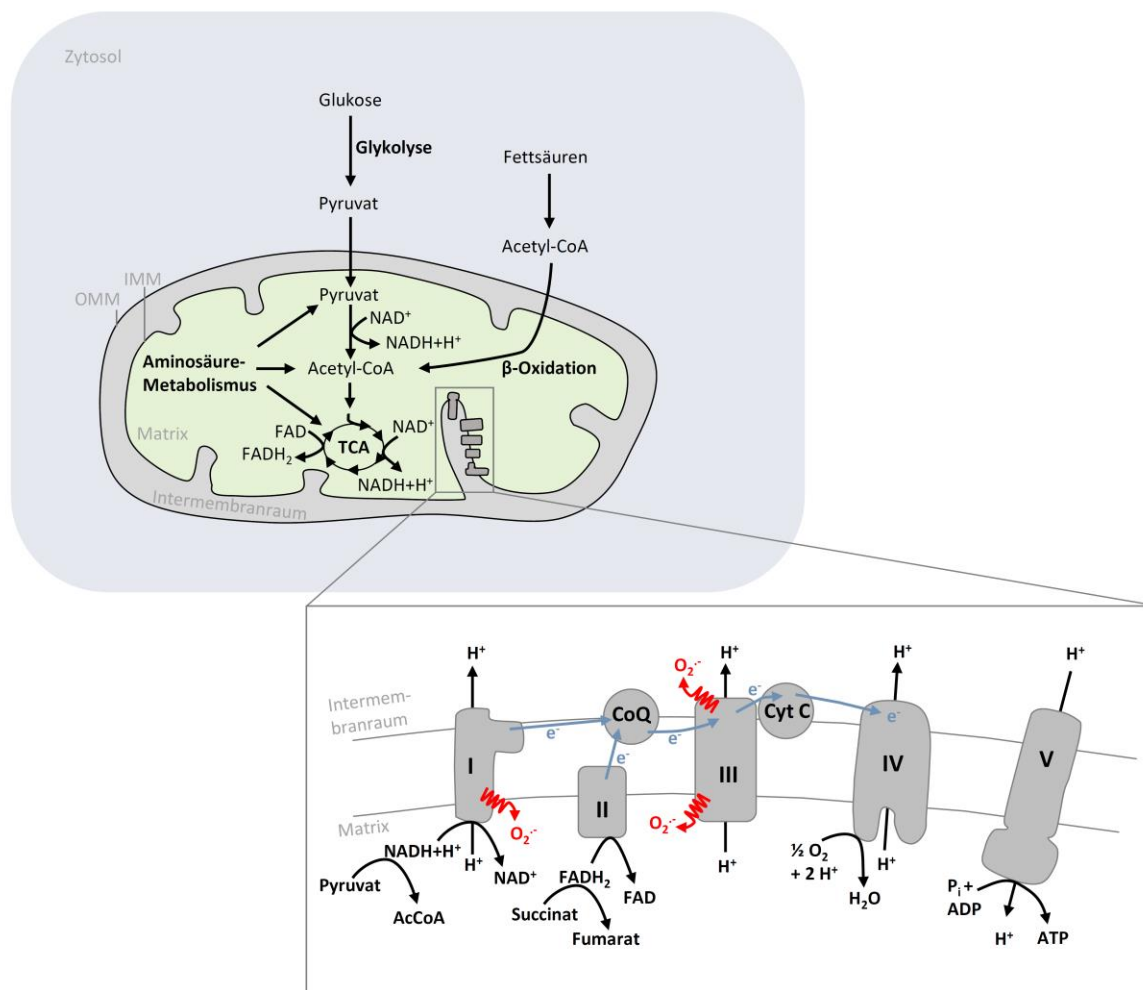


Abbildung 3: Mitochondrien die Kraftwerke der Zellen. Schematische Darstellung eines Mitochondriums sowie der mitochondrialen Elektronentransportkette (ETC). Die ETC setzt sich aus vier Atmungskettenkomplexen (I bis IV) sowie der F₀F₁-ATP-Synthase (Komplex V) zusammen und ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. An Komplex I und II werden Elektronen (e⁻) durch die Reduktionsäquivalente NADH+H⁺ und FADH₂ in die ETC eingeschleust und mit Hilfe von Coenzym Q (CoQ) und Cytochrom C (CytC) über die Komplexe III und IV unter Bildung von Wasser (H₂O) auf Sauerstoff (O₂) übertragen. Hierbei freiwerdende Energie wird genutzt, um an Komplex I, III und IV Protonen (H⁺) in den Intermembranraum zwischen IMM und äußerer Mitochondrienmembran (OMM) zu pumpen. Der dadurch entstehende elektrochemische Gradient bzw. dessen Energie wird von Komplex V genutzt, um ATP aus ADP und P_i zu generieren. Durch Fehlübertragungen von e⁻ an Komplex I und III wird Superoxid (O₂⁻) gebildet, welches in die mitochondriale Matrix oder den Intermembranraum abgegeben wird. Die benötigten Reduktionsäquivalente stammen aus dem Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus). In diesem Zyklus wird Acetyl-CoA (AcCoA) aus der Glykolyse, der β-Oxidation und dem Aminosäuremetabolismus abgebaut.

Die notwendigen energiereichen Elektronen stammen aus dem Abbau von Glukose über die Glykolyse und den TCA-Zyklus (Alberts *et al.*, 2014; Wallace, 2005). Sie werden durch die Reduktionsäquivalente $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 an den Komplexen I und II der Atmungskette zugeführt. Durch den Transport der Elektronen wird Energie frei, welche zum Pumpen von Protonen aufgewendet wird. So werden an den Komplexen I, III und IV Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran gepumpt (Abbildung 3). Hierdurch entsteht ein elektrochemischer Protonengradient, das mitochondriale Membranpotential (mtMP) (Hatefi, 1985; Saraste, 1999). Die Energie dieses Gradienten wird von der F_0F_1 -ATP-Synthase (auch Komplex V genannt) genutzt, um ATP aus Adenosindiphosphat (ADP) und anorganischem Phosphat (P_i) zu generieren (Abbildung 3) (Hatefi, 1985; Mitchell und Moyle, 1968; Saraste, 1999). Nach dem „plasticity“-Modell können die Atmungskettenkomplexe sowohl frei in der inneren Mitochondrienmembran diffundieren, als auch in stabilen supramolekularen Komplexen, den sogenannten mitochondrialen Atmungsketten-Superkomplexen (engl. „mitochondrial respiratory supercomplexes“; kurz: mtRSCs), assoziiert vorliegen (Acin-Perez *et al.*, 2008; Bianchi *et al.*, 2004; Boekema und Braun, 2007).

Entstehungsort von reaktiven Sauerstoffspezies

Außer dem Hauptprodukt ATP entsteht durch die OXPHOS, aufgrund des permanenten Entweichens von Elektronen aus der Atmungskette, ein Nebenprodukt. Etwa 1-2 % der Elektronen, die auf Sauerstoff übertragen werden sollen, entweichen aus der Atmungskette (Boveris, 1984; Boveris *et al.*, 1972). Die entweichenden Elektronen führen zu einer verfrühten und unvollständigen Reduktion des Sauerstoffs an Komplex I und III (Dröse und Brandt, 2008; Turrens und Boveris, 1980). Hierdurch entstehen Superoxid-Anionen (O_2^- , kurz: Superoxid), welche zu den reaktiven Sauerstoffspezies (engl. „reactive oxygen species“, kurz: ROS) zählen (Lenaz, 2001; Murphy, 2009; Turrens, 2003)

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies werden alle schädlichen Formen des Sauerstoffs zusammengefasst. Dazu zählen unter anderem Superoxid-Anionen (O_2^-), Peroxylradikale ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxylradikale ($\text{RO}\cdot$), Stickstoffmonoxide ($\text{NO}\cdot$) oder auch Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$), sowie stabilere Sauerstoffmoleküle, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Ozon (O_3). Von den genannten stellt das Hydroxylradikal die reaktivste Verbindung dar (Baud und Ardaillou, 1986). So zählt es neben den Superoxid-Anionen und dem Wasserstoffperoxid zu den wichtigsten ROS (Elmadfa und Leitzmann, 2004).

Das an Komplex I gebildete Superoxid geht hauptsächlich in die mitochondriale Matrix, wohingegen das an Komplex III gebildete in die mitochondriale Matrix und den Intermembranraum abgegeben wird (Muller *et al.*, 2004). Die Entstehung von Superoxid wird durch ein erhöhtes mitochondriales

Membranpotential (mtMP) begünstigt (Korshunov *et al.*, 1997; Pozniakovsky *et al.*, 2005; Turrens, 1997).

Das so entstehende Superoxid ist der Ursprung für weitere ROS, wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder das Hydroxylradikal (OH[·]). In der Zelle schädigen diese ROS die Makromoleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide (Brand *et al.*, 2004; Halliwell, 2001; Turrens, 2003). Da 90 % aller in der Zelle gebildeter ROS in den Mitochondrien gebildet werden (Balaban *et al.*, 2005; Bratic und Trifunovic, 2010; Chance *et al.*, 1979), sind die Proteine der OXPHOS ein Hauptziel der ROS-bedingten Schäden (Harper *et al.*, 2004; Melov *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2010). ROS haben neben der schädigenden Wirkung aber auch wichtige Funktionen als Signalmoleküle z. B. in Entwicklungsprozessen (Aguirre *et al.*, 2005; Finkel *et al.*, 2003; Halliwell und Gutteridge, 1986; Reczek und Chandel, 2015). Die wichtigsten Signalwirkungen unter den ROS hat Wasserstoffperoxid und agiert abhängig von der Menge. In geringen Mengen dient es als Signalmolekül und in hohen Mengen verursacht es Schäden an der Zelle (Veal und Day, 2011).

Um eine Balance zwischen ROS-bedingten Schäden und der notwendigen Signalwirkung aufrechtzuerhalten, besitzen die Zellen eine Reihe von Regulations-Mechanismen zum Abbau von ROS, das sogenannte ROS-Abwehr-System (engl. „ROS scavenging system“) (schematische Übersicht in Abbildung 4). Zu diesen Mechanismen gehören verschiedene Enzyme und nicht-enzymatische Antioxidantien (Radikalfänger). Zu den letzteren zählen u. a. Vitamin C und E (Emri *et al.*, 2004; Georgiou und Petropoulou, 2002), Carotinoide (Mandelli *et al.*, 2012), verschiedene Polyphenole (Cos *et al.*, 1998), Glutathion und Coenzym Q (zusammengefasst in: Scandalios (2005)). Diese Radikalfänger sind in den verschiedenen Zellkompartimenten verteilt und werden entweder innerhalb des zellulären Metabolismus gebildet oder mit der Nahrung aufgenommen. Jedoch ist diese nicht-enzymatische Regulation der ROS-Menge nicht sehr effektiv. Daher sind die effizienteren enzymatischen Mechanismen unbedingt notwendig. Zu diesen zählen die Superoxid-Dismutasen (SODs), die Katalasen (CATs), die Peroxiredoxine (PRXs) und die Peroxidasen (Abbildung 4).

All diese Enzyme wandeln in einem kontrollierten Zusammenspiel ROS in unschädliche Produkte, wie Wasser und Sauerstoff, um wobei nur SODs in der Lage sind, Superoxid abzubauen. Durch diesen Abbau entsteht Wasserstoffperoxid, eine weitere ROS.

Superoxid-Dismutasen (SODs) bauen, mit hoher Reaktionsgeschwindigkeit, durch eine Dismutation Superoxid ab, wobei Wasserstoffperoxid und Sauerstoff entsteht (Cudd und Fridovich, 1982; Getzoff *et al.*, 1992). Für diese Reaktion werden Metalle als Kofaktoren benötigt. Je nach Enzym ist dies Kupfer und Zink, Mangan oder nur Kupfer (Culotta *et al.*, 2006; Gleason *et al.*, 2014). Aufgrund der kaum vorhandenen Membrangängigkeit von Superoxid besitzen die meisten Organismen mehrere SODs, lokalisiert in den verschiedenen Zell-Kompartimenten.

Das entstandene Wasserstoffperoxid ist im Vergleich zum Superoxid membrangängig und kann daher den Entstehungsort verlassen (Dreher und Junod, 1995; Halliwell und Gutteridge, 1986). Aufgrund dieser Fluidität und der höheren Reaktivität von Wasserstoffperoxid haben sich in der Zelle mehrere Mechanismen zum Abbau entwickelt. Unter diesen hat der Abbau durch Katalasen den Vorteil, keine zusätzliche Energie in Form von Reduktionsäquivalenten zu benötigen. Die Expression der Katalasen wird zudem durch die ROS-Menge reguliert. Ein Anstieg der ROS-Menge führt zu Induktion der Expression und somit zu einer erhöhten Aktivität der Katalasen (Belazzi *et al.*, 1991; Kodykova *et al.*, 2014; Meilhac *et al.*, 2000). Weitere Enzyme, die Wasserstoffperoxid abbauen, sind u. a. die Peroxidasen und die Peroxiredoxine (Abbildung 4).

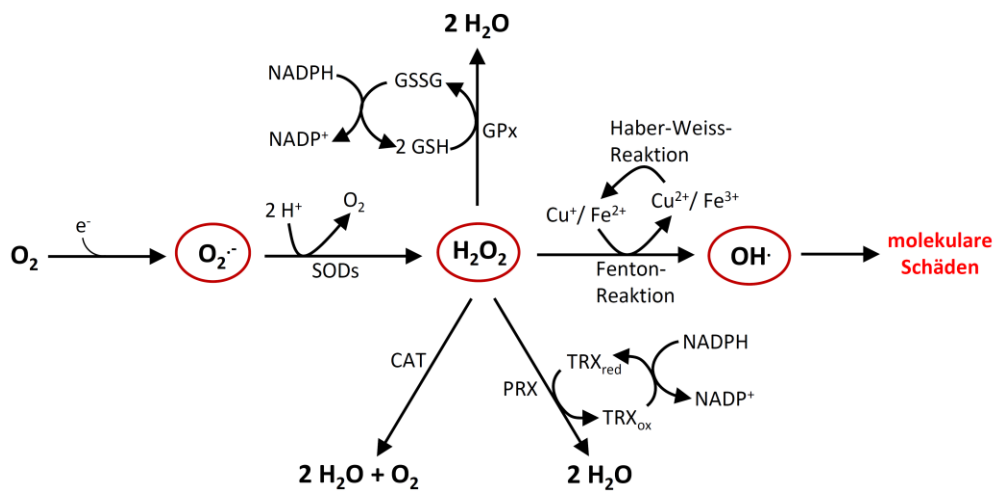


Abbildung 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies. Durch Fehlübertragungen von Elektronen (e^-) auf Sauerstoff (O_2) entsteht das primäre ROS Superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Dies kann nur durch Superoxid-Dismutasen (SODs) abgebaut werden. In dieser Reaktion entsteht Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches über verschiedene Reaktionswege zu unschädlichem Wasser (H_2O) abgebaut wird. Einer dieser Wege ist die Disproportionierung zu H_2O und O_2 durch Katalasen (CAT). Im Vergleich zu den weiteren Abbauwegen benötigt dieser keine zusätzlichen Reduktionsmittel oder Reduktionsäquivalente. Der Abbau von H_2O_2 zu H_2O durch Peroxiredoxin (PRX) oder Glutathion-Peroxidasen (GPx) benötigt zusätzliche Reduktionsmittel, wie Thioredoxin (TRX) oder Glutathion (GSH). Diese werden zur Regeneration von PRX oder GPx oxidiert und anschließend durch Verbrauch von Reduktionsäquivalenten selbst regeneriert. Jedoch kann neben dem unschädlichen H_2O auch das hoch reaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) durch die Reaktion mit Metallionen in der Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion entstehen (Fenton, 1984; Haber und Weiss, 1932). Abbildung modifiziert nach Wiemer *et al.* (2016).

Aus Wasserstoffperoxid kann in Verbindung mit reduziertem Eisen oder Kupfer durch die Fenton-Reaktion das hoch reaktive Hydroxylradikal entstehen (Farr und Kogoma, 1991; Fenton, 1984). Für dieses Radikal sind in den Zellen keine detoxifizierenden Enzyme vorhanden, weshalb es die größte Toxizität unter den ROS aufweist (Keyer *et al.*, 1995). Daher ist eine gute Regulation der anderen Mechanismen von großer Bedeutung um ROS-bedingte Schäden, besonders in den Mitochondrien, zu verhindern.

Veränderungen während des Alterns

Mitochondrien spielen, wie bereits erwähnt, eine zentrale Rolle im Alterungsprozess. Daher ist ein gesundes Mitochondrien-Netzwerk ausschlaggebend für einen „gesunden“ Alterungsprozess (Palikaras *et al.*, 2015). Angenommen wird diese Schlüsselrolle schon seit Denham Harman zu Beginn der 1970er Jahre seine „Freie Radikaltheorie des Alterns“ aus den 1950er Jahren (engl. „free radical theory of aging“; kurz; FRTA) zur „mitochondrialen freien Radikaltheorie des Alterns“ (engl. „mitochondrial free radical theory of aging“; kurz: MFRTA) erweitert hat (Harman, 1956, 1972).

Die „freie Radikaltheorie des Alterns“ (FRTA) (Harman, 1956) beschreibt erstmals einen Zusammenhang zwischen ROS-bedingten Schäden und dem Alterungsprozess. Da die Mitochondrien als Hauptentstehungsort von ROS gelten, erweiterte Denham Harman seine Theorie zur mitochondrialen freien Radikaltheorie des Alterns (MFRTA) (Harman, 1972). Die Hauptaussage dieser Theorie ist, dass die durch mitochondriale ROS geschädigten Moleküle die Ursache mitochondrialer Dysfunktion und somit des Alterungsprozesses sind (Colman *et al.*, 2014; Finkel und Holbrook, 2000; Hughes und Gottschling, 2012; Ocampo *et al.*, 2012; Trifunovic *et al.*, 2004).

Der aus dieser Theorie hervorgehende Zusammenhang zwischen ROS, molekularen Schäden, Fehlfunktion der Mitochondrien und dem Altern wurde bis heute durch eine Vielzahl von Studien bestätigt (Finkel und Holbrook, 2000; Navarro und Boveris, 2007).

Die Bildung von ROS und die dadurch entstehenden Schäden bilden einen *circulus vitiosus* (Latein für Teufelskreis). Wie bereits erwähnt, wird die mtDNA und mitochondriale Proteine, besonders solche der Atmungskette, durch ROS geschädigt. Diese Schäden führen zu einer Fehlfunktion der Mitochondrien, ein bereits erwähntes Merkmal des Alterns (Gomes und Scorrano, 2011). Aufgrund dieser Fehlfunktion kommt es zu einer gesteigerten ROS-Bildung, welche wiederum zu einer vermehrten Bildung von ROS-bedingten Schäden führt. So kommt es während des Alterungsprozesses in verschiedenen Tiermodellen und dem Menschen zu einer Verringerung der Kopienzahl der mtDNA und zu einer Anhäufung von mtDNA-Schäden in Form von Punktmutationen und Deletionen ganzer Bereiche (Corral-Debrinski *et al.*, 1992; Cortopassi und Arnheim, 1990; Fayet *et al.*, 2002; Piko *et al.*, 1988; Richter, 1995; Stocco *et al.*, 1977; Wallace, 2001). Durch die Schäden kommt es darüber hinaus zu einer Abnahme der Atmungsrate im Alter (Kumaran *et al.*, 2005; Lenaz, 1998; Ojaimi *et al.*, 1999; Yen *et al.*, 1989). So nimmt die Kapazität der Atmungskette in Leber- und Milz-Mitochondrien aus 24 Monate alten Ratten um 40 % im Vergleich zu Mitochondrien aus drei Monate alten Tieren ab (Stocco *et al.*, 1977). Eine ähnliche Abnahme wurde auch in humanen Leber-, Herz- und Skelettmuskel-Mitochondrien gefunden (Ojaimi *et al.*, 1999; Short *et al.*, 2005). Ergänzend zeigen verschiedene Studien, dass die Aktivität von Komplex I und IV der Atmungskette mit dem Alter in Lunge, Herz, Gehirn und Niere von Mäusen und Ratten abnimmt (Benzi *et al.*, 1992; Lenaz *et al.*, 1997; Manczak *et al.*, 2005). Resultierend kommt es im Laufe der Alterung zu einer

Abnahme des mtMPs, wie es in Leberzellen von Ratten und in menschlichen Haut-Fibroblasten gezeigt wurde (Greco *et al.*, 2003; Hagen *et al.*, 1997). Diese Abnahme wurde auch im Laufe des Alterungsprozesses von *P. anserina* beobachtet (Koll *et al.*, 2001). Weiterhin resultieren diese Abnahmen in einer verringerten ATP-Synthese (Ojaimi *et al.*, 1999; Preston *et al.*, 2008; Sastre *et al.*, 1996). Die beschriebenen Veränderungen der Atmungskette sind teilweise auf eine Reduktion der mtRSCs zurückzuführen (Frenzel *et al.*, 2010; Gomez *et al.*, 2009).

Neben der Abnahme der Atmungsrate nimmt auch die Effizienz der mitochondrialen Qualitätskontrolle ab, wodurch die Vorbeugung und die Reparatur von ROS-bedingten Schäden beeinträchtigt werden (López-Otín *et al.*, 2013). Beispielsweise nimmt die Aktivität der mitochondrialen Proteasen LON und CLPP, die Teil der mitochondrialen Qualitätskontrolle sind, im Alter ab (Bakala *et al.*, 2003; Bota und Davies, 2002; Hansen *et al.*, 2008).

Neben diesen beschriebenen Veränderungen innerhalb der Mitochondrien kommt es während der Alterung zu einer Abnahme der Mitochondrien-Menge (Herbener, 1976; Stocco und Hutson, 1978; Tauchi und Sato, 1968) und zu strukturellen Veränderungen der Mitochondrien (Shigenaga *et al.*, 1994). Die strukturellen Veränderungen beginnen mit einer offensichtlichen Veränderung der Mitochondrien-Morphologie aufgrund einer veränderten mitochondrialen Dynamik (Abbildung 5). So werden aus filamentösen, funktionellen Mitochondrien im Verlauf des Alterungsprozesses fragmentierte, geschädigte Mitochondrien. Dies geschieht durch eine Verschiebung des Fissions-Fusions-Verhältnisses hin zur Fission von Mitochondrien (Crane *et al.*, 2010; McQuibban *et al.*, 2006; Scheckhuber *et al.*, 2007; Young *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2014). Einhergehend mit den morphologischen Änderungen verändert sich die Ultrastruktur der Mitochondrien. Es kommt zu einer Restrukturierung und einem Verlust der Cristae. In Mitochondrien aus Nagern, *Drosophila melanogaster*, *P. anserina* und humanen Zelllinien nimmt die Zahl der Cristae mit dem Alter ab, bis hin zum vollständigen Verlust (Beregi *et al.*, 1988; Brandt *et al.*, 2017; Daum *et al.*, 2013; Delay, 1963; Jendrach *et al.*, 2005; Vanneste und van den Bosch de Aguilar, 1981). Diese Restrukturierung führt in *D. melanogaster* und Mäusen zu einer verringerten Atmungsrate (Brandt *et al.*, 2017).

Die fragmentierten, geschädigten Mitochondrien werden durch Auto- oder Mitophagie abgebaut und dadurch entstehende Abbauprodukte für die Synthese von z. B. Mitochondrien verwendet. Diese Vorgänge dienen der Aufrechterhaltung einer gesunden Mitochondrien-Population (Palikaras *et al.*, 2015).

Als Autophagie wird ein zellulärer katabolischer Prozess beschrieben, durch den zytoplasmatische Bestandteile oder ganze Organellen lysosomal (in Säugern) oder vakuolär (in Pflanzen oder Pilzen) abgebaut werden (Esclatine *et al.*, 2009; Klionsky, 2005; Klionsky *et al.*, 2011). Der Begriff Autophagie wurde in den frühen 1960er Jahren durch den Biochemiker Christian de Duve geprägt und leitet sich von den griechischen Wörtern αὐτός/autos (= selbst) und φάγω/phago (= essen) ab (de Duve, 1983; Klionsky, 2008). Durch diesen Abbau entstehen Abbauprodukte, die zur Verwertung der Zelle zur Verfügung gestellt werden (Gamerding *et al.*,

2009; Mizushima, 2007). Der generelle Abbau zytoplasmatischer Bestandteile wird als nicht-selektive Autophagie und der Abbau ganzer Organellen als selektive Autophagie bezeichnet (Youle und Narendra, 2011). So wird der spezifische Abbau von Mitochondrien als Mitophagie bezeichnet (Kanki *et al.*, 2009; Kissova *et al.*, 2004; Okamoto *et al.*, 2009). Für die Aufklärung der Autophagie wurde dem japanischen Wissenschaftler Yoshinori Ōsumi 2016 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen.

Wie andere Reaktionswege innerhalb der Zelle, werden auch die Abbau-Wege über Auto- und Mitophagie im Alter geschädigt, wodurch Schäden sich weiter anhäufen können (Madeo *et al.*, 2015; Rubinsztein *et al.*, 2011).

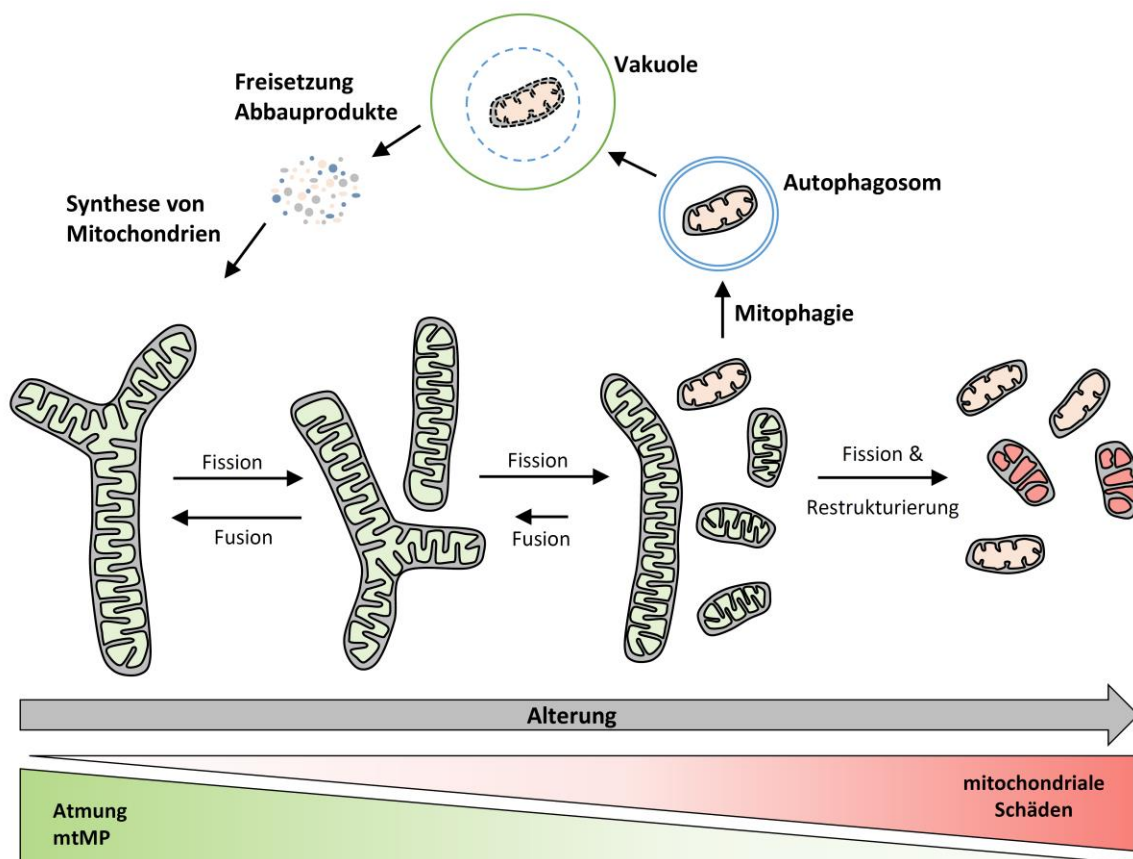


Abbildung 5: Altersabhängige Veränderung der Mitochondrien-Dynamik,-Morphologie und-Ultrastruktur. Während der Alterung verändert sich die Mitochondrien-Morphologie bedingt durch eine Verschiebung des Verhältnisses der mitochondrialen Dynamik. Das Verhältnis von Fusion und Fission verschiebt sich zu Gunsten der Fission. Daraus resultiert eine Fragmentierung des filamentösen Mitochondrien-Netzwerks. Einhergehend nimmt die Schädigung der Mitochondrien zu und die Atmung und das mitochondriale Membranpotential (mtMP) ab. Zusätzlich kommt es zu einer Restrukturierung der inneren Mitochondrienmembran, was zu einem Verlust der Cristae führt. All diese Veränderungen führen im Laufe der Alterung zu einer Schädigung der Mitochondrien. Geschädigte Mitochondrien können selektiv über Mitophagie abgebaut werden, um die Alterung zu verzögern. Entstehende Abbauprodukte werden von der Zelle verwertet und z. B. für die Synthese von Mitochondrien verwendet. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2016).

1.3 Mitochondrien und Krankheiten bei Menschen

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, sind Mitochondrien an vielen essentiellen zellulären Prozessen beteiligt. Daher haben mitochondriale Dysfunktionen schwerwiegende Auswirkungen auf den Organismus und spielen neben dem Altern auch eine Rolle in der Entstehung diverser Krankheiten (Calvo und Mootha, 2010; Chan, 2006; DiMauro und Schon, 2008). Darüber hinaus nehmen diese Mitochondrien-assoziierten Krankheiten altersabhängig in ihrer Häufigkeit zu (Niccoli und Partridge, 2012; Wallace, 2005).

Den ersten Beschreibungen von einer aeroben Glykolyse in Tumoren in den 1920er Jahren („Warburg-Effekt“) (Warburg *et al.*, 1927) und einer morphologischen Veränderung der Mitochondrien bei Patienten in den 1950er Jahren (Ernster *et al.*, 1959) folgten in den 1980er Jahren die ersten Befunde, dass Punktmutationen in der mtDNA (Wallace *et al.*, 1988) sowie Deletionen ganzer Bereiche der mtDNA (Holt *et al.*, 1988) zu Krankheiten führen. Danach wurden immer mehr vererbte und erworbene Erkrankungen gefunden, welche auf Mutationen in der mtDNA sowie in den autosomalen mitochondrialen Genen im Zellkern zurückzuführen sind. Bis heute sind ca. 150 mitochondriale Syndrome bekannt (DiMauro und Schon, 2003; Vafai und Mootha, 2012). Wissenschaftler vermuten, dass sich unter 4300 Menschen 1 Mensch mit einer Mitochondrien-assoziierten Krankheit befindet (Gorman *et al.*, 2015).

Zu diesen Krankheiten gehören neben neurodegenerativen Erkrankungen (Lin und Beal, 2006) metabolische und muskuläre Erkrankungen (McInnes, 2013), sowie die meisten der 200 bekannten Krebsarten (Finkel *et al.*, 2007; Hanahan und Weinberg, 2011). Dabei sind durch die Mutationen nicht nur die Atmungskette, sondern auch der TCA-Zyklus, die mitochondriale Dynamik, verschiedene mitochondriale Proteasen und der Eisenstoffwechsel beeinflusst (Gaude und Frezza, 2014). Unter den Mitochondrien-assoziierten Krankheiten sind die wohl bekanntesten Erkrankungen Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und die „Amyotrophe Lateralsklerose“ (Lin und Beal, 2006). Weitere, auf eine Fehlfunktion der Atmungskette zurückzuführenden, neurodegenerative Krankheiten sind z. B. die „Lebersche Optikusatrophie“ und das Leigh-Syndrom. Erstere ist eine neurodegenerative Erkrankung des Sehnervs, die auf einer Punktmutation in einem für einen Teil des Komplex I kodierenden Gens beruht. Wohingegen das Leigh-Syndrom, eine Störung des Energiestoffwechsels, auf Mutationen in der Atmungskette (Komplex IV) und im TCA-Zyklus (Pyruvat-Dehydrogenase) beruht. Eine weitere degenerative Erkrankung des Nervensystems ist die Friedreich-Ataxie, die auf einer Mutation des Gens für das am Eisentransport beteiligte mitochondriale Protein Frataxin beruht (Campuzano *et al.*, 1996). Eine Erkrankung, die eine mitochondriale Protease betrifft, ist das Perrault-Syndrom. Hierbei ist das Gen für die Protease CLPP mutiert (Ahmed *et al.*, 2015; Jenkinson *et al.*, 2013). Neben all diesen Ursachen innerhalb der

Mitochondrien beruht das Charcot-Marie-Tooth-Syndrom, eine neuromuskuläre Erkrankung, auf einer veränderten mitochondrialen Dynamik (Amiott *et al.*, 2008; Cartoni *et al.*, 2010).

Krebs ist eine heterogene Erkrankung und trotzdem haben viele der bekannten Krebsarten eine Gemeinsamkeit, nämlich eine mitochondriale Ursache (Hanahan und Weinberg, 2011). So stehen z. B. Blasenkrebs, Dickdarmkrebs, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Brustkrebs oder auch Prostatakrebs in Verbindung mit einer veränderten Atmungskette. Oder aber, wie das Glioblastom oder Leukämie, auf Veränderungen im TCA-Zyklus (Gaude und Frezza, 2014).

Aufgrund dieser mitochondrialen Ätiologie vieler Krankheiten, insbesondere Krebs, stellt sich eine gezielte Behandlung des mitochondrialen Metabolismus nicht nur in Krebszellen in der heutigen Zeit als vielversprechender Therapieansatz dar (Bhat *et al.*, 2015; Gaude und Frezza, 2014; Suliman und Piantadosi, 2016; Weinberg und Chandel, 2015). Gleichermaßen wird der mitochondriale Metabolismus auch als Ansatzpunkt für „anti-Aging“-Behandlungen verwendet (López-Otín *et al.*, 2013; Reddy und Reddy, 2011).

Mit dem Begriff „anti-Aging“, oder im deutschen altershemmend, werden Maßnahmen beschrieben, die darauf ausgerichtet sind das Altern von Organismen zu verlangsamen. Verwendung findet dieser Begriff nicht nur in der Medizin, sondern auch in der Ernährungswissenschaft, der Nahrungsmittelindustrie und in der Kosmetikindustrie.

1.4 Modulation der Mitochondrienfunktion als Therapieansatz

1.4.1 Genetische Interventionen

Die Bedeutung der genannten Wege wurde durch das Studium an Mutanten validiert. Mit der sogenannten Gen-Therapie, dem Einbringen von bestimmten Genen in einen Organismus, sollten die Defekte ausgeglichen werden. Erste Hinweise, dass Gen-Therapien von Nutzen sind, lieferten Experimente an Pflanzen Ende der 1960er Jahre. Diese Untersuchungen zeigten die Wirksamkeit von horizontalem Gen-Transfer (Rogers und Pfuderer, 1968; Selkirk, 2004).

Horizontaler Gen-Transfer oder auch lateraler Gen-Transfer ist ein biotechnologisches Verfahren, bei dem Gene über Artgrenzen hinweg und unabhängig von geschlechtlicher Fortpflanzung von einem zum anderen Individuum übertragen werden. Ein Beispiel für das natürliche Vorkommen von horizontalem Gen-Transfer ist die Konjugation bei Bakterien. Dabei wird genetisches Material von einem Bakterium auf ein anderes Bakterium übertragen. Im Gegensatz wird der Gen-Transfer von Vorfahre zu Nachkommen als vertikaler Gen-Transfer beschrieben.

Darüber hinaus sind eine Vielzahl an Möglichkeiten für Gen-Therapien an komplexen Modellorganismen, wie der Maus, getestet worden (zusammengefasst in: Peralta *et al.* (2015)). Hierbei wurden Gene z. B. durch Adeno-assoziierten Viren in mutierte Mäuse eingebracht, um deren Defekte auszugleichen, deren Lebensspanne wiederherzustellen oder sogar zu verlängern. Erfolgreich wurde diese Methode z. B. an Mäusen mit einem defekten mitochondrialen Adenin-Nukleotid-Translokator (ANT), der essentiell für den Austausch von zytosolischem ADP und mitochondrialen ATP ist, durchgeführt (Flierl *et al.*, 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass verschiedene Mausmodelle mit Komplex I-Mangel durch diese Methode die Funktion der Atmungskette wiederhergestellt und die Lebensspanne verlängert wird (Bouaita *et al.*, 2012; Quintana *et al.*, 2012). Darüber hinaus wurde das Einbringen von Genen durch Adenoviren auch erfolgreich an Mäusen, die als Modell für verschiedene Krankheiten dienen, durchgeführt. So wurden in dem Mausmodell für die Friedreich-Ataxie durch das Einbringen des Gens für das humane Frataxin die Beeinträchtigungen wiederhergestellt (Perdomini *et al.*, 2014). Möglich ist auch Organismus-fremde Gene einzubringen, um die Lebensspanne zu beeinflussen. So kann in Mäusen ein Defekt in Komplex III und IV der Atmungskette umgangen werden, indem die pflanzliche alternative Oxidase (AOX) exprimiert wird (El-Khoury *et al.*, 2013; El-Khoury *et al.*, 2014). Dies wurde zuvor schon in *D. melanogaster* und humanen Zelllinien gezeigt (Fernandez-Ayala *et al.*, 2009; Kakizaki *et al.*, 2010).

Die erste klinische Studie zur Verwendung von Gen-Therapien bei Herzkrankgefäß-Erkrankungen von Menschen wurde Mitte der 1990er Jahre unter Verwendung des Gens für einen Wachstumsfaktor durchgeführt (Baumgartner *et al.*, 1998; Baumgartner *et al.*, 2000; Isner *et al.*, 1998; Isner *et al.*, 1996). Diese und auch andere Studien zeigten, dass Gen-Therapien theoretisch möglich sind. Jedoch kam es bei zahlreichen Untersuchungen zu unerwünschten Nebeneffekten, den sogenannten „Off-Target“-Effekten. Diese Effekte führten u. a. zur Bildung von Tumoren. Darüber hinaus ist gerade die Adenoviren-vermittelte Methode nicht allgemein einsetzbar, da nicht jede Zelle von ihnen infiziert werden kann. Zusammen mit diesen Gründen und den ethischen Richtlinien sind Gen-Therapien am Menschen nicht praktikabel und auch eine Akkreditierung sehr schwer bis unmöglich.

1.4.2 Interventionen durch die Applikation von Naturstoffen

Ein anderer Therapieansatz, als der beschriebene genetische, ist die sogenannte metabolische Intervention. Dabei wird der Stoffwechsel der Mitochondrien z. B. durch sportliche Aktivitäten, Kalorien-Restriktion oder Nahrungsergänzungen beeinflusst. Diese Beeinflussungen verlangsamen

den Alterungsprozess und den Verlauf verschiedener Krankheiten (Bach-Faig *et al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2010; López-Otín *et al.*, 2016; Madeo *et al.*, 2015).

Die Wirkung von Pflanzen bzw. pflanzlichen Extrakten ist schon seit Jahrhunderten aus der traditionellen indischen und chinesischen Medizin bekannt. Heute weiß man, dass die Wirkung auf die einzelnen Bestandteile, die sogenannten Naturstoffe, zurückzuführen ist. Naturstoffe stellen eine große Substanzfamilie mit breitem biologischen Aktivitäts-Spektrum dar. Gewonnen werden die Naturstoffe hauptsächlich aus Pflanzen. Aber auch aus Bakterien, Pilzen und marinen Quellen werden verschiedenste Naturstoffe isoliert. Ende des 19. Jahrhunderts gliederte der Physiologe und spätere Nobelpreisträger Albrecht Kossel die Naturstoffe in primäre und sekundäre Stoffe (Kossel, 1981). Als primäre Stoffe zählte er für das Wachstum und die Entwicklung eines Organismus essentielle Naturstoffe. Diese gehen zu meist aus dem Primärmetabolismus hervor und bilden die Grundstruktur eines Organismus, wie z. B. Nukleinsäuren, Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Fette. Zu den sekundären Stoffen zählte er dagegen die aus dem Sekundärmetabolismus hervorgehenden nicht essentiellen Stoffe, welche daher auch als Sekundärmetabolite bezeichnet werden, wie z. B. Pheromone, Alkaloide, Phenole, und Steroide.

Sekundärmetabolite sind chemische Stoffe, die unter normalen Wachstums-Bedingungen nicht für das Überleben essentiell sind. Deren Grundbausteine im Sekundärstoffwechsel entstehen, besonders durch den Pentose-Phosphat-Weg, den Shikimat-Weg und den Phenylpropanoid-Weg (Ryan *et al.*, 1999). Zu ihnen zählen z. B. Pheromone, Alkaloide, Terpene und Steroide. Diese Stoffe beeinflussen u. a. den Geschmack, den Geruch und die Farbe von Pflanzen. Darüber hinaus sind sie für die Modulation von biochemischen Reaktions- und Signaltransduktions-Wegen verantwortlich und sorgen für den Schutz vor Fressfeinden und Konkurrenten. Zusätzlich signalisieren sie den physiologischen Status des Organismus und koordinieren die Sporulation und die sexuelle Entwicklung (Calvo *et al.*, 2002; Emri *et al.*, 2015; Rodríguez-Urra *et al.*, 2012). Im Alltag nutzt man sie aufgrund ihrer biologischen Wirkungen unter anderem als Antibiotika, Insektizide, Fungizide und Herbizide.

Diese Einteilung ist mittlerweile überholt, wird aber historisch bedingt immer noch in der Literatur verwendet. Heutzutage ist bekannt, dass ein Naturstoff sowohl lebenserhaltende Funktionen als auch Funktionen eines klassischen Sekundärmetabolites aufweisen kann.

Chemische und pharmakologische Analysen der Naturstoffe führten schon im 19. Jahrhundert zur Entdeckung bis heute verwendeter Arzneimittel/Wirkstoffe natürlichen Ursprungs (Abbildung 6). Zu diesen gehört z. B. der Antimalaria-Wirkstoff Chinin. Er wurde bereits Anfang des 19. Jahrhunderts von den Chemikern Pelletier und Caventou aus der Rinde des Chinabaums (*Chinchona pubescens*) isoliert und dient bis heute als Ausgangspunkt für die Entwicklung von Malaria-Therapeutika (Achan *et al.*, 2011). Auch das heute noch immer verwendete Opiat Morphin, früher Morphinum genannt, ist bereits seit Anfang des 19. Jahrhunderts bekannt. Der deutsche Friedrich Stürmer isolierte es 1804 das erste Mal aus Opium, dem getrockneten Milchsafte des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) (Balunas und Kinghorn, 2005; Clardy und Walsh, 2004; Huxtable und Schwarz, 2001).

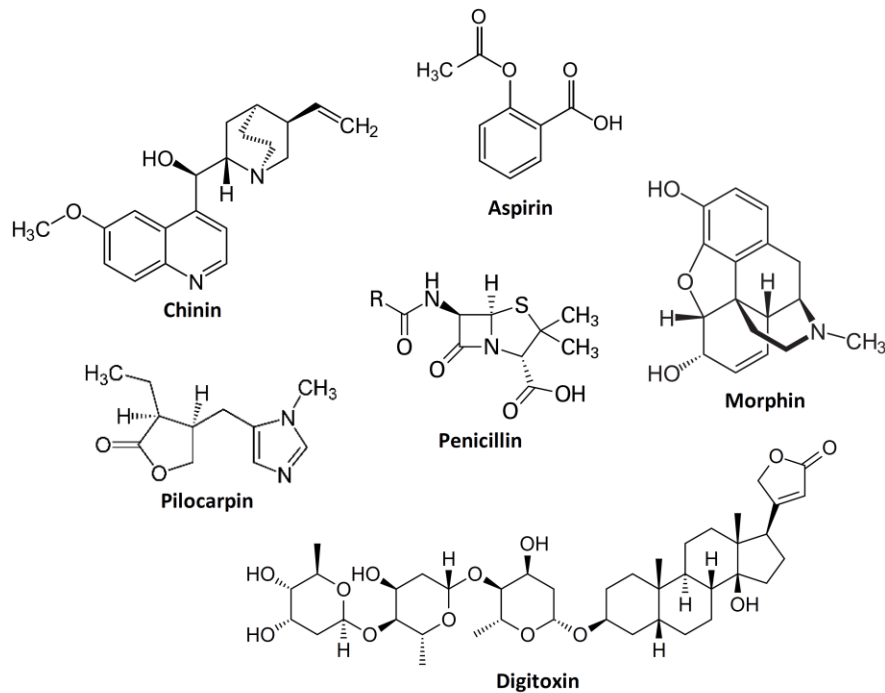


Abbildung 6: Strukturformeln der wohl bekanntesten Arzneimittel abgeleitet von Naturstoffen. Von den sechs abgebildeten Arzneimitteln sind bis auf das Penicillin alle Stoffe pflanzliche Stoffe oder von einem pflanzlichen Stoff abgeleitet. Diese Wirkstoffe wurden bereits im 19. Jahrhundert beschrieben und werden noch heute in der Medizin zur Behandlung von Krankheiten verwendet.

Weitere Wirkstoffe, die seit dem Ende des 19. Jahrhunderts bekannt sind und noch heute verwendet werden, sind die Wirkstoffe Digitoxin und Pilocarpin. Digitoxin wird noch immer aus Blättern des roten Fingerhuts (*Digitalis purpurea*) isoliert und zur Behandlung von Herzrhythmusstörungen eingesetzt (Diefenbach und Meneely, 1949). Pilocarpin ist ein Miotikum und wird in der Augenheilkunde zur Verengung der Pupillen verwendet. Es kommt natürlich in Jaborandiblättern (Rutakraut, *Pilocarpus jaborandi*) vor und wurde 1875 zum ersten Mal isoliert (Taylor und al-Hashimi, 1996). Zu den bekanntesten natürlichen Wirkstoffen bzw. von Naturstoffen abgeleiteten Wirkstoffen, die bereits seit gut 200 Jahren bekannt sind, gehört die Acetylsalicylsäure, eher bekannt als Aspirin, und das Antibiotikum Penicillin. Aspirin ist ein synthetischer Wirkstoff, der sich von der Struktur des Salicins aus der Weidenrinde ableitet und seit Ende des 19. Jahrhunderts synthetisiert und verkauft wird. Seit den 1970er Jahren steht es auf der Liste der unentbehrlichsten Arzneimittel der Weltgesundheitsorganisation (WHO „Model List of Essential Medicines“) (Sneader, 2000). Im Vergleich zu den bisher beschriebenen pflanzlichen Wirkstoffen ist Penicillin ein pilzlicher Wirkstoff. Er stammt aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* und wurde von Alexander Fleming aufgrund seiner wachstumshemmenden Eigenschaften gegenüber Bakterien gefunden (Fleming, 1929).

Bis heute sind Naturstoffe aus der Arzneimittel-Forschung nicht wegzudenken und dienen immer häufiger als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe. Der Anteil von Naturstoffen oder von ihnen abgeleiteten Wirkstoffen nimmt unter den neu zugelassenen Arzneimitteln stetig zu. Zwischen 1998 und 2013 wurden gut 60 solcher Arzneimittel auf dem europäischen, US-amerikanischen und japanischen Markt zugelassen (Butler, 2005, 2008; Butler *et al.*, 2014). Diese Wirkstoffe sind Bestandteile von Medikamenten zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen, wie z. B. Malaria, Morbus Alzheimer, Krebs, Multiple Sklerose oder Diabetis. Neben den bereits zugelassenen Wirkstoffen befanden sich in den Jahren 2008-2013 ca. 100 verschiedene Naturstoffe oder von Naturstoffen abgeleitete Wirkstoffe in klinischen Studien für die Behandlung unterschiedlicher Krankheiten (Butler *et al.*, 2014).

Der größte Teil der Naturstoffe aus Pflanzen gewonnen. Bis heute sind über 200000 Pflanzenstoffe bekannt, die abhängig ihrer chemischen Eigenschaften in mehrere Gruppen gegliedert werden (Brahmachari, 2009). Unter diesen bildet die Gruppe der phenolischen Verbindungen die größte. Es sind mehr als 8000 verschiedene Polyphenole bekannt (Bravo, 1998). Die Gruppe der Polyphenole lässt sich wiederum, je nach Struktur, in 10 Untergruppen unterteilen (Bravo, 1998; Harborne, 1986). Die wichtigste und größte Gruppe bildet dabei die Gruppe der Flavonoide (Bravo, 1998; Harborne, 1999), sie umfasst ca. 4000 bekannte Verbindungen (Harborne und Williams, 2000).

Phenolische Verbindungen bestehen aus einem aromatischen Ring (der Phenylgruppe; C₆H₅) und mindestens einer Hydroxyl-Gruppe (= Sauerstoff und Wasserstoff; OH). Zwei oder mehr dieser Phenole können zu sogenannten Polyphenolen verbunden werden. Aufgrund ihrer Eigenschaft ROS abzufangen und unschädlich zu machen, sind diese wichtig für den Schutz der Zelle. Daher zählen Polyphenole zu den Antioxidantien.

Polyphenole, besonders Flavonoide, sind aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in zahlreichen Obst- und Gemüsearten täglicher Bestandteil der Ernährung (Bravo, 1998). Arten mit sehr hohem Polyphenol-Gehalt sind z. B. Trauben, Granatapfel, Apfel und auch verschiedene Tee-Sorten. So enthalten Trauben und auch Äpfel ca. 200-300 mg Polyphenole pro 100 g Frischgewicht (Pandey und Rizvi, 2009). Über die Jahre wurden pleiotrope Wirkungen der Polyphenole gefunden (zusammengefasst in Abbildung 7). Es wurden neben anti-allergenen, entzündungshemmenden, anti-mikrobiellen auch anti-oxidative und „anti-Aging“-Wirkungen gefunden. Darüber hinaus wirken Polyphenole schützend auf Gefäße sowie das Herz und können Thrombose vorbeugen (Chung und Champagne, 2008; Singh *et al.*, 2010; Viswanath *et al.*, 2009). Zusätzlich wurden auch krebshemmende und neuroprotektive Effekte beschrieben (Queen und Tollefsbol, 2010; Scalbert *et al.*, 2005).

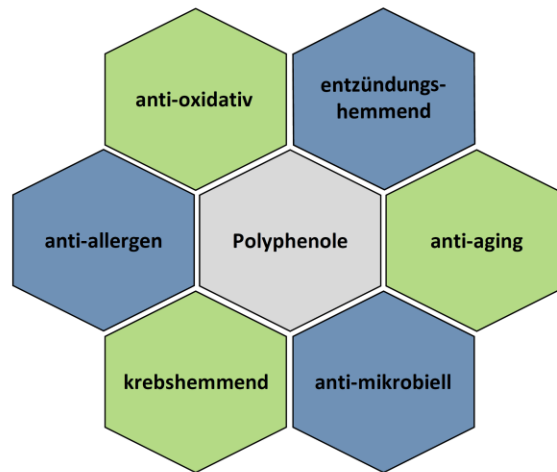


Abbildung 7: Bekannte Wirkungen von Polyphenolen. Darstellung der pleiotropen Wirkungen von Polyphenolen auf verschiedenen Organismen. Durch diese Effekte wirken sie schützend auf das Herz-Kreislauf- und das Nervensystem. Sie wirken vorbeugend auf Krankheiten wie z. B. Krebs, Diabetes, Thrombose und Asthma. Darüber hinaus verlangsamen einige Polyphenole den Alterungsprozess.

Eines der wohl meist untersuchtesten Polyphenole ist das Resveratrol, welches in mehr als 70 verschiedenen Pflanzenarten gefunden wurde (Knutson und Leeuwenburgh, 2008; Kundu und Surh, 2008). Unter anderem weist es „anti-Aging“-Eigenschaften auf und verlängert die Lebensspanne verschiedener Organismen (Howitz *et al.*, 2003; Wood *et al.*, 2004). Krebswachstum-hemmende Polyphenole lassen sich u. a. in Granatäpfeln finden. Diese wirken z. B. hemmend auf das Wachstum von Brustdrüsen-, Lungen-, Darm-, Prostata- und Hautkrebszellen (Lansky und Newman, 2007).

In den folgenden Kapiteln werden drei ausgewählte Polyphenole und ihre bereits bekannten Effekte genauer beschrieben. Jedoch sind die genauen zugrundeliegenden Wirkmechanismen bei allen drei Verbindungen nicht vollständig aufgeklärt.

Gossypol - Ein Polyphenol der Baumwollsamensamen

Ein seit vielen Jahren bekanntes Polyphenol ist das gelb-bräunliche Gossypol (Abbildung 8). Dies wurde bereits Ende des 19. Jahrhunderts aus Baumwollpflanzen (*Gossypium spec.*) während der Baumwollsamensamen-Öl Gewinnung isoliert (Longmore, 1986). Es existiert in (+)- und (-)-Enantiomeren (Freedman *et al.*, 2003). Diese zwei Enantiomere kommen in unterschiedlichen Verhältnissen in verschiedenen Organen der Pflanze vor. So tritt in den Samen der Baumwollpflanzen vermehrt (-)-Gossypol auf. Im Durchschnitt kommt dieses Enantiomer am häufigsten in den verschiedenen Baumwollarten vor (Cass *et al.*, 2004; Stipanovic *et al.*, 2006).

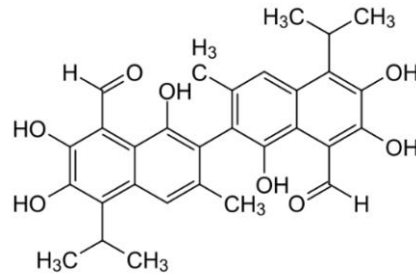


Abbildung 8: Strukturformel von Gossypol. Gossypol kommt natürlich in Baumwoll-Samen (*Gossypium*) in zwei Enantiomeren, dem (+)-Gossypol und dem (-)-Gossypol (AT101), vor. Verwendung findet dieses Polyphenol in der Forschung nach geeigneten Krebstherapien für z. B. die Behandlung von Gehirn-Tumoren (Glioblastom). Die Summenformel von Gossypol ist $C_{30}H_{30}O_8$ und der IUPAC-Name lautet 1,1',6,6',7,7'-Hexahydroxy-5,5'-diisopropyl-3,3'-dimethyl-2,2'-binaphthalin-8,8'-dicarbaldehyd.

Erste Hinweise auf eine pharmakologische Wirkung ergab sich bereits in den 1950er Jahren. Es wurde vermutet, dass die auffällige Unfruchtbarkeit vieler Dorfbewohner in China mit der Verwendung von Baumwollsamensamen-Öl zusammenhängt. Studien ergaben eine verringerte Spermienanzahl bei den männlichen Bewohnern (Liu, 1957). Diese Entdeckung war der Anstoß für die Forschung an der „Pille für den Mann“. Es folgten viele weitere Studien. In dem Rahmen wurde es auch als Verhütungsmittel für die Tierzucht erforscht und Untersuchungen der Wirkung an Ratten, Schweinen und Affen durchgeführt (Coutinho, 2002; Qian und Wang, 1984). In den 1980er Jahren wurden in China Studien mit 8000 Männern zur Wirksamkeit von Gossypol als Verhütungsmittel durchgeführt (Liu und Lyle, 1987; Liu *et al.*, 1987; Liu *et al.*, 1981). Nach dem Absetzen von Gossypol blieben jedoch 20 % der Testpersonen dauerhaft unfruchtbar, was zur Einstellung der Forschung von Gossypol als Verhütungsmittel führte (Coutinho, 2002; Meng *et al.*, 1988).

Weitere Forschungs-Aktivitäten ergaben in der Mitte der 1980er Jahre erste Befunde, dass Gossypol das Wachstum von Tumoren hemmt und somit ein wirksames Chemotherapeutikum ist (Tso, 1984; Tuszyński und Cossu, 1984). Einige Jahre später wurde eine anti-virale Aktivität von Gossypol gegen das „Humane Immundefizienz-Virus“ (HIV-1), das Herpes-simplex-Virus (HSV-2) sowie gegen das Polio-Virus und das Influenza-Virus gefunden (Lin *et al.*, 1989; Radloff *et al.*, 1986). Neben der anti-viralen Aktivität wurde auch eine anti-bakterielle Aktivität sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien, wie z. B. *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp. und *Shigella* spp., gefunden (Vadehre *et al.*, 1985). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Gossypol in Dickdarmkrebs-Zellen und Myelom-Zellen die Bildung von ROS steigert (Ko *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014).

Mittlerweile wurde die krebs- und wachstumshemmende Wirkung auf zahlreiche verschiedene Tumor-Zellen aus unterschiedlichen Geweben sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* gezeigt. Diese

Wirkungen sind stärker wenn (-)-Gossypol und nicht (+)-Gossypol oder ein Gemisch verwendet wird (Dodou *et al.*, 2005). Beispielsweise wirkt (-)-Gossypol auf Brust-Karzinome (Gilbert *et al.*, 1995; Jaroszewski *et al.*, 1990; Thomas *et al.*, 1991), Dickdarm-Karzinome (Wang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003), Leukämie-Zellen (Balci *et al.*, 1999; Jarvis *et al.*, 1994) und Glioblastom-Zellen (Coyle *et al.*, 1994). Je nach Zellhintergrund ist das Absterben der Tumore mit der Induktion von apoptotischem Zelltod (Antonietti *et al.*, 2016; Balakrishnan *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2006) oder aber autophagischem Zelltod (Lian *et al.*, 2011; Voss *et al.*, 2010) verbunden. Zudem wurde in verschiedenen Studien eine Verbindung zwischen der Gossypol-Wirkung und der Mitochondrienfunktion gezeigt. So wurde schon früh eine Wirkung auf die Atmungskette ähnlich der eines Entkopplers gefunden (Abou-Donia und Dieckert, 1976; Reyes und Benos, 1988).

Entkoppler (Protonophore) sind Stoffe, die das mitochondriale Membranpotential (Protonengradient) aufheben und so den Elektronentransport von der ATP-Generierung trennen („entkoppeln“). Es wird zwischen physiologischen und künstlichen (chemischen) Entkopplern unterschieden. Ein physiologischer Entkoppler ist Thermogenin, oder auch entkoppelndes Protein („uncoupling protein“ kurz UCP1) genannt, ein Transmembranprotein in den Mitochondrien des braunen Fettgewebes (Nicholls *et al.*, 1978). Zu den künstlichen Entkopplern zählen 2,4-Dinitrophenol, FCCP (Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon) und CCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon).

Außerdem führt Gossypol zu einem Verlust der mitochondrialen Cristae (Benz *et al.*, 1990) und zu einer Depolarisation und Fragmentierung der Mitochondrien (Voss *et al.*, 2010).

Der genaue zugrundeliegende Wirkmechanismus der durch Gossypol verursachten Effekte ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt und weiterhin Teil des aktuellen Forschungsgeschehens.

Curcumin - Ein Polyphenol der Gelbwurzel

Zu den Pflanzen, die schon in der traditionellen indischen und chinesischen Medizin verwendet wurden, zählt Kurkuma, auch Gelbwurzel oder gelber Ingwer (lat. *Curcuma longa*, Familie der Ingwergewächse (lat. *Zingiberaceae*) genannt. Die Pflanze und ihre positiven Eigenschaften wurden schon Ende des 13. Jahrhunderts im Reisebericht von Marco Polo erwähnt und von arabischen Kaufleuten nach Europa gebracht (Hatcher *et al.*, 2008). Als biologisch aktiver Bestandteil, welcher ursächlich für die positiven Eigenschaften ist, wurde das Polyphenol Curcumin beschrieben (Abbildung 9). Dieses ist verantwortlich für die typische gelbe Farbe und wurde das erste Mal 1815 von den Chemikern Vogel und Pelletier isoliert (Aggarwal *et al.*, 2007). Aufgrund der intensiven gelben Farbe wird es als Lebensmittelfarbstoff verwendet und ist seit den 1980er Jahren laut der

Zusatzstoff-Zulassungsverordnung in Deutschland als Zusatz für Lebensmittel (E100) zugelassen. Es wird z. B. zum Färben von Senf verwendet (Scotter, 2011; Unterhalt, 1980).

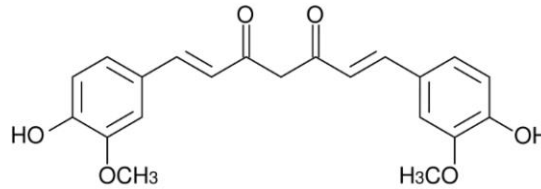


Abbildung 9: Strukturformel von Curcumin. Curcumin ist der gelbe Farbstoff aus der Gelbwurzel (Kurkuma, *Curcuma longa*). Dieses Polyphenol wird aufgrund der pleiotropen biologischen Eigenschaften sowohl in der Medikamenten-, als auch der „anti-Aging“-Forschung verwendet. Curcumin hat die Summenformel $C_{21}H_{20}O_6$ und nach der IUPAC Nomenklatur die Bezeichnung (1E,6E)-1,7-Bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-hepta-1,6-dien-3,5-dion.

Seit dem ersten wissenschaftlichen Artikel im Jahr 1937 zur Wirkung von Curcumin (Oppenheimer, 1937), sind bis heute pleiotrope biologische Effekte von Curcumin gefunden und veröffentlicht worden (Esatbeyoglu *et al.*, 2012). So sind neben entzündungshemmenden (Satoskar *et al.*, 1986; Srimal und Dhawan, 1973), krebshemmenden (Kuttan *et al.*, 1985), anti-oxidativen (Sharma, 1976; Toda *et al.*, 1985) und wundheilenden (Sidhu *et al.*, 1998) auch anti-mikrobielle (Negi *et al.*, 1999) Effekte bekannt. Darüber hinaus wurde ein „anti-Aging“-Effekt von Curcumin gefunden. In Kulturen gealterter Netzhautzellen steigert Curcumin die Zell-Viabilität, abhängig von der eingesetzten Dosis (Zhu *et al.*, 2015). Zudem verlängert Curcumin die Lebensspanne von *D. melanogaster* (Lee *et al.*, 2010; Salvioli *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2013a; Sikora *et al.*, 2010; Suckow und Suckow, 2006) und *C. elegans* (Lian *et al.*, 2011).

Der genaue Wirkmechanismus der Curcumin-vermittelten Lebensverlängerung ist nur teilweise aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass der „anti-Aging“-Effekt mit einem anti-oxidativen Effekt verbunden ist. Es wurde gezeigt, dass neben der Lebensverlängerung in *D. melanogaster* auch eine gesteigerte SOD-Aktivität durch Curcumin (Shen *et al.*, 2013a) bzw. eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Lee *et al.*, 2010) vermittelt wird. Weitere Studien deuten eine Verbindung zwischen dem Effekt von Curcumin und der Mitochondrienfunktion an. So zeigten Molina-Jijon und Kollegen, dass Curcumin vor den negativen Effekten von Kaliumdichromat auf die mitochondriale Atmung, das mtMP und auf die ATP-Synthese schützt (Molina-Jijon *et al.*, 2011). Dazu passend erhöht eine Curcumin-Behandlung die mitochondriale Atmung in Rattenherzen (Correa *et al.*, 2013). Eine weitere Studie zeigt eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs in „State 4“ und „State 3“ in Nieren von Mäusen nach Curcumin-Exposition (Martinez-Morua *et al.*, 2013).

Neben den verschiedenen biologischen Effekten zeigt Curcumin positive Eigenschaften auf verschiedene, teils altersbedingte Krankheiten. So wirkt eine Curcumin-Behandlung positiv auf neurogenerative Erkrankungen (zusammengefasst in: Monroy *et al.* (2013)). Zu diesen Krankheiten gehört z. B. die Huntington-Krankheit (Chongtham und Agrawal, 2016), Morbus Alzheimer (Lim *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010) und Morbus Parkinson (Zbarsky *et al.*, 2005). Außerdem wirkt Curcumin positiv bei kardiovaskulären Erkrankungen (Gonzalez-Salazar *et al.*, 2011) und verschiedenen Krebsarten (Bush *et al.*, 2001; Shureiqi und Baron, 2011).

Quercetin - Ein weit verbreitetes Flavonoid

Ein weiteres Polyphenol und Bestandteil unserer täglichen Nahrung ist Quercetin (Abbildung 10). Aufgrund der Struktur und chemischen Eigenschaften zählt Quercetin zur Untergruppe der Flavonoide. Es ist ubiquitär in Pflanzen verbreitet und daher das am meisten in der Natur vorkommende Flavonoid (Hertog *et al.*, 1992).

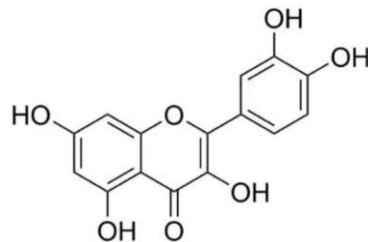


Abbildung 10: Strukturformel von Quercetin. Das Flavonoid Quercetin kommt ubiquitär in vielen Obst und Gemüse Arten vor. Es wird neben der „anti-Aging“-Forschung auch in der Forschung nach geeigneten Krebstherapien eingesetzt. Quercetin hat die Summenformel $C_{15}H_{10}O_7$ und die Bezeichnung nach IUPAC lautet 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-on.

Quercetin kommt in vielen pflanzlichen Lebensmitteln, wie z. B. Äpfeln, Brokkoli, Zwiebeln und Trauben, aber auch in Getränken, wie z. B. Tee, Wein und Fruchtsäfte, vor. Der Gehalt an Quercetin variiert zwischen den verschiedenen Lebensmitteln und Getränken deutlich und nimmt bei der Zubereitung oder Verarbeitung der Lebensmittel ab (vgl. Tabelle 1). Bedingt durch das ubiquitäre Vorkommen und den unterschiedlichen Gehalt liegt die tägliche Zufuhr an Quercetin bei normaler westlicher Ernährung bei bis zu 30 mg (Böhm *et al.*, 1998; Linseisen *et al.*, 1997).

Tabelle 1: Quercetiningehalt ausgewählter Lebensmittel und Getränke.

Die Daten wurden aus Bhagwat *et al.* (2014) entnommen.

| Lebensmittel/Getränke | Quercetiningehalt (in mg/100 g essbarer Anteil bzw mg/100 ml) |
|---------------------------|--|
| Apfel (ungeschält) | 0,0 - 12,0 |
| Apfel (geschält) | 0,0 - 2,0 |
| Apfelsaft | 0,0 - 3,0 |
| Brokkoli | 0,0 - 14,0 |
| Cranberries | 7,3 - 25,0 |
| Erdbeeren | 0,0 - 4,4 |
| Kakao | 1,0 - 5,5 |
| Kapern (roh) | 150,0 - 323,0 |
| Kopfsalat | 0,0 - 21,0 |
| Pflaume | 0,5 - 8,7 |
| Rotwein | 0,1 - 3,4 |
| Spargel | 0,1 - 29,0 |
| Tee (grün, zubereitet) | 0,1 - 4,1 |
| Tee (schwarz, zubereitet) | 0,9 - 4,8 |
| Trauben (rot) | 0,2 - 3,7 |
| Zwiebeln | 1,5 - 90,8 |

Nachdem Quercetin 1857 erstmals beschrieben wurde, stieg das wissenschaftliche Interesse aufgrund potentieller gesundheitsfördernder Wirkungen auf den menschlichen Körper. Bedingt durch krebs- und wuchshemmende Eigenschaften wird Quercetin u. a. in der Tumorforschung und der Suche nach geeigneten Therapien verwendet. So verringert eine Behandlung von Magenkrebs-Zellen mit Quercetin die Zell-Viabilität (Wang *et al.*, 2011). Darüber hinaus beeinflusst das Flavonoid das Wachstum von Blutkrebs-Zellen, Hautkrebs-Zellen sowie Gehirn- und Lungentumoren (Kim *et al.*, 2013; Sak, 2014). Außerdem zeigten Studien mit Quercetin eine entzündungshemmende Wirkung (Yoon *et al.*, 2012), sowie positive Einflüsse auf Erkrankungen wie Arthritis (Bae *et al.*, 2009), Asthma (Knekt *et al.*, 2002) und Diabetes (Jeong *et al.*, 2012).

Ferner wurden „anti-Aging“-Effekte von Quercetin gefunden. Durch eine Behandlung mit Quercetin verlängert sich die Lebensspanne von *S. cerevisiae* (Belinha *et al.*, 2007) und *C. elegans* (Grünz *et al.*, 2012; Kampkötter *et al.*, 2008; Pietsch *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2008; Surco-Laos *et al.*, 2011). Übereinstimmend wurde ein lebensverlängernder Effekt von Quercetin auch auf humane Zelllinien gefunden (Niklas *et al.*, 2012). Die Quercetin-vermittelte Lebensverlängerung wird in einigen Fällen mit einer anti-oxidativen Wirkung in Verbindung gebracht (Belinha *et al.*, 2007; Kampkötter *et al.*, 2008; Pietsch *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2008). Anti-oxidative Effekte sind auch für viele andere Flavonoide beschrieben (Bors *et al.*, 1994) und lassen sich auf die charakteristischen Catechol-Gruppen mit den Hydroxyl-Resten zurückführen (Heijnen *et al.*, 2002).

Trotz anti-oxidativer Eigenschaften zeigen Flavonoide auch pro-oxidative Eigenschaften. Diese spielen unter normalen Bedingungen, wenn die Zelle im Gleichgewicht ist, keine Rolle. Jedoch

kommt es unter gewissen Umständen, wie eine hohe Konzentration an freien Metallionen (Canada *et al.*, 1990; Croft, 1998; Decker, 1997) oder aber einer stark erhöhten Flavonoid-Konzentration (Wätjen *et al.*, 2005; Yen *et al.*, 2003), zu einer pro-oxidativen Wirkung. Außerdem begünstigt eine hohe Menge ROS in der Zelle die pro-oxidativen Eigenschaften. Entsprechend wurde ein pro-oxidativer Effekt von Quercetin in Ratten und Zellkulturen unter bestimmten Bedingungen gefunden (Laughton *et al.*, 1989; Metodiewa *et al.*, 1999; Robaszkiewicz *et al.*, 2007).

Unter normalen Bedingungen wirkt Quercetin in der Zelle allerdings anti-oxidativ und schützt die Zelle (Abbildung 11A). Dies kann auf zwei Wegen geschehen. Zum einen kann Quercetin direkt Superoxid abfangen, indem die Hydroxyl-Reste der Catechol-Gruppe mit Superoxid unter Bildung von Wasserstoffperoxid reagieren und Quercetin-Semichinon gebildet wird. Dies Semichinon kann in mehreren Schritten wieder zu Quercetin umgewandelt werden (Bors *et al.*, 1994; Rice-Evans *et al.*, 1996). In einer weiteren anti-oxidativen Reaktion kann Quercetin in zwei Schritten mit Superoxid und Metallionen, unter der Bildung von Wasserstoffperoxid und einem Quercetin-Metall-Komplex, reagieren. Durch diese Reaktion werden Metalle, wie Cu^{2+} und Fe^{3+} , chelatiert und so wird deren Reduktion in der Haber-Weiß-Reaktion und der anschließenden Bildung von Hydroxylradikalen durch die Fenton-Reaktion verhindert (Morel *et al.*, 1994; Perron und Brumaghim, 2009).

Liegen in der Zelle jedoch abnorme Bedingungen, wie eine hohe Menge Superoxid oder Metallionen, vor, wirkt Quercetin pro-oxidativ und somit zellschädigend (Abbildung 11B) (Metodiewa *et al.*, 1999; Robaszkiewicz *et al.*, 2007). Zunächst fängt Quercetin, wie bei der anti-oxidativen Wirkung, unter Bildung von Quercetin-Semichinon Superoxid ab. Diese Reaktion läuft aufgrund der erhöhten Superoxid-Menge verstärkt ab und das Quercetin-Semichinon häuft sich an. Außerdem reagiere die Hydroxyl-Reste mit Metallen (Cu^{2+} und Fe^{3+}), wodurch weiteres Quercetin-Semichinon gebildet wird. Die bei dieser Reaktion entstandenen reduzierten Metalle (Cu^+ und Fe^{2+}) begünstigen zusätzlich die Fenton-Reaktion (Brown *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 1997). Das so stark vermehrt vorliegende Quercetin-Semichinon wird nicht schnell genug zu Quercetin regeneriert, sodass es mit molekularem Sauerstoff unter Bildung von weiterem Superoxid und einem Quercetin-Chinon reagiert (Canada *et al.*, 1990). Das entstehende Superoxid kann wiederum mit Quercetin reagieren und die schädlichen Reaktionen weiter vorantreiben. So wird unter abnormen Bedingungen im Vergleich zu normalen Bedingungen die schädliche Fenton-Reaktion begünstigt.

2009; Shirasawa *et al.*, 1995; Tunbridge *et al.*, 2007), ist ein Zusammenhang mit den Quercetin-Effekten denkbar, jedoch bisher nicht experimentell belegt.

Neben den beschriebenen Effekten beeinflusst Quercetin die Mitochondrienfunktion. Ähnlich zu den oxidativen Effekten sind auch widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Mitochondrien ermittelt worden. So zeigen einige Studien eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung durch Quercetin (Dorta *et al.*, 2008; Dorta *et al.*, 2005; Ruiz *et al.*, 2015) und andere einen positiven Effekt (Karuppagounder *et al.*, 2013). Ob und wie die beschriebenen Effekte auf die Lebensspanne, die Mitochondrienfunktion und die ROS-Menge in einem Zusammenhang stehen, ist nur unzureichend bis gar nicht aufgeklärt und daher weiterhin im Interesse der Wissenschaft.

1.5 *Podospora anserina* als Modell für die Alterns- und Mitochondrien-Forschung

Für viele Fragestellungen in der Wissenschaft wird auf Untersuchungen an sogenannten Modellorganismen zurückgegriffen. Dies liegt nicht nur an der langen Generations- und Lebensdauer des Menschen, sondern auch an ethischen Richtlinien. Schon Gregor Mendel hat sich, im Rahmen seiner Untersuchungen zur Vererbbarkeit im Jahre 1866, Gedanken zu einem geeigneten Modellorganismus gemacht und die Erbsenpflanze verwendet. So wird noch heute anhand der phylogenetischen Position und der experimentellen Zugänglichkeit für das spezifische Forschungsinteresse ein geeigneter Organismus ausgewählt. Über die Jahre haben sich verschiedene komplexe Modellorganismen, wie die Maus (*Mus musculus*), die Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*) in Forscherkreisen etabliert (Müller und Grossniklaus, 2010). Darüber hinaus haben sich auch einfachere Modellorganismen wie die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Schlauchpilz *Podospora anserina* als geeignet herausgestellt, besonders in der Alternsforschung.

P. anserina zeichnet sich durch eine leichte Kultivierbarkeit und eine begrenzte Lebensspanne von ca. 25 Tagen aus (Rizet, 1953). Setzt die Seneszenz ein, verlangsamt sich die Wachstumsrate und es kommt zu einer verstärkten Pigmentierung, einer Hyperpigmentierung. Schlussendlich kommt das Wachstum völlig zum Erliegen und die Hyphenspitzen sterben ab (Esser und Tudzynski, 1980). Zusammengenommen werden diese Veränderungen als Seneszenz-Syndrom bezeichnet (Rizet, 1953). Die Arbeit mit *P. anserina* wird durch viele etablierte genetische und molekularbiologische Methoden (Osiewacz *et al.*, 2013) und ein vollständig sequenziertes und annotiertes Genom (Espagne *et al.*, 2008) erleichtert.

Im Gegensatz zur Hefe, der im Vergleich zum Menschen der Komplex I der Atmungskette fehlt (Grandier-Vazeille *et al.*, 2001), besitzt *P. anserina* wie der Mensch vier Atmungskettenkomplexe (Komplex I bis IV) sowie die F₀F₁-ATP-Synthase und eignet sich daher besser für Analysen der Mitochondrienfunktion und der Verbindung zum Alterungsprozess (Gredilla *et al.*, 2006). Darüber hinaus war *P. anserina* der erste Organismus, in dem eine Rolle der Mitochondrien in der Regulation des Alterungsprozesses gezeigt wurde (Marcou und Schecroun, 1959; Marcour, 1961). Weitere Analysen Ende der 1970er Jahre ergaben eine altersabhängige Reorganisation der mtDNA. Einhergehend wurde eine vermehrte Freisetzung einer zirkulären DNA beobachtet. Diese zirkuläre DNA ähnelt einem bakteriellen Plasmid und wird daher auch „plasmid-like“ DNA (kurz: pDNA) genannt (Cummings *et al.*, 1979; Stahl *et al.*, 1978). Die Sequenz der pDNA entspricht dem ersten Intron des *PaCox1*-Gens, welches für die erste Untereinheit des Atmungskettenkomplexes IV kodiert (Osiewacz und Esser, 1984). Diese Reorganisation resultiert in dem Verlust essentieller mitochondrialer Gene durch Deletionen innerhalb der mtDNA (Albert und Sellem, 2002; Belcour, 1981; Kück *et al.*, 1985). Weiterhin verändert sich im Laufe des Alterns die mitochondriale Dynamik, die Morphologie sowie die Ultrastruktur der Mitochondrien von *P. anserina* (Daum *et al.*, 2013; Delay, 1963; Scheckhuber *et al.*, 2007).

Die Verbindung zwischen Mitochondrienfunktion und Alterungsprozess wird bis heute durch verschiedene Studien, die einen Einfluss von Manipulationen des mitochondrialen Metabolismus von *P. anserina* auf die Lebensspanne und die Fitness zeigen, untermauert. Beispielsweise führen Deletionen der Atmungskettenkomplexe III und IV zu einer Verlängerung der Lebensspanne, durch eine Aktivierung der alternativen Oxidase (AOX) und einhergehender verringerter ROS-Bildung (Dufour *et al.*, 2000; Schulte *et al.*, 1988; Stumpferl *et al.*, 2004). Übereinstimmend führen andere Manipulationen an der Atmungskette oder auch der mitochondrialen Morphologie zu Veränderungen der Lebensspanne. So führt die Beeinflussung der mtRSC-Assemblierung durch die Deletion der Gene der Assemblierungsfaktoren (PaRCF1 und PaRCF2) zu einer Verkürzung der Lebensspanne (Filippis, 2013; Fischer *et al.*, 2015). Darüber hinaus führt die Deletion von *PaDnm1*, welches für einen Teil der Fissions-Maschinerie kodiert, oder *PaAtpe* und *PaAtpg*, welche für Teile der F₀F₁-ATP-Synthase kodieren, zu einer veränderten Mitochondrien-Morphologie und Lebensspanne (Rampello *et al.*, 2018; Scheckhuber *et al.*, 2007). Weiterhin beeinflussen Veränderungen der mitochondrialen Qualitätskontrolle den Alterungsprozess von *P. anserina* (Fischer *et al.*, 2012; Osiewacz *et al.*, 2010). So führen Manipulationen in Form von Deletionen aber auch Überexpression der mitochondrialen Proteasen PaLON (Adam *et al.*, 2012; Luce *et al.*, 2010), PaIAP (Weil *et al.*, 2011) und PaCLPP (Fischer *et al.*, 2013) zu einer Veränderung der Lebensspanne.

2 ZIELSETZUNGEN DER ARBEIT

„I want to be forever young“

aus „Forever Young“ von Marian Gold (Alphaville), 1984

Mit dieser Zeile aus dem Refrain des Liedes beschreibt Marian Gold einen weiteren Gedanken, den viele Menschen haben, die Entdeckung der Quelle der ewigen Jugend. Denn der wohl älteste Traum der Menschheit ist der Traum von einem langen und gesunden Leben. So ist die Suche nach dem sogenannten Jungbrunnen seit vielen Dekaden Teil der Forschung.

Ein Ansatzpunkt auf der Suche nach dem Jungbrunnen sind die Mitochondrien. Deren Funktion spielt eine Schlüsselrolle sowohl im Alterungsprozess als auch bei der Entstehung von zum Teil altersbedingten Krankheiten. Bis heute wird an der vollständigen Aufklärung der dem Altern zugrundeliegenden Prozesse geforscht. Dabei wird durch genetische Manipulation der bekannten Prozesse versucht, Einfluss auf den Alterungsprozess bzw. die Entstehung oder den Verlauf von Krankheiten zu nehmen. Darüber hinaus wird seit langem die Wirkung von Naturstoffen, welche in der täglichen Nahrung enthalten sind, auf die Mitochondrien untersucht. Über die Jahre wurden viele dieser Stoffe, insbesondere Polyphenole, identifiziert, die das Leben verlängern, Krankheitsverläufe verlangsamen, oder das Wachstum von Tumoren einschränken. Jedoch sind die zugrundeliegenden Wirkmechanismen vieler Polyphenole nur teilweise oder gar nicht aufgeklärt.

Ziel der vorliegenden Dissertation war daher die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Wirkmechanismen ausgewählter Polyphenole, welche in der Alterns- oder Krebsforschung Verwendung finden, unter Verwendung des eukaryotischen Modellorganismus *P. anserina*. Die Polyphenole Curcumin und Quercetin zählen zu den, für die Alterns- und Medikamenten-Forschung, interessanten Verbindungen. Von beiden sind positive Einflüsse auf die Lebensspanne verschiedener Organismen bekannt, sowie Hinweise auf einen Zusammenhang mit der Mitochondrienfunktion und dem ROS-Stoffwechsel. Mit Gossypol sollte ein drittes Polyphenol auf den Wirkmechanismus hin untersucht werden. Dieses Polyphenol ist von großem Interesse in der Krebstherapie-Forschung und wurde schon erfolgreich zur Wachstumshemmung von Tumoren verwendet. Desweiteren gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang der Wirkung mit der Mitochondrienfunktion.

Die genauen Wirkmechanismen und die Zusammenhänge aller drei Polyphenole sind nicht vollständig geklärt und die vorliegende Dissertation soll zu deren Aufklärung beitragen. Der Schwerpunkt der Analysen lag auf der Mitochondrienfunktion, dem ROS-Stoffwechsel und die damit verbundenen Effekte. Um die Mitochondrienfunktion besser beurteilen zu können, sollte zunächst eine Methode zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials etabliert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Geräte sind mit Modell- und Herstellerangaben in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

| Gerät | Modell | Hersteller |
|-----------------------------|---|--|
| Autoklav | HS 6606 EC-1 | Getinge |
| Binokular | M3Z | Wild Heerbrugg |
| Brutschränke | WTC, KBW400 und KBW720 | Binder |
| Bunsenbrenner | GASI | Schütt |
| Eismaschine | AF 103 | Scotsman |
| Elektrophorese-Kammern | Mini-Protean® II Cell Mini-Protean® Tetra Cell Mini Trans-Blot® Cell Protean® II | BioRad |
| Feinwaage | CP 64 PB 303 | Sartorius Mettler Toledo |
| Fluoreszenzmikroskop | DM LB | Leica |
| Gefrierschrank | GS 5903 (-20 °C) MDF-U73V (-80 °C) | Liebherr SANYO |
| Gradientenmischer | Econo Pump Ep-1 700 | BioRad |
| Heizblock | Thermomixer compact | Eppendorf |
| Homogenisator | Beat-Beater™ HBB 908-CE Precellys 24 | Biospec Peqlab |
| Kühlschrank | UKS 3600 (4-8 °C) | Liebherr |
| Laborabzug | VARIOLAB Mobilien W90 | Waldner |
| Leuchttisch | „slimlite LED“ 2449 | Kaiser Fototechnik |
| Magnetrührer | Ikameg Reo Yellow MAG HS 7 MR Hei-Mix S | IKA Labortechnik Yellowline Heidolph |
| Mikroliter Pipetten | 10 µl; 25 µl; 50 µl; 100 µl | Hamilton |
| Mikrotiterplatten-Lesegerät | Safire 2 | Tecan |
| Mikrowelle | Micro-Chef FM B935 | Moulinex |
| Multipipette | Signature EHP Pipettur 20-200 µl | VWR |
| pH-Meter | Calimatic 761 | Knick |
| Photometer | Ultrospec 2100 pro | Amersham Bioscience |
| Pipetten | Pipetman (5000 µl; 1000 µl; 200 µl; 20 µl; 2 µl) | Gilson |
| Proteinfokussierungskammer | Protean® IEF Cell Ettan IGPhor IEF unit | Bio-Rad GE Healthcare |
| (Fluo-)Respirometer | Oroboros-2k (Serie C und G) | Oroboros Instruments |
| Scanner | HP Scanjet G4010 GS-800 Calibradet Densitometer Odyssey Infrared Imager | HP BioRad LI-COR |
| Schüttelinkubator | HT-Infors | Infors-HT |
| Schüttler | Mini Rocker MR-1 Promax 1020 | Peqlab Heidolph |
| Spannungsquellen | Power Pac 3000 EV202 EV233 | BioRad Peqlab Consort |
| Sterilbank | NSF 49 LF 460 EC | Clean Air |
| Trockenschrank | TKE 117 | EHRET |

| | | |
|--------------------|---|-----------------------|
| Ultra-Zentrifuge | WX Ultra 80 mit Rotor AH650 | Thermo Fischer |
| Vortex | Vortex Genie 2 | Scientific Industries |
| Waage | LC 821 | Sartorius |
| Wasseraufbereitung | Milli-Q Reference | Millipore |
| Zentrifugen | 5417 R mit FA-45-24-11 Sorvall RC5B mit Super-Lite GSA SLA-1500 bzw. Sorvall SS34 | Eppendorf DuPont |

3.1.2 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Chemikalien und Stoffe sind mit Hersteller und Bestellnummer in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe.

| Chemikalien | Hersteller | Bestellnummer |
|--|---------------|---------------|
| ADP | Sigma-Aldrich | A2754 |
| Agar | Invitrogen | 30391-049 |
| Agarose | Roth | 2267.4 |
| ϵ -Aminocapronsäure | Roth | 3113.2 |
| Ammoniumacetat | Merck | 1116.1000 |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) | Merck | 1.01145.5000 |
| Ammoniumsulfid | Alfa Aesar | 33286 |
| Antifoam Y-30 Emulsion | Sigma-Aldrich | A5758 |
| APS | Roth | 9592.2 |
| Bio-Lyte 3-10 Ampholyt | BioRad | 163-2094 |
| Biomalz | Roth | X976.1 |
| Biotin | SERVA | 15060 |
| „Blocking“-Puffer | LI-COR | 927-40000 |
| Bromphenolblau | Merck | 1.117.460.005 |
| BSA | Sigma-Aldrich | A6003 |
| CHAPS | Roth | A1479.1 |
| Coomassie Blue G250 | SERVA | 17524 |
| Cytochrom C | Sigma-Aldrich | C2506 |
| Curcumin | Sigma-Aldrich | C1386 |
| CuSO ₄ x 5 H ₂ O | Merk | 2790.1000 |
| 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) | Sigma-Aldrich | D8001 |
| Dextrin, gelb | Roth | 6777.1 |
| Digitonin | Sigma-Aldrich | D141 |
| Dimethylformamid (DMF) | Sigma-Aldrich | D158550 |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth | 4720.1 |
| DTT | Roth | 6908.4 |
| EDTA | Merck | 1.08418.10000 |
| EGTA | Sigma-Aldrich | E4378 |
| Essigsäure | Roth | 3738.5 |
| Ethanol p.A. | Merck | 1.00983.2500 |
| Eisen(II)-Chlorid (FeCl ₂ x 4 H ₂ O) | Merck | 1.03861.0250 |
| Eisen(III)-Chlorid (FeCl ₃) | Roth | P742.1 |
| Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O | Sigma-Aldrich | F3754 |
| Glucose-Monohydrat | Roth | 6780.2 |
| Glycerin | Roth | 4043.3 |
| Glycin | Roth | 3908.2 |
| (-)-Gossypol (AT-101) | Tocris | 3367 |
| H ₂ O ₂ (30 %) | Roth | 8070.2 |
| H ₃ BO ₃ | Merck | 100165.5000 |
| Harnstoff | Merck | 1.08487.0500 |
| Hefe-Extrakt | DIFCO | 0127-07 |
| HEPES | SERVA | 25245.05 |

| Chemikalien | Hersteller | Bestellnummer |
|---|---------------|---------------|
| Hygromycin B | Calbiochem | 400051 |
| Imidazol | Roth | 3899.2 |
| Iodoacetamid | BioRad | 163,2109 |
| Isopropanol | Roth | 6752.4 |
| Isorhamnetin | Roth | 6528.1 |
| K ₂ HPO ₄ | Roth | P749.1 |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck | 1.04936.1000 |
| Kaliumcyanid (KCN) | Fluka | 60178 |
| Kaliumhexacyanidoferrat (K ₃ Fe(CN) ₆) | Sigma-Aldrich | 393517 |
| Kaliumhydroxid (KOH) | Merck | 5033.1000 |
| Katalase | Sigma-Aldrich | C1345 |
| KH ₂ PO ₄ | Merck | 1.04873.1000 |
| Maismehl | Cornexo | - |
| Malat | Sigma-Aldrich | M9183 |
| Malzextrakt | Roth | X976.1 |
| Manganchlorid (MnCl ₂ x 2 H ₂ O) | Merck | 5.934.0100 |
| Mangansulfat (MnSO ₄ x 1 H ₂ O) | SERVA | 28405 |
| β-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich | M6250 |
| Meerrettichperoxidase | Sigma-Aldrich | P8250 |
| Methanol | Roth | 4627.5 |
| MgCl ₂ x 6 H ₂ O | Merck | 5833.1000 |
| MgSO ₄ x 7 H ₂ O | Merck | 1.05886.0500 |
| Mineralöl | BioRad | 163-2129 |
| MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) | Sigma-Aldrich | M9381 |
| N-Acetyl-L-Cystein (NAC) | Sigma-Aldrich | A7250 |
| Natriumacetat (NaAc) | Merck | 1.06268.1000 |
| Natriumchlorid (NaCl) | Roth | 3957.2 |
| NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O | Merck | 1.06345.1000 |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | Roth | 4984.1 |
| Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O | SERVA | 30207 |
| Natriumhydroxid (NaOH) | Roth | 6771.1 |
| Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) | Sigma-Aldrich | N6876 |
| Oligomycin | Sigma-Aldrich | O4876 |
| Pb(NO ₃) ₂ | Merck | 1073980100 |
| Phenanzine-methosulfat | Sigma-Aldrich | P9625 |
| Phleomycin | Genaxxo | M3429 |
| Protease-Inhibitor Cocktail IV | Calbiochem | 539136 |
| Pyruvat | Sigma-Aldrich | P2256 |
| Rotenon | Sigma-Aldrich | R8875 |
| Rotiphorese® Gel 40 (29:1) | Roth | A515.1 |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) | Roth | 3029.1 |
| Rotiphorese® Gel A (30 % Acrylamidlösung) | Roth | 3037.1 |
| Rotiphorese® Gel 2 (2 % Bisacrylamidlösung) | Roth | 3029.2 |
| Riboflavin | Sigma-Aldrich | R4500 |
| Quercetin | Sigma-Aldrich | Q4951 |
| Riboflavin | Sigma-Aldrich | R4500 |
| Roti-Nanoquant | Roth | K880.1 |
| Saccharose | Roth | 4621.2 |
| Safranin O | Sigma Aldrich | S2255 |
| Salicylhydroxamic acid (SHAM) | Sigma-Aldrich | S607 |
| Salzsäure (HCl) | Merck | 1.00319.2500 |
| SDS | Merck | 1.13760.0100 |
| Sorbitol | SERVA | 35230.02 |
| Succinat | Sigma-Aldrich | S2378 |
| TEMED | Roth | 2367.1 |
| Thiamin | SERVA | 336020 |
| Thioharstoff | Roth | 9531.3 |
| TMRM | Sigma Aldrich | T5428 |
| Tricin | Roth | 6977.2 |
| TRIS | Roth | 4855.3 |
| Trypton | Otto Nordwald | 211701 |

| Chemikalien | Hersteller | Bestellnummer |
|--|---------------|---------------|
| Tween20 | Sigma-Aldrich | P-2287 |
| Zitronensäure | Merck | 244.1000 |
| ZnSO ₄ x 7 H ₂ O | Merck | 8883.0100 |

3.1.3 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Puffer und Lösungen sind mit der jeweiligen Zusammensetzung in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen.

| Puffer und Lösungen | Verwendung | Zusammensetzung |
|--------------------------|---|---|
| ADP-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 500 mM ADP in H ₂ O bei -80 °C lagern |
| Ammoniumsulfid-Lösung | Komplex V-Aktivitätsfärbung | 1 % (v/v) Ammoniumsulfid in H ₂ O |
| Anodenpuffer | BN-PAGE | 25 mM Imidazol pH 7,0 (HCl) frisch ansetzen; ü. N. im Kühlraum lagern |
| Äquilibrierungspuffer | 2D-PAGE | 6 M Harnstoff 0,375 M Tris, pH 8,8 2 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerin frisch zugeben: 2,5 % (w/v) Iodoacetamid |
| ATP-Isolationspuffer | ATP-Messungen | 100 mM NaCl 50 mM KH ₂ PO ₄ pH 6,0, autoklavieren |
| Biotin-Stammlösung | M2-Medium | 50 µg/ml in H ₂ O sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße) |
| „Blotting“-Puffer | Western-Blot Analyse | 25 mM TRIS 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol, ad 1 l H ₂ O |
| BNP-Puffer (3x) | BN-PAGE | 1,5 M ε-Aminocaprinsäure 75 mM Imidazol pH 7,0 (HCl) bei 4°C und lichtgeschützt lagern |
| Coomassie-Entfärbelösung | Proteingele | 25 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 65 % (v/v) H ₂ O |
| Coomassie-Färbelösung | Proteingele | 45 % (v/v) Methanol 45 % (v/v) H ₂ O 10 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250 |
| Coomassie-Lösung (5%ig) | BN-PAGE | 0,005 g Coomassie Blue G250 in 100 µl 1,5 mM ε-Aminocaprinsäuren frisch ansetzen |
| Curcumin | Medien-Zusatz | 27,3 mM in EtOH, lagern bei -20°C |
| DAB-Färbelösung | Qualitative DAB-Färbung | 2,5 mM 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in 0,1 M Tris/HCl (pH 6,9) ca. 10 min bei 60 °C lösen |
| DAB-Lösung | Quantitative DAB-Färbung / „In-Gel“-Peroxidase- Aktivitätsfärbung | 0,1 M Tris/HCl (pH 6,9) 2,5 mM 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 0,02 mg/ml Meerrettichperoxidase |
| Digitonin-Lösung (10%ig) | BN-PAGE | 100 mg Digitonin/ 1 ml H ₂ O 15 min bei 99 °C lösen abkühlen lassen bei 4 °C lagern |
| DTT-Lösung | Proteinisolation | 1 M DTT in 0,01 M NaAc, pH 5,2, sterilfiltrieren |
| (-)-Gossypol-Lösung | Medien-Zusatz | 100 mM Gossypol in DMSO lagern bei -20 °C |

| Puffer und Lösungen | Verwendung | Zusammensetzung |
|-----------------------------------|-------------------------------------|---|
| IEF-Puffer | 2D-PAGE | 7 M Harnstoff 2 M Thioharnstoff 2 % (w/v) CHAPS ad 100 ml H ₂ O frisch zugeben: 1 % Bio-Lyte-3-10 und 18 mM DTT |
| Katalase-Färbelösung | „In-Gel“-Katalase-Aktivitätsfärbung | 2 % (w/v) FeCl ₃ (10 ml) 1,2 % (w/v) K ₃ Fe(CN) ₆ (10 ml) |
| Kathodenpuffer | BN-PAGE | 50 mM Tricin 7,5 mM Imidazol pH 7,0 (nicht einstellen) B-Puffer: + 0,02 % (w/v) Coomassie Blue B10-Puffer: + 0,002 % (w/v) Coomassie Blue ü. N. im Kühlraum lagern |
| Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M) | „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung | 13,2 mM K ₂ HPO ₄ 86,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,8 |
| KCN-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 100 mM KCN in H ₂ O |
| Komplex I-Färbelösung | BN-PAGE | 1 mg /ml NBT 0,1 mg/ml β-NADH 1 Fläschchen β-NADH in 75 ml 0,1M TRIS/HCl pH 7,4 |
| Komplex II-Färbelösung | BN-PAGE | 84 mM Succinat 0,2 mM Phenazine-Methosulfat 2 mg/ml NBT 4,5 mM EDTA 10 mM KCN in 75 ml 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,4 |
| Komplex IV-Färbelösung | BN-PAGE | 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) 24 U/ml Katalase 1 mg/ml Cytochrom c 75 mg/ml Saccharose in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) |
| Komplex V-Färbelösung | BN-PAGE | 270 mM Glycin 8 mM ATP 14 mM MgSO ₄ 0,2 % (w/v) Pb(NO ₃) ₂ in 35 mM Tris, pH 7,8 |
| Laufpuffer (10x) | Proteingele | 250 mM Tris 1,92 M Glycin autoklavieren Für SDS-Gele: 1 x Laufpuffer + 0,1 % SDS Für native Gele: 1 x Laufpuffer ohne SDS |
| Malat-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 400 mM Malat in H ₂ O pH 7,0 (KOH); lagern bei -20 °C |
| Mitochondrien isotonischer Puffer | BN-PAGE | 0,6 M Sorbitol 20 mM HEPES pH 7,4 (KOH) |
| Mitochondrien-Isolationspuffer 1 | Mitochondrien-Isolation | 10 mM Tris/HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 0,33 M Saccharose |
| Mitochondrien-Isolationspuffer 2 | Mitochondrien-Isolation | 0,2 % (w/v) BSA in Mitochondrien-Isolationspuffer 1 |
| N-Acetyl-L-Cystein | Medien-Zusatz | 0,2 M in H ₂ O, lagern bei 4 °C |
| Nativer Stopper (6x) | „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung | 7,5 ml Glycerin 9,375 ml 0,5 M Tris/HCl (pH 7,0) 1 % (w/v) Bromphenolblau ad 25 ml mit H ₂ O |
| NBT-Färbelösung | NBT-Färbung | 5 mM MOPS pH 7,6 2,5 mM Nitroblautetrazolium (NBT) |
| NBT-Lösung | „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung | 50 mg/ml Nitroblautetrazolium (NBT) in 70 % Dimethylformamid (DMF) |
| Oligomycin-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 5 mM Oligomycin in EtOH |

MATERIAL UND METHODEN

| Puffer und Lösungen | Verwendung | Zusammensetzung |
|--|------------------------------------|---|
| Protein-Extraktionspuffer | Proteinisolation | lagern bei -20 °C 1 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,5 (NaOH) autoklavieren, vor Gebrauch 5 mM DTT |
| PBS nach Tropix (10x) | Western-Blot-Analyse | 0,68 M NaCl 0,58 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,17 M NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O autoklavieren |
| Phleomycin-Lösung | Selektion | 10 mg/ml Phleomycin in H ₂ O lösen, sterilfiltrieren |
| Quercetin | Medien-Zusatz | 0,2 M in DMSO, lagern bei -20 °C |
| Pyruvat-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 2 M Pyruvat in H ₂ O frisch Ansetzen |
| Riboflavin-Lösung | „In-Gel“-SOD- Aktivitätsfärbung | 1 mg/ml Riboflavin 100 mM Kaliumphosphatpuffer 0,1 % TEMED |
| Rotenon-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 1 mM Rotenon in Ethanol Lagerung bei -20 °C |
| Saccharose-Lösungen | Mitochondrien-Isolation | 50 % in H ₂ O 36 % in H ₂ O 20 % in H ₂ O |
| Safranin-Lösung | mtMP-Messung | 1 mM in H ₂ O |
| Sammelgelpuffer (4x) | SDS-Gele | 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 0,04 % (w/v) SDS |
| Sauerstoffpuffer (O ₂ -Puffer) | (Fluo-)Respirometrie | 0,3 M Saccharose 10 mM KH ₂ PO ₄ 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1 mM EGTA 10 mM KCL 0,2 % (w/v) BSA pH 7,2 (KOH); lagern bei -20 °C |
| SDS-Ladepuffer (3x) | SDS-Gele | 3 g Glycerin 1,5 ml β-Mercaptoethanol 3 ml 20 % SDS-Lösung 3,75 ml 4x Sammelgelpuffer 1 % (w/v) Bromphenolblau ad 10 ml H ₂ O; lagern bei -20 °C |
| SDS-Lösung | | 20 % SDS (w/v) in H ₂ O |
| SHAM-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 100 mM SHAM in H ₂ O Frisch ansetzen, bei 70 °C lösen |
| Solubilisierungspuffer | BN-PAGE | 50 mM NaCl 50 mM Imidazol 1 mM EDTA, pH 7,0 bei 4 °C lichtgeschützt lagern frisch zugeben: 2 mM ε-Aminocaprinsäuren, 1/100 Protease-Inhibitor-Cocktail |
| Spurenelementlösung | M2-Medium | 25 mM Zitronensäure 17,4 mM ZnSO ₄ x 7 H ₂ O 2,5 mM Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O 1 mM CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,3 mM MnSO ₄ x H ₂ O 0,8 mM H ₃ BO ₃ 0,2 mM NaMoO ₄ x 2 H ₂ O sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße) |
| Stammlösung A (100x) | CM-Medium | 0,1 % (w/v) ZnSO ₄ x 7H ₂ O 0,1 % (w/v) FeCl ₂ 0,1 % (w/v) MnCl ₂ in H ₂ O, pH 6,5 (KOH) autoklavieren |
| Succinat-Lösung | (Fluo-)Respirometrie | 1 M Succinat in H ₂ O pH 7,0 (HCl); lagern bei -20 °C |

| Puffer und Lösungen | Verwendung | Zusammensetzung |
|--|--------------|--|
| Thiamin-Lösung | M2-Medium | 250 mg/l Thiamin in H ₂ O sterilfiltrieren (0,2 µm Porengröße) |
| TMRM-Lösung | mtMP-Messung | 1 mM in DMSO |
| Trenngelpuffer (4x) | SDS-Gele | 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 0,4 % SDS |
| Überschichtungslösung für IPG-Streifen | 2D-PAGE | 0,5 % Agarose In 1 x SDS-Laufpuffer aufkochen |

3.1.4 Anzuchtmedien

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Medien zur Anzucht und Kultivierung von *P. anserina* sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Anzuchtmedien.

| Medium | Zusammensetzung |
|-------------------------------------|--|
| AmAc-Medium (Ammoniumacetat-Medium) | 4,6 g Ammoniumacetat/l BMM 2 % (w/v) Agar Autoklavieren |
| BMM (Biomalz-Mais-Medium) | 250 g Maismehl/5 l Wasser über Nacht bei 60 °C quellen über Handtuch filtrieren 8 g Biomalz/l pH 6,5 (KOH) ad 5 l H ₂ O autoklavieren Festmedium: 2 % (w/v) Agar, autoklavieren BMM + Phleo: 6 µg/ml Phleomycin, pH 7,5 BMM + Hyg: 100 µg/ml Hygromycin |
| CM (engl. „complete medium“) | 1 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g KCl 0,5 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 10 g Glucose 3,7 g NH ₄ Cl 2 g Trypton 2 g Hefeextrakt 1 ml Stammlösung A ad 1 l H ₂ O; pH 6,5 (KOH) autoklavieren |
| M2 (Medium 2) | 0,25 g KH ₂ PO ₄ 0,3 g K ₂ HPO ₄ 0,25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O 0,5 g Harnstoff 10 g Dextrin (gelb) ad 1 l H ₂ O 2 % (w/v) Agar autoklavieren nach dem Autoklavieren zugeben: 50 µl Biotin-Stammlösung (0,05 mg/ml) 200 µl Thiamin-Stammlösung (250 mg/ml) 100 µl Spurenelementlösung |
| Präparationsagar (8 %) | 24 g Agar ad 300 ml H ₂ O; autoklavieren |

3.1.5 Kits

Die in dieser Dissertation verwendeten Kits sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Kits.

| Name | Hersteller | Bestellnummer |
|-------------------------------------|------------|---------------|
| ATP Bioluminescence Assay Kit CLSII | Roche | 11699709001 |

3.1.6 Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämme sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Stämme.

| Stamm | Referenz |
|---|--|
| Wildstamm s (F18261 ⁺), (F18260 ⁻) | Rizet (1953) |
| <i>PaSod1::Gfp</i> (F179191 ⁺), (F194531 ⁻) | Zintel <i>et al.</i> (2010) |
| <i>PaSod3^{H26L}::Gfp</i> (F179600 ⁺), (F192620 ⁻) | Knuppertz <i>et al.</i> (2017) |
| Δ <i>PaMth1</i> (F50750 ⁺), (F50751 ⁻) | Kunstmann (2009) |
| Δ <i>PaCypD</i> (F162690 ⁺), (F87721 ⁻) | Brust <i>et al.</i> (2010) |
| Δ <i>PaCypD/PaSod1::Gfp</i> (F173760 ⁺), (F173761 ⁻) | Kramer <i>et al.</i> (2016) |
| Δ <i>PaCypD/PaSod3^{H26L}::Gfp</i> (F176770 ⁺), (F176771 ⁻) | Hamann (AG Osiewacz), zur Verfügung gestellt |
| Δ <i>PaAtg1</i> (F155301 ⁺) | Knuppertz <i>et al.</i> (2014) |
| Δ <i>PaAtg1/ PaSod3^{H26L}::Gfp</i> (F278941 ⁺) | Knuppertz (2017) |
| Δ <i>PaMca1</i> (F51361 ⁺), (F51360 ⁻) | Hamann <i>et al.</i> (2007) |
| Δ <i>PaSod1</i> (F99322 ⁺), (113751 ⁻) | Zintel (2012) |
| Δ <i>PaSod3</i> (F153551 ⁺), (F96121 ⁻) | Zintel (2012) |
| Δ <i>PaSod1/\Delta PaSod2/\Delta PaSod3</i> (kurz: Δ <i>PaSod1/2/3</i>) (F102780 ⁺), (F102781 ⁻) | Zintel (2012) |
| <i>PaMth1_OEx</i> (F50520 ⁺), (F50631 ⁻) | Kunstmann und Osiewacz (2008) |

3.1.7 Antikörper

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Antikörper sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Antikörper.

| Antikörper | Beschreibung | Hersteller |
|-------------------------|--|--|
| anti-GFP | monoklonaler Primärantikörper aus Maus; erkennt GFP (24 kDa); Verdünnung 1:10000 | Sigma (G6795) |
| anti-Cu/Zn-SOD (PaSOD1) | monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen, erkennt PaSOD1 (Zytoplasma und Intermembranraum der Mitochondrien, 16 kDa); Verdünnung: 1:2000 | BIOMOL/Stressgen (SOD-100) |
| anti-ScCYTc | monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen; erkennt mitochondriales Cytochrom c (13 kDa); Verdünnung: 1:5000 | R. Lill (Marburg) |
| anti-Mn-SOD (PaSOD3) | monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen; erkennt PaSOD3 (mitochondriale Matrix, 21,5 kDa); Verdünnung: 1:2000 | BIOMOL/Stressgen (SOD-111) |
| anti-PaATP5 | spezifischer polyklonaler Peptidantikörper aus Kaninchen; erkennt PaATP5 (Mitochondrien, 20,4 kDa); Verdünnung: 1:2000 | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |
| anti-PaMTH1 | spezifischer Peptidantikörper aus Kaninchen; erkennt PaMTH1 (Zytoplasma und Mitochondrien, 27 kDa); Verdünnung: 1:1000 (Mitos); 1:2000 (Gesamtprotein) | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |
| anti-PaCYPD (71-85) | spezifischer Peptidantikörper aus Kaninchen; erkennt PaCYPD (Mitochondrien, 20 kDa); Verdünnung: 1:5000 | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |

| | | |
|--------------------------|--|--|
| anti-PaSOD2 | spezifischer Peptidantikörper (polyklonal); erkennt PaSOD2 (Cytoplasma, sekretiert, 26,3 kDa); Verdünnung: 1:5000; Zintel et al. 2010 | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |
| anti-PORIN | spezifischer Peptidantikörper (polyklonal); erkennt PaPORIN (äußeren Mitochondrienmembran; 32 kDa); Verdünnung: 1:5000; Luce und Osiewacz 2009 | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |
| anti-PaPRX | spezifischer Peptidantikörper gegen PaPRX1 (mitochondriale Matrix, 16,6 kDa); Verdünnung: 1:2000 | Sigma (NEP); synthetisches Peptid; affinitätsgereinigt |
| IR Dye 680LT anti-rabbit | polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen; Verdünnung: 1:20000 | Li-Cor (926-68021) |
| IR Dye 800CW anti-mouse | polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Maus; Verdünnung: 1:15000 | Li-Cor (926-32211) |
| IRDye 680 anti-mouse | polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Maus; Verdünnung: 1:15000 | Li-Cor (926-68070) |
| IRDye 800 anti-rabbit | polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen; Verdünnung: 1:15000 | Li-Cor (926-32210) |

3.1.8 Größenstandards

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Größenstandards sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Größenstandards.

| Name | Anwendung | Hersteller | Bestellnummer |
|--|------------------------|-------------------|---------------|
| NativeMark™ Unstained Protein Standard | Protein-Größenstandard | Invitrogen | LC0725 |
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Protein-Größenstandard | Thermo Scientific | 26616 |

3.1.9 Computerprogramme

Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Computerprogramme sind mit Verwendung in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Verwendete Computerprogramme.

| Programm | Anwendung | Hersteller |
|-------------------------------------|--|---|
| Adobe Photoshop | Bildbearbeitung | Adobe Systems |
| DatLab6 | Auswertung Atmungsmessungen | Oroboros Instruments |
| Illustrator CS3 | Erstellung von Grafiken | Adobe Systems |
| ImageJ | Bildbearbeitung | NIH |
| Microsoft Office 2016 | Dokumenten- und Bildbearbeitung, Tabellenkalkulation | Microsoft |
| Odyssey Software | Dokumentation und Auswertung von Western-Blot-Analysen | Li-Cor |
| Quantity One® 1-D Analysis Software | Densitometrie | Bio-Rad |
| SPSS statistics 19 | Statistische Auswertung | SPSS Inc, IBM. |
| Studio Lite | Quantifizierung BN-PAGE | Li-Cor |
| Wilcoxon-Mann-Whitney Test | Statistische Auswertung | https://ccb-compute2.cs.uni-saarland.de/wtest/?id=www/www-ccb/html/software/wtest/ |

3.1.10 Sonstige Materialien

Sonstige in der Dissertation verwendete Materialien sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Sonstige Materialien.

| Material | Modell | Hersteller | Bestellnummer |
|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------|
| Cellophan | 583 Gel Drye | BioRad | 165-1745 |
| Filterpapier | 3MM | Whatmann | 10426693 |
| Glasperlen | 0,5 mm | Roth | N030.1 |
| Immobilisierter pH-Gradient (IPG) | Immobiline ReadyStrips pH 3-10 NL | BioRad | 163-2002 |
| Mikrotiterplatten (Weiß) | NUNC™ | Thermo Scientific | 236105 |
| Mikrotiterplatten | NUNC™ | Thermo Scientific | 256510 |
| Mull | 10 cm x 40 m | Hartmann | |
| PVDF-Membran | Millipore Immobilon-P | Roth | IPFL00010 |
| Precellys®24 Lysing Tubes (0,5 mm) | | Peqlab | 91-PCS-VK05 |

3.2 Methoden

3.2.1 *Podospora anserina*-spezifische Methoden

Anzucht von *P. anserina*

Die Anzucht der verschiedenen *P. anserina*-Stämme erfolgte entweder auf BMM- oder M2-Festmedium mit 2 % (w/v) Agar standardmäßig bei 27 °C und Dauerlicht (Osiewacz *et al.*, 2013). Gegebenenfalls wurde das Medium mit verschiedenen Zusätzen supplementiert, was teilweise zu einer Veränderung der Standardbedingungen führte (siehe Tabelle 12).

Zur Gewinnung größerer Myzel-Mengen, etwa für die Isolation von Mitochondrien, wurde die Anzucht auf Festmedium und in Weithalskolben mit CM-Flüssigmedium unter Schütteln (140-180 Upm) kombiniert. Die genaue Anzucht für die verschiedenen Experimente sind den einzelnen Methoden zu entnehmen.

Tabelle 12: Inkubationsbedingungen der verschiedenen Zusätze.

| Zusatz | Temperatur | Lichtverhältnisse |
|-----------------------|------------|-------------------|
| Curcumin | 27 °C | im Dunkeln |
| DMSO | 27 °C | Dauerlicht |
| Ethanol | 27 °C | im Dunkeln |
| (-)-Gossypol (AT-101) | 27 °C | Dauerlicht |
| Isorhamnetin | 27 °C | Dauerlicht |
| Quercetin | 27 °C | Dauerlicht |

Um *P. anserina*-Kulturen bestimmten Alters zu erhalten, wurde ein Myzel-Stückchen von zwei Tage alten frisch gekeimten Sporen auf eine Seite einer mit 30 ml gefüllten M2-Platte angeimpft und je

nach Zusatz unter den entsprechenden Bedingungen inkubiert. Dabei wurde die Wuchsfrente alle 2-3 Tage markiert. Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden *P. anserina*-Stämme 3-4 Tage auf BMM-Platten angezogen und anschließend bei 4 °C gelagert.

Isolation monokaryotischer Sporen

Für die Isolation monokaryotischer Sporen wurden zunächst zwei homokaryotische Individuen mit gegensätzlichem Paarungstyp miteinander gekreuzt. Dazu wurde je ein Myzel-Stückchen zweier Isolate im Abstand von etwa 2-3 cm auf M2-Festmedium angeimpft und unter Standardbedingungen inkubiert. In der Kontaktzone der beiden Myzelien bilden sich nach etwa 10-14 Tagen Fruchtkörper (Perithezien) aus. Diese enthalten eine Vielzahl von Asci, die in der Regel vier dikaryotische Sporen enthalten. Bei der Bildung dieser Asci kommt es in 1-2 % der Fälle zu einer Fehlanordnung des Spindelapparates während der Meiose, wodurch es zur Bildung monokaryotischer Sporen kommt. Diese sogenannten irregulären Asci enthalten dann zwei bis maximal acht monokaryotische Sporen. Aufgrund der geringeren Größe der monokaryotischen Sporen lassen sie sich optisch gut von den dikaryotischen Sporen unterscheiden und können zum Auskeimen auf Ammoniumacetat-Platten überführt werden. Diese werden dann für zwei Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Zur Verifizierung und zur Bestimmung des Paarungstyps wurden Testkreuzungen mit einem monokaryotischen Wildstammisolat bekannten Paarungstyps (s^-) durchgeführt.

Bestimmung der Wachstumsrate und Lebensspanne

Zur Bestimmung der Wachstumsraten und Lebensspannen wurden zwei Tage ausgekeimte, monokaryotische Isolate der zu untersuchenden Stämme verwendet. Für die Analysen mit den verschiedenen Zusätzen wurden 30 ml M2-Festmedium in Petrischalen verwendet und die Inkubationsbedingungen je nach Zusatz angepasst (siehe Tabelle 12).

Die Wuchsfrente der Myzelien wurde alle zwei Tage markiert. Wenn ein deutlicher Einbruch der Wachstumsrate, sowie eine starke Pigmentierung der Wuchsfrente sichtbar wurden, wurde das Isolat als tot bewertet. So wird die Lebensspanne eines Isolates durch die Anzahl der Wuchstage inklusiver der zweitägigen Keimung definiert. Die mediane Lebensspanne entspricht der Anzahl Tage an denen 50 % der Isolate abgestorben sind. Die Wachstumsrate ist als Wachstum in cm pro Tag definiert und wurde durch Messen der Wuchsstrecke jedes Isolates innerhalb eines definierten Zeitraums mit konstantem Wachstum und anschließender Bildung des Mittelwerts ermittelt.

Fluoreszenzmikroskopie

Zur Visualisierung von Mitochondrien-Strukturen wurde das GFP-Fusionsprotein PaSOD3^{H26L}::GFP durch Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme auf Objektträger, deren zentrale Mulde mit M2-Agar gefüllt war, ü. N. in einer Feuchtekammer bei 27 °C und Dauerlicht angezogen. Vor der mikroskopischen Analyse wurde das Impfstück entfernt. Nach Zugabe von ca. 50 µl Lösungsmittel (Kontrolle) bzw. des Polyphenols wurde ein Deckgläschen aufgelegt. Für die anschließende Mikroskopie wurde das Mikroskop Leica DMLB verwendet und die Bilder mit Adobe Photoshop unter Verwendung des differentiellen Interferenzkontrasts (DIC) und eines Blaufilters für GFP (Anregung 470 ± 20 nm; Emission 525 ± 25 nm) aufgenommen.

Nachweis des Superoxid-Ausstoßes (NBT-Färbung)

Der qualitative Nachweis des Superoxid-Ausstoßes (extrazelluläre Menge) basiert auf einem histochemischen Verfahren von Munkres (1990). Dazu wurden Myzel-Stückchen je nach gewünschtem Alter entweder von frisch gekeimten Sporen oder von bereits auf M2-Festmedium mit und ohne Zusätze gealterten Kulturen auf entsprechendes M2-Festmedium mit und ohne Zusätze angeimpft. Um die Pigmentierung zu verzögern, wurden die Platten vier Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die bewachsenen Platten mit 5 ml NBT-Färbelösung (Tabelle 4) überschichtet und 30 min bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Nach dem Abgießen der Färbelösung erfolgte eine weitere Inkubation bei 27 °C im Dunkeln für 3 h. Die Färbung der Myzelien wurde photographisch oder per Scan der Platten dokumentiert.

Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (DAB-Färbung)

Der qualitative Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes basiert, wie der Nachweis von Superoxid, auf der Methode von Munkres (1990). Die Vorgehensweise war analog zum Nachweis des Superoxid-Ausstoßes. Abweichend wurde anstatt der NBT-Färbelösung eine DAB-Färbelösung (Tabelle 4) verwendet.

Neben dem qualitativen Nachweis war auch ein quantitativer Nachweis des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes beruhend auf dem Verfahren von Munkres (1990) und modifiziert nach Kowald *et al.* (2012) möglich. Dazu wurden Myzel-Stückchen, je nach gewünschtem Alter, entweder von frisch gekeimten Sporen oder von bereits auf M2-Festmedium mit und ohne Zusätze gealterten Kulturen auf entsprechendes M2-Festmedium mit und ohne Zusätze angeimpft. Die Inkubation erfolgte für vier Tage bei 27 °C und Lichtverhältnissen je nach Zusatz (siehe Tabelle 12). Von den Kulturen wurden mit 200 µl Reaktionsgefäßen kleine kreisrunde Myzel-Stückchen ausgestanzt und in eine

Mikrotiterplatte (Nunc™ 256510) überführt. Die Myzel-Stückchen wurden mit 200 µl DAB-Lösung (Tabelle 4) überschichtet und 3 h bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 100 µl des Überstands in eine frische Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 471 nm in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Tecan, Safire 2) gemessen. Von jedem biologischen Replikat wurden drei technische Replikate gemessen und diese gemittelt. Zur Bestimmung der Wasserstoffperoxid-Menge wurde eine Eichgerade mit verschiedenen definierten Wasserstoffperoxid-Konzentrationen erstellt. Um die erhaltenen Werte auf das Trockengewicht der jeweiligen Kulturen zu beziehen, wurde 4-5 identische Myzel-Stückchen ausgestanzt, 90 sec in Wasser gekocht und anschließend abfiltriert, getrocknet und gewogen. Der Mittelwert der Absorption pro Trockengewicht der auf M2-Festmedium ohne Zusatz bzw. dem Kontroll-Zusatz gewachsenen Kulturen wurde berechnet und die Werte der Proben mit Zusatz darauf bezogen und als „relativer Wasserstoffperoxid-Ausstoß“ angegeben.

Bestimmung des ATP-Gehalts

Die zu untersuchenden Stämme wurden für drei Tage auf M2-Medium mit verschiedenen Zusätzen und Cellophan angezogen (genaue Inkubationsbedingungen je nach Zusatz sind der Tabelle 12 zu entnehmen). Je Probe wurden 100 mg Myzel mit 200 µl ATP-Isolationspuffer (Tabelle 4) in „Precellys“-Reaktionsgefäße mit Glaskügelchen gegeben und bei -80 °C für ca. 30 min eingefroren. Um die ATPasen zu inaktivieren, wurden die Ansätze anschließend für 15 min im Wasserbad gekocht. Nach Zugabe von 300 µl Wasser wurden das Myzel für 2 min bei 5000 Upm in einem Homogenisator zerschlagen und anschließend erneut für 10 min im Wasserbad gekocht. Das Homogenisat wurde zur Sedimentation der Myzel-Reste 10 min bei 14000 Upm und RT zentrifugiert. Vom erhaltenen Überstand wurden 50 µl im Verhältnis 1/30 mit Wasser verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 50 µl in Mikrotiterplatten (Nunc™ 236105) überführt und die ATP-Menge mit dem „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ nach Herstellerangaben bestimmt.

3.2.2 Protein-spezifische Methoden

Isolation von nativem Gesamtproteinextrakt aus *P. anserina*

Zur Isolation von Gesamtproteinextrakten wurden je Probe zwei M2-Platten mit oder ohne Zusätzen und Cellophan mit etwa 20 Myzelstückchen im Brutschrank angezogen (genaue Inkubationsbedingungen je nach Zusatz sind der Tabelle 12 zu entnehmen). Nach 2-tägiger Inkubation folgte die Überführung des Myzels von den Platten in Weithalskolben mit 200 ml flüssigem CM-Medium mit und ohne Zusätze. Abweichend wird bei Proben mit 200 µM Gossypol

das Myzel in kleinere Weithalskolben mit 100 ml flüssigem CM-Medium mit Zusätzen überführt. Es folgte eine erneute 2-tägige Inkubation unter denselben Bedingungen wie zuvor. Das Myzel wurde über zwei Lagen Mull abfiltriert, kräftig ausgepresst und in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff pulverisiert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von Proteinextraktionspuffer (50 µl pro 100 mg Myzel) erfolgte eine schüttelnde Inkubation für 10 min bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellreste durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15000 Upm sedimentiert. Der Überstand mit dem enthaltenen Gesamtprotein wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Proteinkonzentration bestimmt und die Proben bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Isolation von mitochondrialen Proteinextrakten aus *P. anserina*

Mitochondriale Proteinextrakte wurden nach einer Methode von Gredilla *et al.* (2006) isoliert. Dazu wurden zunächst je Probe 15 M2-Platten ohne oder mit verschiedenen Zusätzen und Cellophanfolie mit etwa 20 Myzelstückchen (je 5 Platten mit Myzel von drei Individuen eines Stammes) für zwei Tage im Brutschrank angezogen (genaue Inkubationsbedingungen je nach Zusatz sind der Tabelle 12 zu entnehmen). Wie bei der Isolation von Gesamtproteinextrakten folgte anschließend die Überführung des Myzels von je drei Platten in Weithalskolben mit 200 ml flüssigem CM-Medium mit oder ohne Zusätze. Es folgte eine erneute 2-tägige Inkubation unter denselben Bedingungen wie zuvor, jedoch diesmal schüttelnd. Im Anschluss wurde das Myzel über zwei Lagen Mull abfiltriert, leicht ausgedrückt und in ein Becherglas mit kaltem Mitochondrien-Isolationspuffer 2 (Tabelle 4) auf Eis überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten ab diesem Punkt bei 4 °C im Kühlraum. Zunächst wurde das Myzel in 3-4 g Portionen und Mitochondrien-Isolationspuffer 2 mit Hilfe eines „Bead-Beater™“-Homogenisators (Roth) in einem zu 1/3 mit Glasperlen gefülltem Behälter homogenisiert. Um die Bildung von Luftblasen zu verhindern, wurden 3-4 Tropfen Antifoam-Lösung (1:5 Verdünnung) hinzugefügt. Zur Homogenisierung wurde das Myzel nun zweimal 20 sec mit einer Pause von 1 min mechanisch zerkleinert. Das Homogenisat wurde abschließend über ein Nesseltuch abfiltriert, in einen GSA-Becher überführt und 10 min bei 2000 Upm (Super-Lite GSA SLA-1500) und 4 °C zentrifugiert. Nach einer Filtration über Glaswolle wurde der Überstand bei 10000 Upm (Super-Lite GSA SLA-1500) für 20 min bei 4 °C in GSA-Bechern zentrifugiert. Im Überstand befand sich nun das Cytoplasma und im Pellet die Mitochondrien und Vakuolen. Das Pellet wurde in 1 ml Mitochondrien-Isolationspuffer 1 (Tabelle 4) resuspendiert. An diesem Punkt wurde, je nach geplanten Untersuchungen auf zwei verschiedene Arten weiter verfahren: Entweder erfolgte eine differenzielle Zentrifugation für physiologische Messungen, wie z. B. Sauerstoffverbrauchs-Messungen oder eine Auftrennung über Saccharose-Gradienten für ultrareine, von Vakuolen getrennten, Mitochondrien für BN-PAGE-Analysen.

Für die differenzielle Zentrifugation wurde der Überstand in ein SS34-Röhrchen überführt, mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 zu 2/3 aufgefüllt und bei 11500 Upm (Sorvall SS34) für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der innere, dunkle Teil des biphasischen Pellets mit Hilfe von Mitochondrien-Isolationspuffer 1 gelöst und ebenfalls verworfen. Der übrige helle Teil des Pellets wurde nun in 100-200 µl Mitochondrien-Isolationspuffer 1 luftblasenfrei resuspendiert und nach Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt Konzentrationsbestimmung von Proteinen) für physiologische Messungen verwendet.

Für die Isolation mit einem Saccharose-Gradienten wurde zunächst der Saccharose-Gradient vorbereitet. Dazu wurden vorsichtig 4 ml einer 50%igen, 4 ml einer 36%igen und 2 ml einer 20%igen Saccharose-Lösung in einem Ultrazentrifugationsröhrchen, ohne die Schichten zu vermischen, übereinandergeschichtet. Das resuspendierte Pellet wurde auf den Gradienten pipettiert und durch Ultrazentrifugation (60 min, 25000 Upm, 4 °C; AH 650) die intakten Mitochondrien von Vakuolen und zerstörten Mitochondrien getrennt. Die Phase mit den intakten Mitochondrien wurde mit einer Pipette abgenommen, in ein SS34-Röhrchen überführt und dies zu 2/3 mit Mitochondrien-Isolationspuffer 1 aufgefüllt. Durch Zentrifugation bei 11500 Upm (Sorvall SS34) für 20 min und 4 °C wurden die Mitochondrien sedimentiert und anschließend in max. 250 µl Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert. Nach der Konzentrationsbestimmung (siehe Abschnitt Konzentrationsbestimmung von Proteinen) wurden die mitochondrialen Proteinextrakte aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten erfolgte mit Hilfe des Roti-Nanoquant-Reagenzes nach dem Prinzip von Bradford (Bradford, 1976). Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde eine Eichgerade benötigt, für deren Erstellung wurden 0 µl, 5 µl, 10 µl, 20 µl und 40 µl einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) mit je 2 µl des entsprechenden Isolationspuffers versetzt und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 800 µl einer 1:5 Verdünnung des Roti-Nanoquant-Reagenzes erfolgte die Messung der Absorption bei zwei verschiedenen Wellenlängen, da sich durch Bindung des Farbstoffes an Proteine das Absorptionsmaximum verschiebt. So wird bei 590 nm der proteingebundene und bei 450 nm der ungebundene Teil des Farbstoffes gemessen. Die Eichgerade wurde nun durch die lineare Regression aus dem Quotient der gemessenen Werten (A₅₉₀/A₄₅₀) und der eingesetzten BSA-Menge erstellt. Um die Konzentration einer Proteinprobe zu bestimmen, wurden von dieser 2 µl mit 198 µl H₂O und 800 µl der Roti-Nanoquant Verdünnung vermischt. Anhand der zuvor erstellten

Eichgerade konnte aus den Quotienten der Messwerte der Proteinprobe ihre Konzentration bestimmt werden.

Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien

Zur Analyse der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (engl. „oxygen consumption rate“ oder kurz OCR) wurden zwei (Fluo-)Respirometer Oxygraph-2k (Serie C und G) der Firma Oroboros Instruments verwendet. Diese Geräte umfassen jeweils zwei geschlossene Reaktionskammern, in denen mit Hilfe eines polarographischen Sauerstoffsensors die Sauerstoffkonzentration gemessen wird. Diese Messmethode basiert auf dem Prinzip der Clark-Elektrode (Clark *et al.*, 1953). Zusätzlich können die Kammern durch eine eingebaute Peltier-Einheit auf einer konstanten Temperatur gehalten werden.

Vor Beginn jeder Messung wurden die Kammern mit 2 ml O₂-Puffer (Tabelle 4) gefüllt und zur Sättigung mit Sauerstoff (O₂) nur teilweise geschlossen. Nach etwa 15-20 min wurden frisch isolierte Mitochondrien (je 200 µg) in jede Kammer gegeben und die Kammer vollständig verschlossen. Der Sauerstoffverbrauch wurde als Gewichts-spezifischer O₂-Fluss (pmol s⁻¹ mg⁻¹) in Echtzeit im vom Hersteller zur Verfügung gestelltem Programm DatLab 6 aufgezeichnet. Vor jedem weiteren Schritt der Messung wurde gewartet, bis der Sauerstoffverbrauch einen konstanten Wert erlangt hatte. Standardmäßig wurde der Komplex I-abhängige Sauerstoffverbrauch analysiert. Dazu wurden zur Induktion der ADP-limitierten „State 4“-Atmung die Komplex I-spezifischen Substrate Pyruvat (10 mM) und Malat (5 mM) hinzugefügt. Im Anschluss wurde zur Induktion der phosphorylierenden „State 3“-Atmung ADP (1,5 mM) hinzugefügt. Nach erneutem Erreichen eines konstanten Sauerstoffverbrauchs wurden die Kammern gründlich gespült und mit frischen O₂-Puffer für die nächste Messung befüllt.

Nach Chance und Williams (1956) lassen sich bei Messungen mit isolierten Mitochondrien fünf Atmungs-Zustände (auch „States“ genannt) unterscheiden. Besondere Bedeutung haben die Zustände „State 4“ und „State 3“, wobei der Ruhezustand (engl. „resting respiration“) der Mitochondrien als „State 4“ bezeichnet wird. Dies entspricht der nicht-phosphorylierenden Atmung unter ADP-limitierten Bedingungen. Durch Zugabe von ADP wird die phosphorylierende Atmung, die „State 3“-Atmung, stimuliert und die Atmungsgeschwindigkeit bzw. der Sauerstoffverbrauch steigt an (Chance und Williams, 1956).

Abweichend wurde bei den Messungen mit dem *PaSod3*-Deletionsstamm vorgegangen. Hier wurde zusätzlich nach der ADP-Zugabe der Komplex II-abhängige Sauerstoffverbrauch analysiert. Dazu wurde das Komplex II-spezifische Substrat Succinat (10 mM) hinzugefügt, zur Stimulation der Komplex I- und II-abhängigen „State 3“-Atmung. Anschließend wurde zur Analyse der reinen

Komplex II-abhängigen „State 3“-Atmung der Komplex I durch Zugabe des spezifischen Inhibitors Rotenon (2 μ M) gehemmt.

Die Qualität der isolierten Mitochondrien wurde anhand der Atmungskontrollrate (engl. „respiration control ratio“ oder kurz RCR) bestimmt. Dies ist der Quotient aus „State 3“- und „State 4“-Atmung, der laut Gredilla $3,6 \pm 0,2$ bei *P. anserina* Wildtyp-Mitochondrien beträgt (Gredilla *et al.*, 2006). Die aufgezeichneten Daten wurden unter Verwendung der Herstellersoftware DatLab 6 bearbeitet und analysiert. Je Stamm oder Wirkstoff wurden mindestens drei biologische Replikate (Mitochondrien aus einem Myzel-Gemisch von drei Isolaten) untersucht, indem mindestens drei Messungen (technische Replikate) durchgeführt wurden.

Simultane Membranpotential- und Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien

Zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials (mtMP) wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation simultane Membranpotential- und Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien an einem Fluo-Respirometer Oxygraph-2k (Serie G) der Firma Oroboros Instruments etabliert, ein Respirometer, welches um ein Fluoreszenzmodul mit zwei Fluoreszenzsensoren erweitert ist.

Da diese Messungen bislang nur in wenigen Systemen und auch nicht in *P. anserina* etabliert sind, mussten Vorversuche durchgeführt werden. Diese wurden zusammen mit Vertretern der Firma Oroboros, Herrn Prof. Dr. Erich Gnaiger und Herrn Dr. Gerhard Krumschnabel, geplant. Laut deren Aussagen sind zwei verschiedene Fluorophore geeignet, um das mtMP parallel zu der Cl⁻-abhängigen OCR zu messen: Zum einen Safranin-O und zum anderen Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM). Für beide Fluorophore sind entsprechende Sensoren mit Filtern von Oroboros Instruments entwickelt worden.

Safranin-O ist ein Indamin-Farbstoff, der in der Histologie und Zytologie verwendet wird und seit langem als Fluorophor für die Messung des mitochondrialen Membranpotentials etabliert ist. Die Wellenlänge der Anregung von Safranin-O liegt bei 495 nm und die der Emission bei 587 nm. Der Rhodamin-Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) ist ein weiteres Fluorophor zur Messung des mitochondrialen Membranpotentials. Im Fall von TMRM erfolgt die Anregung bei einer Wellenlänge von 530 ± 21 nm und die Emission bei 592 ± 22 nm.

Da nicht beide Fluorophore aufgrund von toxischen Wirkungen in jedem Organismus gleich gut verwendbar sind, wurden vor den eigentlichen Messungen Tests zur Ermittlung des in *P. anserina* geeignetsten Fluorophors durchgeführt. Die toxische Wirkung wurde in Analysen mit Mitochondrien aus der Hirnrinde von Ratten in Form einer Reduktion der OCR um bis zu 35 % im

Fall von Safranin-O beschrieben (Chowdhury *et al.*, 2015). Daher wurde zunächst der Einfluss von ansteigenden Safranin-O- sowie TMRM-Konzentrationen auf die OCR von isolierten Wildtyp-Mitochondrien von *P. anserina* untersucht und eine Abnahme der OCR ermittelt. Diese Abnahme ist bei der Verwendung von TMRM geringer als mit Safranin.

Zusammen mit Firmenvertretern von Oroboros (Herr Prof. Dr. Erich Gnaiger und Herr Dr. Gerhard Krumschnabel) wurden die Messergebnisse beurteilt und beide Fluorophore erwiesen sich für die mtMP-Messungen mit *P. anserina*-Mitochondrien als geeignet, da die inhibierende Wirkung auf *P. anserina*-Mitochondrien nicht ausgeprägt war. Für die Messungen mit Safranin-O wurde eine Konzentration von 2 μM gewählt, wie sie schon in anderen Organismen verwendet wird. Im Falle von TMRM wurden weitere Tests durchgeführt, um eine optimale Konzentration zu ermitteln. Dabei zeigten Konzentrationen bis 2 μM keinen inhibitorischen Effekt auf die OCR. Eine Konzentration von 1,5 μM TMRM stellte sich im Laufe der Test-Messungen als die geeignetste heraus (Abbildung 12). Da die Antwort auf mtMP-Änderungen in Form einer Veränderung der gemessenen Fluoreszenz mit TMRM schneller als mit Safranin erfolgte, wurde für die Messungen im Rahmen dieser Arbeit TMRM verwendet.

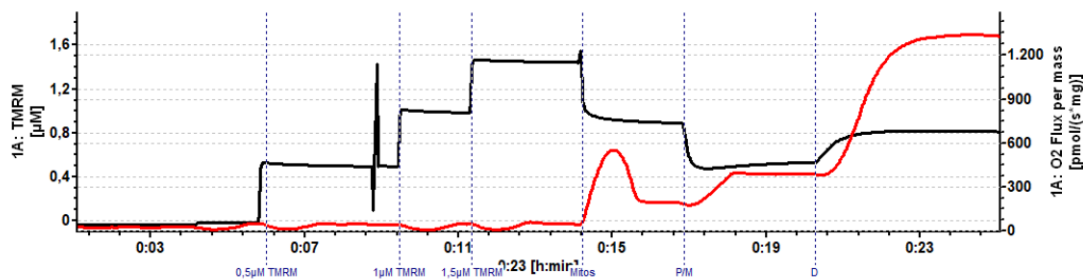


Abbildung 12: Simultane mtMP- und OCR-Messung mit isolierten Wildtyp-Mitochondrien. Ausschnitt aus einer simultanen mtMP- und OCR-Messung mit isolierten Wildtyp-Mitochondrien von *P. anserina* und 1,5 μM TMRM. Die gestrichelten senkrechten Linien markieren die Punkte der einzelnen Zugaben. Der schwarze Graph zeigt die TMRM-Konzentration (μM) in der Kammer an, abzulesen an der linken y-Achse. Durch den roten Graphen wird die OCR in $\text{pmol}/(\text{s} \cdot \text{mg})$ angezeigt, abzulesen an der rechten y-Achse.

Vor Beginn der eigentlichen Messung wurde, wie bei den alleinigen OCR-Messungen, beide Kammern des Oroboros mit O_2 -Puffer gefüllt und die Kammern zur Sauerstoffsättigung nur teilweise verschlossen. Danach wurde schrittweise (0,5 μM Schritte) das Fluorophor bis zum Erreichen der Endkonzentration hinzugegeben und ein linearer Anstieg der Fluoreszenz detektiert (vgl. schwarze Kurve in Abbildung 12). Dieser Anstieg spiegelt die Konzentration des Fluorophors in der Kammer wieder. Anschließend wurden, entsprechen des Vorgehens bei den OCR-Messungen, nacheinander isolierte Mitochondrien (Mitos), Komplex I-spezifische Substrate (P/M) und ADP (D) hinzugegeben, jeweils nach Erreichen eines konstanten Sauerstoffverbrauches. Durch die Zugabe

der Substrate werden Protonen über die innere Mitochondrienmembran transportiert und das mtMP wird aufgebaut. Entsprechend des ansteigenden mtMPs akkumuliert das Fluorophor in der Mitochondrien-Matrix und das Fluoreszenzsignal nimmt ab (vgl. Abbildung 12). Die ADP-Zugabe stimuliert die F_0F_1 -ATP-Synthase, wodurch das mtMP teilweise wieder abgebaut wird. Dadurch tritt das Fluorophor wieder aus den Mitochondrien aus und das Fluoreszenzsignal steigt wieder an (vgl. Abbildung 12). Die aufgezeichneten Daten wurden unter Verwendung der Herstellersoftware DatLab 6 bearbeitet und analysiert.

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

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele sowie das Mini-Protean System (BioRad) verwendet. Standardmäßig wurden 12%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Zusammensetzung für je zwei Gele ist in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Pipettierschema für zwei 12%ige SDS-Polyacrylamidgele.

| Komponenten | Sammelgel (5 %) | Trenngel (12 %) |
|--|-----------------|-----------------|
| Rotiphorese® Gel 40 (40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)) | 500 µl | 3 ml |
| 4 x Sammelgel- bzw. Trenngelpuffer | 1 ml | 2,5 ml |
| H ₂ O | 2,4 ml | 4,5 ml |
| TEMED | 5 µl | 5 µl |
| 10 % APS | 50 µl | 50 µl |

Je Probe wurden 100 µg Gesamtproteinextrakt oder mitochondrialer Proteinextrakt in 1 x SDS-Probenpuffer bei 95 °C für 10 min denaturiert und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte das Beladen der Geltaschen mit den Proteinproben sowie 1,5 µl des Protein-Größenstandards (Tabelle 9). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V in 1 x Laufpuffer mit 0,1 % SDS, für ca. 1,5-2 Stunden bis die Blau-Front des Ladepuffers aus dem Gel ausgetreten war. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran (Tabelle 11) durch Western-Blot und dem „Wet-/Tank-Blot“ Verfahren. Hierzu wurde zunächst eine auf die Gel-Größe zugeschnittene PVDF-Membran für 30 sec in 100 % Methanol aktiviert, kurz in H₂O gewaschen und anschließend 5-15 min in „Blotting“-Puffer inkubiert. Die SDS-Gele und je zwei Schwämme und Whatman-Papiere pro Gel wurden ebenfalls in „Blotting“-Puffer inkubiert bzw. getränkt. Die Transferapparatur wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut (Reihenfolge: Schwamm, Whatman-Papier, SDS-Gel, PVDF-Membran, Whatman-Papier, Schwamm) und mit gekühltem „Blotting“-Puffer befüllt. Der Transfer erfolgte bei 4 °C für 1 h bei 100 V. Zur Fixierung wurde die Membran anschließend für 30 sec in 100 % Methanol gelegt,

kurz mit H₂O und 1 x PBS gewaschen und entweder sofort zur Immunodetektion eingesetzt oder bei 4 °C gelagert.

Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Um die aufgetrennten Proteine im Polyacrylamidgel sichtbar zu machen, wurde das Gel für 30 min in Görg-Coomassie-Färbelösung (Tabelle 4) inkubiert. Überschüssiges Coomassie wurde anschließend durch mehrmaliges Waschen mit H₂O oder Görg-Coomassie-Entfärbler (Tabelle 4) entfernt.

Immunodetektion von Proteinen

Für die Detektion spezifischer Proteine wurde die PVDF-Membran zunächst zur Absättigung 1 h bei RT in Odyssey „Blocking“-Puffer inkubiert und anschließend ü. N. bei 4 °C oder für 1 h bei RT mit 10 ml des jeweiligen Primärantikörpers (verdünnt in Odyssey „Blocking“-Puffer mit 0,1 % Tween20) inkubiert. Anschließend wurde ungebundener Primärantikörper durch viermaliges Waschen mit 1 x PBS + 0,1 % Tween20 für je 5 min bei RT entfernt. Die Inkubation mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (verdünnt in Odyssey „Blocking“-Puffer mit 0,1 % Tween20 und 0,02 % SDS) erfolgte für 1 h unter Lichtausschluss bei RT. Erneut wurde ungebundener Antikörper durch viermaliges Waschen mit 1 x PBS + 0,1 % Tween20 für je 5 min bei RT entfernt und im Anschluss die Membran in 1 x PBS gelagert. Anschließend wurde die Membran mit Hilfe eines Infrarotscanners, der den Infrarotfluoreszenz-Farbstoff des gebundenen Sekundärantikörpers sichtbar macht, analysiert.

Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von nativen Proteinen wurden native Polyacrylamidgele sowie das Mini-Protean System (BioRad) verwendet. Standardmäßig wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Die Zusammensetzung für je zwei Gele ist in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Pipettierschema für zwei native 10%ige Polyacrylamidgele.

| Komponenten | Sammelgel (5 %) | Trenngel (10 %) |
|---|-----------------|-----------------|
| Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid/Bisacrylamid) | 850 µl | 3,3 ml |
| 1,5 M Tris/HCl, pH 8,9 | 850 µl | 2,2 ml |
| H ₂ O | 3,3 ml | 4,5 ml |
| TEMED | 5 µl | 16,7 µl |
| 10 % APS | 50 µl | 50 µl |

Zur Vorbereitung der zu untersuchenden Proteinproben wurden diese mit 1 x nativem Stopper versetzt und bis zum Beladen der Geltaschen auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1 x Laufpuffer ohne SDS je nach weiterer Verwendung entweder 2 h bei 100 V und RT (Superoxid-Dismutase-Aktivitätsgele) oder 16 h bei 70 V und 4 °C (Katalase-/Peroxidase-Aktivitätsgele).

„In-Gel“-Superoxid-Dismutase-Aktivitätsfärbung

Zum Nachweis der Superoxid-Dismutase-Aktivitäten (SOD-Aktivitäten) in nativem Gesamtprotein oder mitochondrialem Proteinextrakten wurde eine Methode nach Flohé und Otting verwendet (Flohé und Otting, 1984). Dazu wurden je Probe 100 µg Gesamtproteinextrakt (SOD1- und SOD2-Aktivität) oder mitochondrialer Proteinextrakt (SOD3-Aktivität) elektrophoretisch auf zwei nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde ein Gel als Ladekontrolle mit Görg-Coomassie-Färbelösung gefärbt und das andere Gel für die SOD-Aktivitätsfärbung verwendet. Dazu wurde es für 20 min in 10 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) mit 400 µl NBT-Lösung (50 mg/ml) unter Ausschluss von Licht schüttelnd inkubiert. Die Lösung wurde durch 10 ml Kaliumphosphatpuffer (pH 7,8) mit 200 µl Riboflavin (1 mg/ml) und 10 µl TEMED ersetzt und das Gel erneut 20 min unter Ausschluss von Licht schüttelnd inkubiert. Um die Reaktion zu starten, wurde das Gel anschließend auf einem Leuchttisch 5-20 min geschwenkt.

Die Methode beruht auf der Tatsache, dass Riboflavin zusammen mit dem Katalysator TEMED in Verbindung mit Licht Superoxid bildet. Dieses ist zum einen das Substrat der SODs und zum anderen kann es mit NBT reagieren, wodurch sich das Gel durch sich bildendes NBT-Diformazan violett verfärbt. In Bereichen mit einer aktiven SOD wird das Superoxid durch diese abgebaut, sodass keine violette Färbung durch Reaktion mit NBT entsteht und dort das Gel ungefärbt bleibt.

Die hellen, von der NBT-Färbung ausgesparten, Gelbereiche zeigten eine SOD-Aktivität an. Zur Dokumentation wurde das Gel zeitnah eingescannt.

„In-Gel“-Katalase- und Peroxidase-Aktivitätsfärbung

Zum Nachweis der Katalase- und Peroxidase-Aktivitäten in nativem Gesamtprotein wurde eine Doppel-Färbungsmethode nach Wayne und Diaz (1986) verwendet, welche auf Methoden von Woodbury *et al.* (1971) und Tsang *et al.* (1983) beruht. Dazu wurden je Probe 30 µg nativer Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch auf drei nativen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde ein Gel als Ladekontrolle mit Görg-Coomassie-Färbelösung gefärbt und die beiden anderen Gele für die Aktivitätsfärbungen verwendet.

Für die Katalase-Aktivitätsfärbung wurde das Gel zunächst dreimal für je 10 min mit H₂O gewaschen. Es folgte eine Inkubation in 30 ml H₂O mit 30 µl 30 % Wasserstoffperoxid für 30 min unter Ausschluss von Licht. Durch dreimaliges gründliches Waschen mit H₂O wurde das Wasserstoffperoxid entfernt und das Gel in 20 ml frisch angesetzter Katalase-Färbelösung (je 10 ml beider Komponenten) für 5-10 min auf einem Leuchttisch inkubiert. Nach dem Erscheinen einer deutlichen grünen Färbung wurde die Lösung abgegossen, das Gel gründlich mit H₂O gewaschen und zur Dokumentation und Auswertung eingescannt. Die ungefärbten Bereiche im Gel zeigen die Aktivität von Katalasen an.

Während der Inkubation mit Wasserstoffperoxid bauen aktive Katalasen dieses ab und es entstehen winzige Gasbläschen im Gel. Aufgrund der Reaktion der Komponenten der Färbelösung bildet sich ein homogener grüner Niederschlag, der das Gel dunkel färbt. An Stellen mit Gasbläschen bleibt das Gel ungefärbt, wodurch aktive Katalasen erkennbar sind.

Für die Peroxidase-Aktivitätsfärbung wurde das dritte Gel zunächst dreimal für je 10 min in 1 x PBS (pH 7,4) gewaschen. Es folgte eine schüttelnde Inkubation in 30 ml 1 x PBS (pH 7,4) mit 30 µl 30 % Wasserstoffperoxid und 30 mg DAB bis braune Banden sichtbar wurden (ca. 20-40 min). Anschließend wurde das Gel gründlich mit H₂O gewaschen und zur Dokumentation und Auswertung eingescannt. Die braunen Banden zeigen die Anwesenheit aktiver Peroxidasen an.

Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Für die native gelelektrophoretische Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe wurde die Methode der blau-nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach Wittig *et al.* (2006) verwendet. Es wurde die Elektrophorese-Kammer „Protean® II“ (Bio-Rad) nach Herstellerangaben mit 4-13%igen biphasischen BN-Trenngelen und 3,5%igen BN-Sammelgelen (Zusammensetzung siehe Tabelle 15) verwendet.

Tabelle 15: Pipettierschema für ein 3,5-14%iges blau-natives Polyacrylamidgel.

| Komponenten | Trenngel (4 %) | Trenngel (13 %) | Sammelgel (3,5 %) |
|---|----------------|-----------------|-------------------|
| 86 % Glycerin | - | 2,96 g | - |
| Rotiphorese® Gel A (30 % Acrylamid) | 1,92 ml | 0,7136 ml | 1,6975 ml |
| Rotiphorese® Gel 40 (40 % Acrylamid/Bisacrylamid) | - | 4,28 ml | - |
| Rotiphorese® Gel 2 (2 % Bisacrylamid) | 0,889 ml | - | 0,7875 ml |
| 3 x BNP-Puffer | 4,94 ml | 4,94 ml | 5 ml |
| H ₂ O | 7 ml | ad 15 ml | 7,385 ml |
| 10 % APS | 6,8 µl | 4,1 µl | 11,9 µl |
| TEMED | 68 µl | 41 µl | 119 µl |
| Gesamt: | 14,82 ml | 15,045 ml | 15 ml |

Als Vorbereitung für die Auftrennung wurden die mitochondrialen Membranproteine mit Digitonin im Verhältnis 3:1 (w/w) solubilisiert. Dazu wurden pro Probe 100 µg mitochondrialer Proteinextrakt in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß pelletiert und anschließend in 27 µl Solubilisierungspuffer mit Protease-Inhibitor Cocktail resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl 10%igem Digitonin wurden die Proben kurz vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 min bei 15000 Upm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand mit den solubilisierten Proteinkomplexen wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 3,5 µl 50%igem Glycerin und 1,5 µl 5%igem Coomassie versetzt. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden diese mit 1 x BNP-Puffer gespült, um störende nicht auspolymerisierte Acrylamidreste zu entfernen und im Anschluss wurden die Proben sowie 7 µl eines nativen Markers (Tabelle 9) auf das Gel aufgetragen. Der Anodentank war mit 3 l Anodenpuffer befüllt und der Kathodentank zunächst mit dem Kathodenpuffer B. Der erste Teil der Auftrennung, das Einwandern der Proben in das Gel, erfolgte für etwa 1,5 h bei 100 V und 10 mA pro Gel bei 4 °C. Anschließend wurde die Spannung auf 500 V, bei einer maximalen Stromstärke von 15 mA pro Gel, erhöht. Nachdem die Proben nach weiteren 1,5-2 h die Hälfte des Gels durchwandert hatten, wurde der Kathodenpuffer B durch Kathodenpuffer B10 ersetzt und die Auftrennung bei gleicher Spannung und Stromstärke wie zuvor fortgesetzt. Beendet wurde die Auftrennung nach dem Auslaufen der Coomassie-Front aus dem Gel. Anschließend erfolgte entweder die Visualisierung und Zuordnung aller Komplexe mit einer Coomassie-Färbung Krause *et al.* (2004) oder es wurden komplex-spezifische Färbungen (siehe „In-Gel“-Färbungen von Komplexen der Atmungskette) durchgeführt. Zur Dokumentation und Auswertung wurde das Gel eingescannt.

„In-Gel“-Färbung von Komplexen der Atmungskette

Die „In-Gel“-Komplex I (NADH-Dehydrogenase)-Färbung erfolgte nach einer Methode von Jung *et al.* (2000). Dafür wurde das Gel oder ein Teil des Gels in Komplex I-Färbelösung (Tabelle 4) für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Durch die Komplex I-Aktivität wird das zugegebene NADH zu NAD⁺ oxidiert und das NBT²⁺ wird in violette Formazan (NBT) umgewandelt, wodurch eine violette Färbung entsteht.

Die „In-Gel“-Komplex II (Succinat-Dehydrogenase)-Färbung erfolgte nach einer neu etablierten Methode von Jung *et al.* (2000). Dazu wurde das Gel oder auch nur ein Teil eines Gels in Komplex II-Färbelösung (Tabelle 4) unter Ausschluss von Licht inkubiert bis violett-blaue Banden erscheinen. Durch die Komplex II-Aktivität wird das zugegebene Succinat zu Fumarat umgewandelt, wobei FAD zu FADH₂ reduziert wird. Von dem FADH₂ werden zwei Elektronen durch den Elektronenüberträger

Phenazine-Methosulfat auf NBT übertragen, welches dadurch zu Formazan reduziert wird und eine violette Färbung bildet.

Die „In-Gel“-Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase)-Färbung erfolgte nach der Methode von Jung *et al.* (2000). Dazu wurde das Gel oder auch nur ein Teil eines Gels in Komplex IV-Färbelösung (Tabelle 4) bei RT im Dunkeln so lange inkubiert, bis bräunliche Banden sichtbar wurden. Die Färbelösung enthält u. a. oxidiertes Cytochrom c und DAB. Letzteres wird durch Cytochrom c oxidiert. In Bereichen mit Komplex IV-Aktivität wird Cytochrom c schnell reoxidiert, wodurch das oxidierte DAB akkumulieren und komplexieren kann und ein unlösliches braunes Präzipitat im Gel bildet. Die so entstehenden bräunlichen Banden zeigen die Anwesenheit von Komplex IV an.

Die „In-Gel“-Komplex V-Färbung erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Wittig und Schägger (2005) und Suhai *et al.* (2009). Dazu wird das Gel oder nur ein Teil eines Gels für 30 min in einer ATPase-Färbelösung (Tabelle 4) inkubiert. Durch zweimaliges Waschen mit H₂O und einer 10-minütigen Inkubation mit 50 % Methanol wird die Färbereaktion gestoppt.

Durch eine anschließende kurze Färbung (max. 10 s) mit einer 1%igen Ammoniumsulfid-Lösung werden Komplex V-Monomere und-Dimere als braune Banden im Gel sichtbar, aufgrund der Hydrolyse-Aktivität der F₀F₁-ATP-Synthase, die unter Freisetzung von Phosphat ATP zu ADP dephosphoryliert. Das freie Phosphat reagiert mit dem im Puffer enthaltenen Bleinitrat zu schwerlöslichem Bleiphosphat, welches als weißes Präzipitat ausfällt. Durch das Ammoniumsulfid bildet sich im Anschluss Bleisulfid, welches die bräunliche Färbung verursacht.

Zur Dokumentation und Auswertung wurden alle gefärbten Gele eingescannt.

Zweidimensionale- (2D-) Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF). Hierzu wurden 7 cm lange immobilisierte pH-Gradienten-Streifen („ReadyStrip“, IPG-Streifen, pH 3-10, nicht linear) von BioRad nach Herstellerangaben verwendet. Je Probe wurden 450 µg mitochondrialen Proteinextraktes (jeweils gemischt aus drei verschiedenen Individuen desselben Stammes) in 95 µl IEF-Puffer (Tabelle 4) gelöst. Zur Rehydrierung der IPG-Streifen wurde die Proteinlösung in eine Fokussierungsschale pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten daraufgelegt. Nachdem der Gelstreifen die Proteinlösungen vollständig aufgenommen hatte, wurden 30 µl IEF-Puffer unter den Gelstreifen gegeben und erneut inkubiert, bis das Volumen vollständig aufgesogen wurde. Nach dieser Rehydrierung war das Proteingemisch gleichmäßig im IPG-Streifen verteilt und es folgte ü. N. die isoelektrische Fokussierung (Protean IEF cell, BioRad). Zur Vorbereitung wurden die Elektroden mit 5 µl H₂O auf Filterpapierstückchen bedeckt, damit der Kontakt zwischen Gelstreifen und Elektrode gewährleistet ist. Nun wurde der rehydrierte IPG-

Streifen mit der Gelseite nach unten auf die Filterpapierstücke gelegt, wobei es wichtig war auf die Orientierung zu achten (niedriger pH zu „+“ und hoher pH zu „-“). Um eine Austrocknung oder Oxidation des IPG-Streifens während der isoelektrischen Fokussierung zu vermeiden, wurde der Streifen mit 1,5 ml Mineralöl überschichtet. Je verwendetem IPG-Streifen betrug die Stromstärke 50 μ A. Die Fokussierung verlief zunächst für 15 min bei 250 V mit schnellem Spannungsanstieg. Danach wurde die Spannung für 1 h auf 4000 V mit einem linearen Spannungsanstieg erhöht und die Spannung bis zum Erreichen von 20000 Vh beibehalten. Während der gesamten isoelektrischen Fokussierung betrug die Temperatur 20 °C. Für die Auftrennung in der zweiten Dimension, der Auftrennung nach Molekulargewicht über ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (Zusammensetzung siehe Tabelle 13) mussten die IPG-Streifen anschließend mit den nun fokussierten Proteinen äquilibriert werden. Dazu wurden sie 15 min in Äquilibrierungspuffer (Tabelle 4) mit 2 % DTT inkubiert, wobei die Disulfidbindungen reduziert werden und Thiol-Gruppen entstehen. Um die entstandenen Thiol-Gruppen zu alkylieren erfolgte eine weitere 15-minütige Inkubation mit Äquilibrierungspuffer mit 2,5 % Iodoacetamid. Zusätzlich wurden die Proteine durch im Äquilibrierungspuffer enthaltenes SDS denaturiert. Zur Auftrennung wurden die äquilibrierten IPG-Streifen, mit der Orientierung niedrigster pH nach links, auf ein SDS-Polyacrylamidgel (ohne Sammelgel) gelegt und zur Fixierung mit Überschichtungslösung für IPG-Streifen, die mit 2%iger Bromphenolblaulösung angefärbt war, überschichtet. Vor dem Überschichten wurde noch ein Filterpapierstück mit 7 μ l Proteinmarker (Tabelle 9) neben den Streifen gelegt. Nachdem die Lösung ausgehärtet war, wurde die Elektrophorese im Elektrophorese-System „Mini-Protean® II“ (BioRad) bei 200 V gestartet und nach Austreten der Bromphenolblau-Front aus dem Gel gestoppt. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und nach dem Entfärben zur Dokumentation und Analyse eingescannt.

3.2.3 Statistische Auswertung

Je nach Methode und Proben-Anzahl wurden verschiedene statistische Auswertungen verwendet, welche im Folgenden aufgelistet sind. Die Signifikanz ist als p -Wert mit „*“ gekennzeichnet: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$.

Für die statistische Auswertung der Lebensspannen wurde die Software SPSS statistics 19 (IBM) verwendet und das Überleben nach Kaplan-Meier analysiert. Die Signifikanzen wurden mit drei unabhängigen paarweisen Statistiktests (Log-Rank, Breslow und der Tarone-Ware) ermittelt. In den Abbildungslegenden wird nur der p -Wert, welcher mit dem Log-Rank-Test ermittelt wurde, angegeben, alle anderen Werte befinden sich im Anhang (Tabellen S1-S3).

Zur statistischen Auswertung der mittleren Lebensspanne, Wachsraten, Western-Blot-Analysen und OCR-Messungen wurde der zweiseitige Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet.

Im Falle der BN-PAGE Analysen, ATP-Messungen und H₂O₂-Messungen wurde zur statistischen Auswertung der gepaarte „Student's t Test“ verwendet.

In den Abbildungen bzw. den Abbildungslegenden werden nur die signifikanten Unterschiede durch „*“ gekennzeichnet, jedoch nicht erneut auf die verwendete Berechnung der *p*-Werte eingegangen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Modulation von Alterungsprozessen durch genetische Veränderungen: Induktion von Kompensationsmechanismen zum Erhalt der Mitochondrienfunktion

In der Regulation des Alterungsprozesses spielen Mitochondrien und deren Qualität eine zentrale Rolle (zusammengefasst in: Fischer *et al.* (2012) und Osiewacz (2002)). Die Qualität wird durch ein komplexes Netzwerk an Reaktionswegen kontrolliert. Im Rahmen von gezielten Modulationen dieser mitochondrialen Qualitätskontroll-Mechanismen wurden nicht immer die erwarteten Ergebnisse erzielt. So führten die Deletionen von einzelnen Genen wichtiger Komponenten der Qualitätskontrolle zu unerwarteten Phänotyp (Fischer *et al.*, 2013; Weil *et al.*, 2011; Zintel *et al.*, 2010). Beispielsweise führt die Deletion des Gens der einzigen mitochondrialen Superoxid-Dismutase (PaSOD3) zu einer nicht erwarteten unveränderten Lebensspanne (Zintel *et al.*, 2010).

Im Genom von *P. anserina* sind drei SODs kodiert. Eine Cu-/Zn-SOD, die PaSOD1, welche im Zytosol lokalisiert ist und vermutlich auch in den Intermembranraum der Mitochondrien translozieren kann (Zintel *et al.*, 2010). Die Mn-SOD, PaSOD2, welche im ER lokalisiert ist und in den Extrazellularraum sekretiert werden kann (Zintel *et al.*, 2010). Und eine weitere Mn-SOD, die PaSOD3, welche in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist (Zintel *et al.*, 2010).

In einer vorangegangenen Doktorarbeit wurde neben einer erhöhten extrazellulären Superoxid-Menge der *PaSod3*-Deletionsmutante gezeigt, dass die unerwartete Lebensspanne von einer intakten Autophagie-Maschinerie abhängig ist. Darüber hinaus ist in der Deletionsmutante die Mitophagie-Rate signifikant im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Knuppertz, 2017; Knuppertz *et al.*, 2017). Vergleichende Transkriptomanalysen zwischen der *PaSod3*-Deletionsmutante und dem Wildtyp zeigten zudem eine deutliche Hochregulation von Genen der mitochondrialen Atmungskette und des mitochondrialen Metabolismus (Grimm, 2015; Knuppertz *et al.*, 2017).

Um die Rolle der Mitochondrien in der Kompensation des Verlustes der PaSOD3 genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst durch blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette der $\Delta PaSod3$ -Stämme im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Diese Methode trennt Membranproteinkomplexe, wie im vorliegenden Fall mitochondriale Atmungskettenkomplexe, nach Solubilisierung mit Digitonin über ein Gradientengel auf (Schägger *et al.*, 1994; Schägger und von Jagow, 1991; Wittig und Schägger, 2008). Im Vergleich zum Wildtyp zeigt $\Delta PaSod3$ keine Veränderungen der Zusammensetzung der Atmungskettenkomplexe im Coomassie-gefärbten Gel (Abbildung 13A). Die quantitative Auswertung der BN-PAGE durch Densitometrie zeigt, dass die

Menge an mitochondrialen Atmungskettenkomplexen sowie Atmungskettensuperkomplexen (engl. „mitochondrial respiratory supercomplexes“ oder kurz mtRSCs) in $\Delta PaSod3$ im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist (Abbildung 13B).

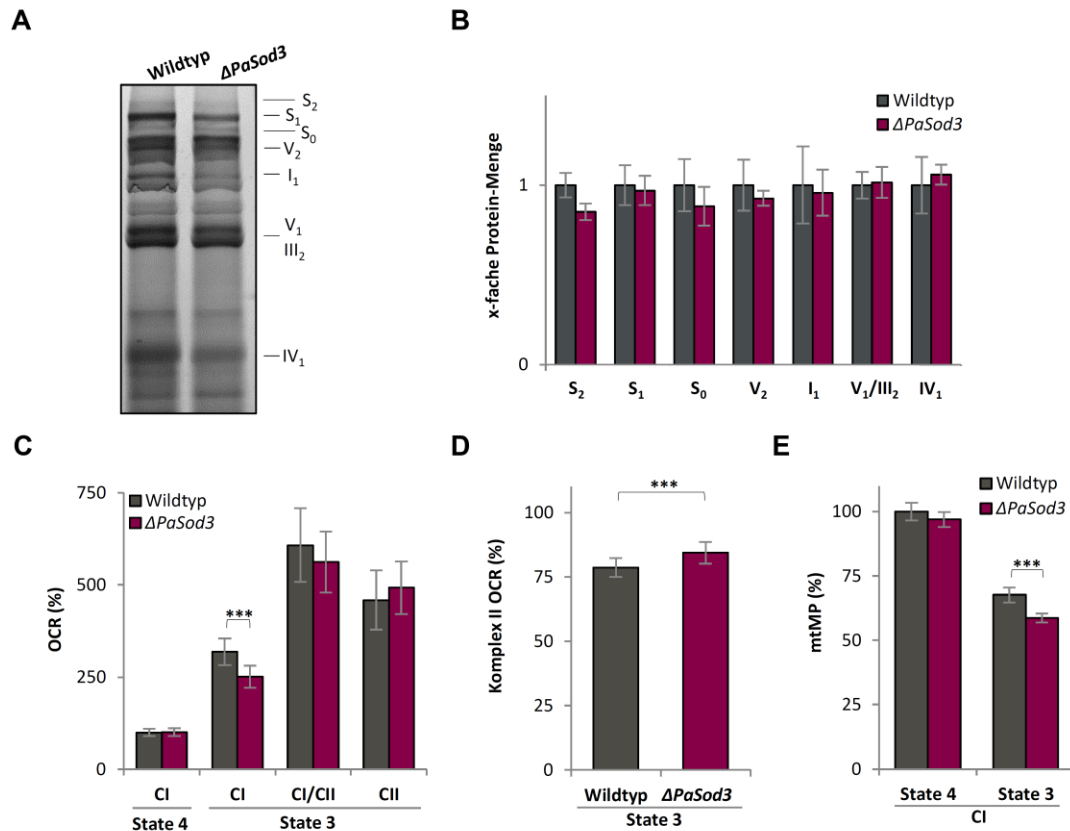


Abbildung 13: Die $PaSod3$ -Deletion führt zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion. (A) Repräsentative BN-PAGE mit je 100 μ g mitochondrialen Proteinextrakten von 7d alten $\Delta PaSod3$ - und Wildtyp-Isolaten (je n = 3). Die $CI_1CI_{III_2}CIV_{0-2}$ (S_{0-2}) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III_2 und V_2) und die monomeren Komplexe I_1 , IV_1 und V_1 wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. **(B)** Densitometrische Auswertung der BN-PAGE in (A). Die Mengen der Komplexe wurden auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Spur normalisiert und relativ zum Mittelwert des Wildtyps berechnet. **(C)** Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien von 7d alten $\Delta PaSod3$ - und Wildtyp-Isolaten. Für jeden Stamm wurden 4 biologische Replikate mit je 3-4 technischen Replikaten analysiert. Alle Werte wurden relativ zum Sauerstoffverbrauch des Wildtyps in „State 4“ berechnet. **(D)** Darstellung des Sauerstoffverbrauchs im „State 3“ über Komplex II. Dazu wurde der Sauerstoffverbrauch nach vollständiger Inhibierung des Komplex I relativ zum Sauerstoffverbrauch über Komplex I und II im „State 3“ berechnet. **(E)** Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (mtMP) von 7d alten $\Delta PaSod3$ - und Wildtyp-Isolaten durch die mtMP-abhängige Akkumulation von TMRM in den Mitochondrien. Es wurden 2 biologische Replikate mit je 6 technischen Replikaten analysiert. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Knuppertz *et al.* (2017).

Unabhängig vom unveränderten Aufbau der mitochondrialen Atmungskette kann der Elektronentransport und somit der Sauerstoffverbrauch der Atmungskette beeinträchtigt sein. Daher wurde die Funktion der mitochondrialen Atmungskette mit Hilfe von Sauerstoffverbrauchs-

Messungen an isolierten Mitochondrien genauer untersucht. Dabei ergaben sich deutliche Unterschiede in den OCRs des Wildtyps und der $\Delta PaSod3$ -Mutante. Während der Komplex I (CI)-abhängige Sauerstoffverbrauch im „State 4“ identisch in beiden Stämmen ist, ist der CI-abhängige Sauerstoffverbrauch von $\Delta PaSod3$ im „State 3“ signifikant verringert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 13C). Diese Verringerung wird durch die Zugabe des Komplex II (CII)-spezifischen Substrates Succinat und der damit einhergehenden zusätzlichen Stimulation des CII-abhängigen Sauerstoffverbrauchs kompensiert (CI/CII in Abbildung 13C). Dies deutet auf eine erhöhte CII-Aktivität und eine daraus resultierende erhöhte CII-assoziierte Atmung in der $PaSod3$ -Deletionsmutante hin. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde der CI-abhängige Sauerstoffverbrauch durch den spezifischen Inhibitor Rotenon gehemmt (CII in Abbildung 13C). Der verbleibende CII-abhängige Sauerstoffverbrauch ist in $\Delta PaSod3$ signifikant um 5 % höher als im Wildtyp (Abbildung 13D). Dies zeigt, dass die CII-Aktivität in der Mutante erhöht ist.

Eine Abnahme der CI-assoziierten Atmung sollte aufgrund der geringeren Zahl gepumpter Protonen zu einer Verringerung des mtMP führen. Um den Einfluss der zu CII verschobenen Atmung in $\Delta PaSod3$ auf das mtMP zu untersuchen, wurde zunächst die simultane OCR- und mtMP-Messung, die sogenannte Fluo-Respirometrie, etabliert. Hierbei wird ein Fluoreszenzfarbstoff Membranpotential-abhängig in die Mitochondrien aufgenommen. Das Vorgehen zur Etablierung dieser Messungen ist im Methoden-Teil beschrieben (vgl. Seite 45). Die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM) und damit das mtMP ist in der Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp geringer (Abbildung 13E). Wie es in Säugerzellen gezeigt wurde, kann eine Verringerung des mtMP zu einer Induktion von Mitophagie führen (Chen *et al.*, 2016; Kubli *et al.*, 2015; Narendra *et al.*, 2008).

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit bestätigen erneut die schon seit vielen Jahren bekannte Schlüsselrolle der Mitochondrien im Alterungsprozess. Darüber hinaus wird deutlich, dass die Zelle genetischen Veränderungen durch eine Anpassung der Mitochondrienfunktion kompensieren kann, um die Lebensspanne aufrechtzuerhalten. Daraus ergibt sich die Frage, ob es möglich ist, die Mitochondrienfunktion von außen zu beeinflussen, um so die Lebensspanne zu verändern. Mögliche äußere Einflüsse sind z. B. Bestandteile der täglichen Ernährung oder Stoffe, die als Nahrungsergänzungsmittel aufgenommen werden. In diesem Zusammenhang sind seit vielen Jahren Polyphenole von großem Interesse.

4.2 Modulation von Alterungsprozessen durch exogene Faktoren: Wirkung von Polyphenolen auf die Mitochondrien

Polyphenole werden in der Forschung zur Entwicklung von „anti-Aging“-Theapien und Medikamenten für verschiedene Krankheiten, wie z. B. Krebs, eingesetzt. Trotz des großen Forschungsinteresses sind die grundlegenden Wirkmechanismen der meisten Polyphenole nur teilweise aufgeklärt. Es gibt Hinweise, dass die Mitochondrienfunktion eine Rolle bei einigen dieser Stoffe spielt. Daher ist das Hauptziel der vorliegenden Dissertation die Aufklärung der Rolle von Mitochondrien im Wirkmechanismus der Polyphenole (-)-Gossypol (ab hier nur noch Gossypol), Curcumin und Quercetin und darüber hinaus die Klärung der Frage nach einem allgemein gültigen Wirkmechanismus von Polyphenolen.

4.2.1 Gossypol - H₂O₂ als Signal zur Induktion von Zelltod

Dosis- und Apoptose-abhängige Induktion von programmiertem Zelltod durch Gossypol

Verschiedene Studien an Krebszellen zeigen eine Zelltod-Induktion durch Gossypol (Balakrishnan *et al.*, 2008; Lian *et al.*, 2011; Mani *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2008; Voss *et al.*, 2010; Wolter *et al.*, 2006). Diese Auslösung von Zelltod ist mit einer Depolarisation und Fragmentierung der Mitochondrien assoziiert (Voss *et al.*, 2010). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe (AG) von Herrn Prof. Dr. Donat Kögel, durch Untersuchungen an Glioblastom-Zellen, MEFs (engl. „mouse embryo fibroblast“) und *P. anserina* die Verbindung zwischen Gossypol-induzierter mitochondrialer Dysfunktion und Zelltod aufgeklärt werden. Als Grundlage der Untersuchungen in *P. anserina* dienten die Ergebnisse der Masterarbeit von Nina Meyer (AG Prof. Kögel). Ihre Ergebnisse zeigten, dass die mitochondriale Dysfunktion in den untersuchten Zelllinien auf eine Gossypol-vermittelte Depolarisation der Mitochondrien sowie eine Reduktion des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs zurückzuführen ist (Meyer, 2015; Warnsmann *et al.*, 2018). Diese Effekte wurden in *P. anserina*, einem Modellorganismus der sich besonders für biochemische und physiologische Analysen von isolierten Mitochondrien eignet, genauer untersucht und darüber hinaus weitere Analysen zur Klärung des Wirkmechanismus von Gossypol durchgeführt.

Vor den eigentlichen Analysen wurde zunächst die Aufnahme von Gossypol und die optimale Konzentration für *P. anserina* ermittelt und der Effekt des Lösungsmittels DMSO untersucht, welches später als Kontrolle dient. Dazu wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt, um den Einfluss steigender Gossypol-Konzentrationen auf die Wachstumsrate zu untersuchen. Abhängig von der

Konzentration wurde eine signifikante Abnahme der Wachsrates ermittelt (Abbildung 14A). Diese Abnahme der Wachsrates bestätigt eine Aufnahme des exogenen Gossypols durch *P. anserina*.

Für weitere Analysen wurde eine Gossypol Konzentration von 20 μM verwendet. Diese Konzentration liegt genau zwischen den in den Zelllinien verwendeten Konzentrationen (10-30 μM). Weiterhin liegt diese Konzentration für *P. anserina* im physiologischen Bereich und wirkt nicht toxisch, was aufgrund des geringen Einflusses auf die Wachsrates angenommen werden kann. Entsprechend des zugegebenen Gossypol-Volumens wurde eine DMSO-Konzentration von 0,02 % als Kontrolle verwendet. Die Lebensspanne und Wachsrates von mit 0,02 % DMSO behandelten Wildtyp-Stämmen zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Wildtyp-Stämmen (Abbildung 14B, C). Aufgrund dieser Ergebnisse können Effekte von DMSO ausgeschlossen und davon ausgegangen werden, dass alle durch Gossypol induzierten Effekte allein auf Gossypol beruhen und nicht auf Nebeneffekten von DMSO.

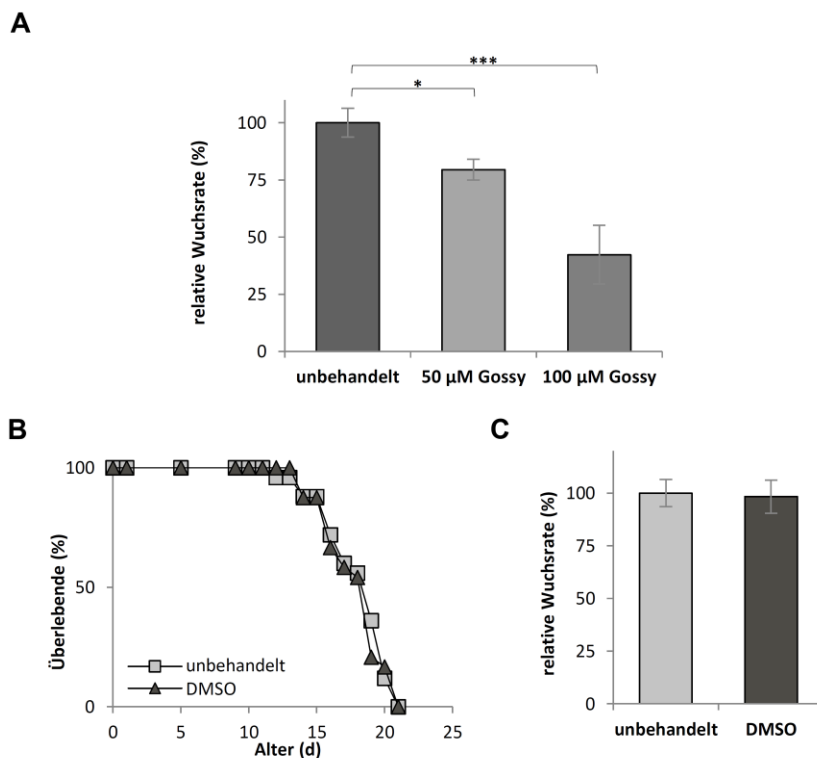


Abbildung 14: Dosis-abhängige Reduktion der *P. anserina*-Wachsrates. (A) Wachsrates des *P. anserina*-Wildtyps auf M2-Medium ohne Zusatz (unbehandelt) oder mit Zusatz von 50 μM bzw. 100 μM Gossypol (je $n = 3$). Der Werte der Gossypol-behandelten Stämme wurden relativ zu den unbehandelten berechnet. **(B)** Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO ($n = 24$) oder ohne Zusatz (unbehandelt; $n = 25$). **(C)** Relative Wachsrates der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der unbehandelten Stämme wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für DMSO relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Zu Beginn der eigentlichen Untersuchungen zur Wirkung von Gossypol in *P. anserina* wurde zuerst der Effekt auf die Lebensspanne analysiert und übereinstimmend zur Zelltod-Induktion in Krebszellen eine Verkürzung der Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps auf M2-Medium mit 20 μM Gossypol beobachtet (Abbildung 15A). Im Vergleich zur Kontrolle wird die Wachstumsrate durch Gossypol (20 μM) nicht beeinflusst, wohingegen die mittlere Lebensspanne signifikant um ca. 10 % von 18 d auf 16 d reduziert wird (Abbildung 15B, C). Diese Lebensverkürzung wurde durch die Behandlung mit einer auf 200 μM erhöhten Gossypol-Konzentration (entsprechend wurde 0,2 % DMSO als Kontrolle verwendet) deutlich verstärkt (Abbildung 15D). Ein Vergleich der mittleren Lebensspanne zeigt eine Verkürzung um 25 % (15 d vs. 20 d) im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 15E). Zusätzlich beeinträchtigt diese hohe Konzentration die Wachstumsrate. Diese ist um 55 %, von 0,62 cm auf 0,34 cm pro Tag, verringert (Abbildung 15F).

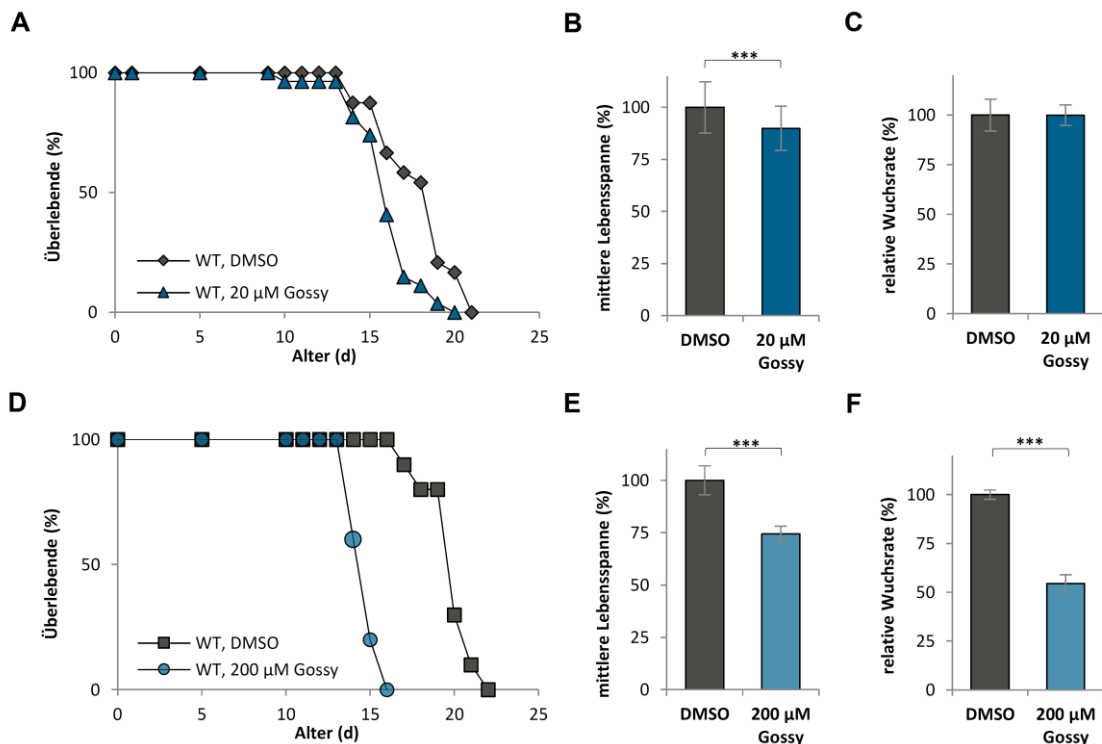


Abbildung 15: Dosis-abhängiger Effekt von Gossypol auf die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps. (A) Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO (n = 24) oder 20 μM Gossypol (Gossy; n = 27; p-Wert = 0,001). **(B)** Mittlere Lebensspanne und **(C)** relative Wachstumsrate der Stämme aus (A). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle \pm Standardabweichung angegeben. **(D)** Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps auf M2-Medium mit 0,2 % DMSO (n = 10) oder 200 μM Gossypol (Gossy; n = 10; p-Wert = 0,000006). **(E)** Mittlere Lebensspanne und **(F)** relative Wachstumsrate der Stämme aus (D). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle \pm Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ***p < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Aus Untersuchungen an verschiedenen Krebs-Zelllinien ist bekannt, dass Gossypol sowohl apoptotischen Zelltod (Antonietti *et al.*, 2016; Balakrishnan *et al.*, 2008; Mani *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2008; Wolter *et al.*, 2006) als auch autophagischen Zelltod, durch vermehrte Autophagie (Lian *et al.*, 2011; Voss *et al.*, 2010), induzieren kann. Daher ist die Gossypol-induzierte Lebensverkürzung in *P. anserina* vermutlich abhängig von einer Induktion von programmiertem Zelltod. Zur Analyse, welche Art von Zelltod durch Gossypol in *P. anserina* ausgelöst wird, wurde als nächstes der Gossypol-induzierte Zelltod in verschiedenen Zelltod-Mutanten untersucht. Zunächst wurde die Rolle einer intakten Autophagie-Maschinerie im Gossypol-induzierten Zelltod analysiert. Dazu wurde der Einfluss von Gossypol auf die *PaAtg1*-Deletion ($\Delta PaAtg1$), eine Autophagie-defiziente Mutante (Knuppertz *et al.*, 2014), untersucht.

Die verschiedenen physiologischen Schritte der Autophagie werden durch die sogenannten „autophagy-related genes/proteins“ (kurz: Atg/ATG) reguliert, von denen 32 identifiziert wurden (Harding *et al.*, 1995; Klionsky *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 1996; Takeshige *et al.*, 1992; Thumm *et al.*, 1994; Tsukada und Ohsumi, 1993). Ein solches, für die Autophagie essentielles, ist Atg1/ATG1, eine Serin-/Threonin-Kinase (Meijer und Codogno, 2004). Es ist Teil des ATG1-Initiierungskomplexes, dessen Ausbildung der initiale Schritt der Autophagie ist (Kamada *et al.*, 2000; Mizushima, 2010; Suzuki *et al.*, 2001).

Ähnlich wie im Wildtyp ist die Lebensspanne von $\Delta PaAtg1$ auf M2-Medium mit 20 μ M Gossypol verkürzt (Abbildung 16A). Die mittlere Lebensspanne ist im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant um 15 %, von 20 d auf 17 d, reduziert (Abbildung 16B). Diese Daten weisen auf einen Autophagie-unabhängigen Gossypol-induzierten Zelltod in *P. anserina* hin. Aufgrund dieser Unabhängigkeit wurde als nächstes die Abhängigkeit des Gossypol-induzierten Zelltod von einer intakten Apoptose-Maschinerie analysiert. Dazu wurde die Induktion von Zelltod durch Gossypol in einer Deletion der Metacaspase *PaMca1* ($\Delta PaMca1$) untersucht.

Metacaspasen sind die Sequenzhomologen von Säuger-Caspasen in Pflanzen und Pilzen (Uren *et al.*, 2000). Sie werden in Typ I- und Typ II-Metacaspasen eingeteilt, analog zu der Einteilung in Initiator- und Effektor-Caspasen in Säugern. In Pilzen wurden bisher nur Typ I-Metacaspasen gefunden (Tsiatsiani *et al.*, 2011). Das Genom von *P. anserina* kodiert für zwei Metacaspasen, PaMCA1 und PaMCA2, wobei PaMCA1 vermutlich die wichtigere der beiden Metacaspasen ist (Hamann *et al.*, 2007; Scheckhuber *et al.*, 2007). Analog zu den Säuger-Caspasen induzieren die Metacaspasen in Pflanzen und Pilzen programmierten Zelltod.

Im Gegensatz zum Wildtyp wird die Lebensspanne in dieser Mutante durch 20 μ M Gossypol nicht beeinflusst (Abbildung 16C). Die mittlere Lebensspanne liegt unverändert bei 20 d im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 16D). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass der Gossypol-induzierte Zelltod und die damit verbundene Lebensverkürzung in *P. anserina* Metacaspase 1-abhängig ist, durch Gossypol also ein apoptotischer Zelltod induziert wird.

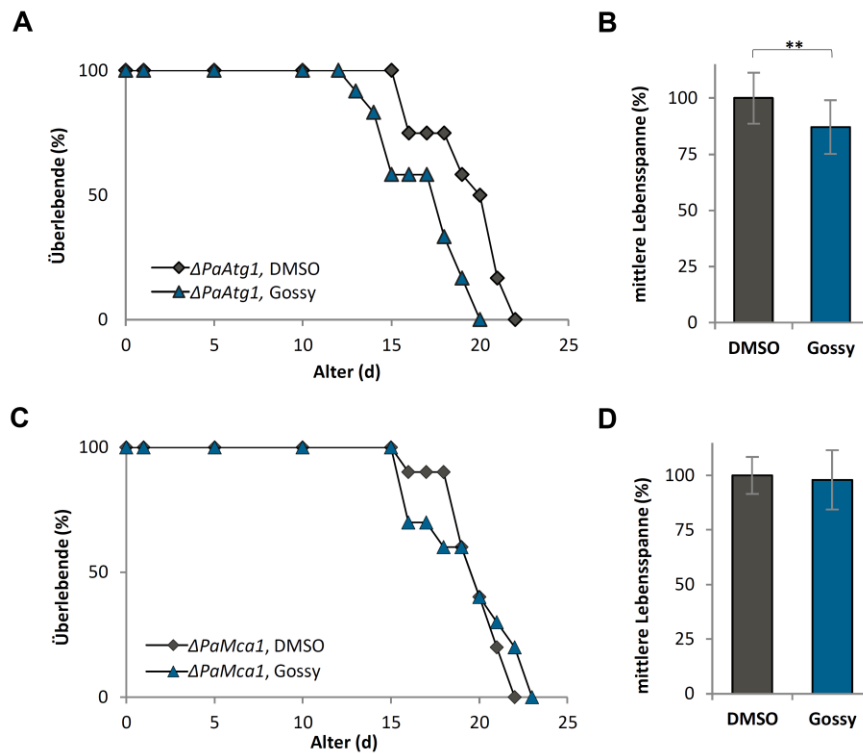


Abbildung 16: Induktion von apoptotischem Zelltod durch Gossypol. (A) Lebensspanne der *PaAtg1*-Deletionsmutante auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO (n = 12) oder 20 µM Gossypol (Gossy; n = 12; p-Wert = 0,004). **(B)** Mittlere Lebensspanne und Wachstumsrate der Stämme aus (A). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle ± Standardabweichung angegeben. **(C)** Lebensspanne der *PaMca1*-Deletionsmutante auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO (n = 10) oder 20 µM Gossypol (Gossy; n = 10; p-Wert = 0,61). **(D)** Mittlere Lebensspanne und der Stämme aus (C). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle ± Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit „**“ gekennzeichnet. **p < 0,01. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Induzierte mitochondriale Dysfunktion durch Langzeit-Inkubation mit Gossypol

Da die Zelltod-Induktion in Glioblastom-Zellen mit einer mitochondrialen Dysfunktion einhergeht (Meyer, 2015; Voss *et al.*, 2010; Warnsmann *et al.*, 2018) und in *P. anserina* und anderen Pilzen eine Verbindung zwischen der Lebensspanne und der Mitochondrienfunktion bekannt ist (Francis *et al.*, 2007; Gredilla *et al.*, 2006; Kurashima *et al.*, 2013; Scheckhuber *et al.*, 2011), wurde als nächstes der Einfluss von Gossypol auf die Mitochondrien des *P. anserina*-Wildtyps mit Hilfe von OCR-Messungen an isolierten Mitochondrien untersucht.

Die CI-abhängige OCR von frisch isolierten Mitochondrien, welche direkt während der Messungen mit 20 µM Gossypol behandelt wurden (Kurzzeit-Inkubation), war um 60 % im „State 4“ erhöht, im „State 3“ allerdings nicht (Abbildung 17A). Eine mögliche Ursache für eine Erhöhung der „State 4“-Atmung kann u. a. eine Entkopplung der Atmungskette sein. Dabei wird der Elektronentransport von der ATP-Generierung getrennt („entkoppelt“). Dies kann zum einen durch sogenannte Entkoppler-Proteine (engl. „uncoupling proteins“) oder aber durch chemische Entkoppler

(Protonophore), wie FCCP und CCCP, hervorgerufen werden und resultiert in einer Abnahme des mtMP. Folglich wurden zur Überprüfung dieser Möglichkeit simultane OCR- und mtMP-Messungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff TMRM durchgeführt. Übereinstimmend mit sehr frühen Daten aus Untersuchungen mit Ratten (Abou-Donia und Dieckert, 1976; Reyes und Benos, 1988) und mit kürzlich erhaltenen Befunden mit Glioblastom-Zellen (Meyer, 2015; Voss *et al.*, 2010; Warnsmann *et al.*, 2018), reduziert Gossypol auch in *P. anserina* deutlich das mtMP (Abbildung 17B). Das mtMP ist in den Gossypol-behandelten Mitochondrien um 36 % im „State 4“ und 5 % im „State 3“ gegenüber den DMSO-behandelten Mitochondrien reduziert (Abbildung 17B), was auf einen Entkoppler-Effekt von Gossypol hindeutet.

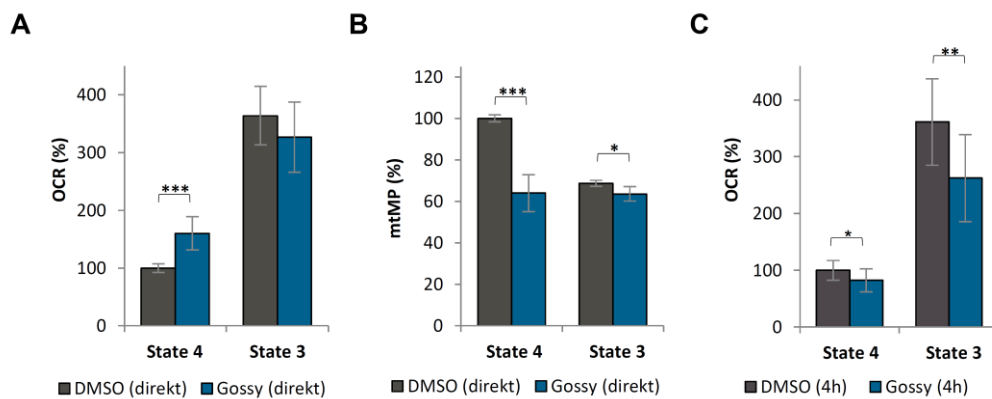


Abbildung 17: Effekt von Gossypol auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von *P. anserina*. (A) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 10 d alten Wildtyp-Isolaten, die während der Messung mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol inkubiert wurden (direkte bzw. Kurzzeit-Inkubation). Es wurden 4 biologische Replikate (Mitochondrien-Präparationen von vier verschiedenen Isolaten) mit je 3-4 technischen Replikaten analysiert. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO-Kontrolle im „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. (B) Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials (mtMP) von 10 d alten Wildtyp-Isolaten nach Kurzzeit-Inkubation durch die mtMP-abhängige Akkumulation von TMRM in den Mitochondrien. Es wurden 2 biologische Replikate mit jeweils 6 technischen Replikaten analysiert und alle Werte relative zur „State 4“-OCR der DMSO behandelten Wildtypen berechnet (C) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien von 10 d alten Wildtyp-Isolaten, die 4 h mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol inkubiert wurden (Langzeit-Inkubation). Es wurden 4 biologische Replikate mit je 3-5 technischen Replikaten analysiert. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO-Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Da Entkopplung über einen längeren Zeitraum negative Konsequenzen für die mitochondriale Funktion hat (Kwon *et al.*, 2011; Nishio und Ma, 2016), wurde im Folgenden die CI-abhängige OCR von isolierten *P. anserina*-Mitochondrien aus 4 h mit 20 μ M Gossypol inkubierten Kulturen analysiert. Diese Langzeit-Inkubation führt tatsächlich zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrien und spiegelt sich in einer Abnahme der OCR sowohl in „State 4“ als auch „State 3“ wider. Im Detail ist die OCR im „State 4“ um 18 % und im „State 3“ um 27 % reduziert (Abbildung 17C).

Da Veränderungen des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs meist aus Veränderungen des Aufbaus der mitochondrialen Atmungskette resultieren, wurde im nächsten Schritt deren Aufbau durch eine BN-PAGE-Analyse mit Mitochondrien aus Wildtypstämmen nach Langzeit-Inkubation mit Gossypol untersucht. Neben der Visualisierung aller (Super-)Komplexe durch Coomassie-Färbung (Abbildung 18A) wurden die einzelnen monomeren und dimeren Komplexe mit Hilfe spezifischer Komplexfärbungen angefärbt (Abbildung 18B-C). Das Coomassie-gefärbte Gel zeigte keine Veränderungen in den monomeren und dimeren Komplexen, welches durch die spezifischen Färbungen der Komplexe I, II, IV und V bestätigt wurde. Auffällig jedoch war ein starker Anstieg der Menge der mitochondrialen Atmungskettensuperkomplexe (mtRSCs) S_2 und S_1 in den Gossypol-behandelten Mitochondrien im Vergleich zu den DMSO-behandelten (rote Pfeile Abbildung 18A).

Die mitochondriale Atmungskette besteht aus fünf Komplexen, Komplex I-V, welche eingebettet in der inneren Mitochondrienmembran vorliegen. Nach dem „plasticity“-Modell können die Atmungskettenkomplexe sowohl frei in der inneren Mitochondrienmembran diffundieren, als auch in stabilen supramolekularen Maschinerien, sogenannte Superkomplexe, assoziiert vorliegen (Acin-Perez *et al.*, 2008; Bianchi *et al.*, 2004; Boekema und Braun, 2007). In *P. anserina* sind die Komplexe in die Superkomplexe S_2 , S_1 und S_0 organisiert, wobei die Zahlen im Index der Anzahl der Komplex IV-Monomere neben Komplex I-Monomer und Komplex II-Dimer angeben (Krause *et al.*, 2004; Krause und Seelert, 2008; Schägger und Pfeiffer, 2000). Diese Superkomplexe verbessern durch das sogenannte „substrate channeling“ den Elektronenfluss (Genova und Lenaz, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000). Weiterhin vermindern Superkomplexe die Generierung von ROS (Maranzana *et al.*, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000).

Zusätzlich wurde diese Erhöhung durch eine spezifische Komplex IV (CIV)-Färbung bestätigt (rote Pfeile Abbildung 18D). Da die beiden mtRSCs S_1 und S_2 Komplex IV enthalten, konnte deren Menge über eine Komplex IV-Färbung bestimmt werden. In der Regel führen mtRSCs zu einer verbesserten Atmung (Bianchi *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2004; Schägger und Pfeiffer, 2000), was im Widerspruch zu der beobachteten Gossypol-induzierten Beeinträchtigung des Sauerstoffverbrauches steht. Möglicherweise ist die erhöhte Menge mtRSCs eine Art Kompensations-Mechanismus nach Gossypol-Behandlung, um die negativen Effekte des Polyphenols auf die Atmung zu minimieren, was jedoch nicht vollständig gelingt.

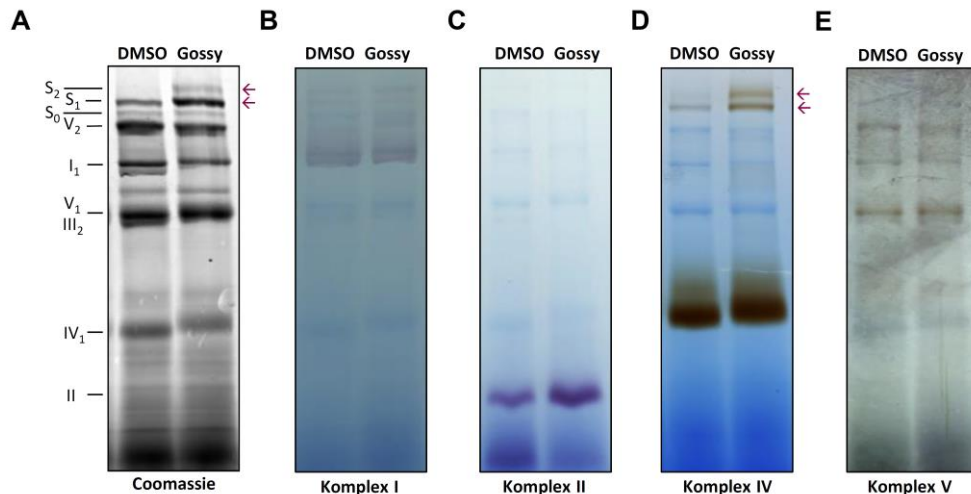


Abbildung 18: Effekt von Gossypol auf den Aufbau der mitochondrialen Atmungskette. Repräsentative BN-PAGE-Analyse mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen nach Langzeit-Inkubation (4 h) mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol ($n = 3$, je 100 μ g). Die durch Digitonin solubilisierten Proteine wurden über ein 4-13%iges Gradientengel elektrophoretisch aufgetrennt **(A)** Die $C_1C_{III_2}C_{IV_{0-2}}$ (S_{0-2}) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III_2 und V_2) und die monomeren Komplexe I_1 , IV_1 und V_1 wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. **(B)** Komplex I-Färbung, **(C)** Komplex II-Färbung, **(D)** Komplex IV-Färbung und **(E)** Komplex V-Färbung nach Auftrennung. Unterschiede sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Aus Glioblastom-Zellen ist eine Fragmentierung der Mitochondrien nach Behandlung mit Gossypol bekannt (Voss *et al.*, 2010). Daher wurde zusätzlich zu dem Einfluss der Langzeit-Inkubation mit Gossypol auf die Organisation der Atmungskette wurde der Einfluss der Kurzzeit-Inkubation auf die Mitochondrien-Morphologie untersucht. Hierzu wurde ein GFP-Reporterstamm mit einer mutierten Version der mitochondrialen PaSOD3 (PaSOD3^{H26L}) verwendet und direkt vor der Mikroskopie auf dem Objektträger mit 0,02 % DMSO bzw. 20 μ M Gossypol behandelt. Wie schon in früheren Studien mit Glioblastom-Zellen gezeigt, führt die Behandlung mit Gossypol zu einer Fragmentierung der Mitochondrien im Vergleich zu einer Behandlung mit DMSO, der Lösungsmittel-Kontrolle (Abbildung 19A, B). Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen fädige Mitochondrien in den mit DMSO behandelten Stämmen (Abbildung 19A) und eine Fragmentierung bzw. Punktierung der Mitochondrien in den Gossypol-behandelten Stämmen (Abbildung 19B).

Zusammengefasst beeinträchtigt die Behandlung mit Gossypol in *P. anserina* wie in Glioblastom-Zellen die Mitochondrien-Funktion.

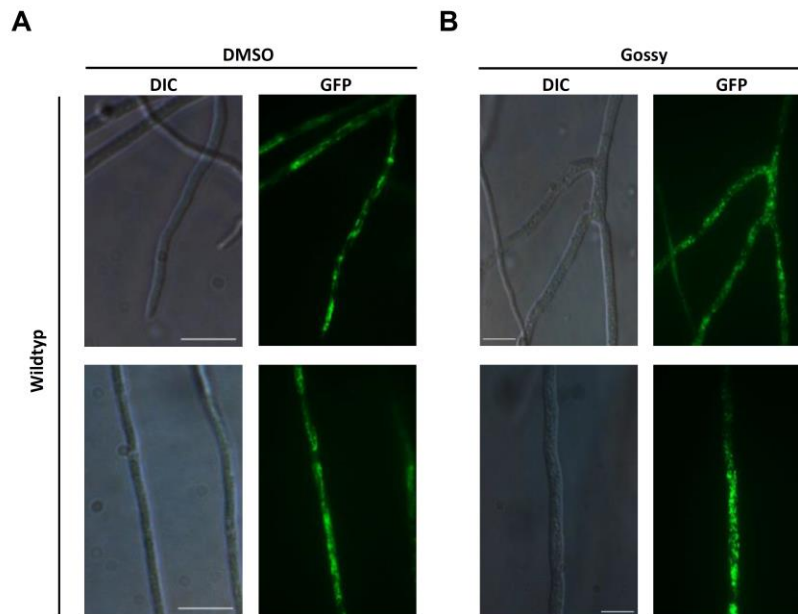


Abbildung 19: Effekt von Gossypol auf die Mitochondrien-Morphologie des *P. anserina*-Wildtyps. Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Visualisierung von Mitochondrien in *PaSod3^{H26L}::Gfp* Reporterstämmen, welche direkt während der Mikroskopie mit **(A)** 0,02 % DMSO oder **(B)** 20 μ M Gossypol behandelt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 10 μ M. DIC: differentieller Interferenzkontrast (engl. „differential interference contrast“). Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Freisetzung von H₂O₂ aus den Hyphen von *P. anserina* durch Gossypol

Neben der bekannten Tatsache, dass eine Beeinträchtigung der Mitochondrien zu einer erhöhten ROS-Produktion führt, wurde kürzlich gezeigt, dass Gossypol oxidativen Stress induziert (Ko *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wurde im Folgenden sowohl die ROS-Bildung als auch die ROS-Detoxifizierung analysiert. In einem ersten Schritt wurde die Menge an extrazellulärem Superoxid und Wasserstoffperoxid (Ausstoß von Superoxid- und Wasserstoffperoxid) von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen angezogen auf M2-Medium mit verschiedenen Gossypol- oder DMSO-Konzentrationen bestimmt. Hierzu wurden quantitative histochemische Myzelfärbungen mit NBT bzw. DAB durchgeführt (Munkres, 1990). Diese ergaben keine Veränderungen des Superoxid-Ausstoßes mit zunehmender Gossypol-Konzentration im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen (Abbildung 20A). Im Gegensatz dazu nimmt die extrazelluläre Wasserstoffperoxid-Menge mit ansteigender Gossypol-Konzentration im Verhältnis zur Kontrolle zu (Abbildung 20A).

Superoxid wird mit einer NBT-Färbung nachgewiesen. Das NBT wird durch Superoxid unter Bildung von Formazan reduziert. Formazan ist ein blau-violetter Farbstoff, durch den das Myzel gefärbt wird. Je höher der Superoxid-Ausstoß, desto stärker die Blau-Färbung (Munkres, 1990). Wasserstoffperoxid wird dagegen anhand einer bräunlichen Färbung durch Reaktion mit DAB nachgewiesen. Hierbei wird DAB durch Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Peroxidasen oxidiert. Dabei entsteht ein rot-bräunliches Präzipitat, welches sich auf dem Myzel ablagert und dieses färbt (Munkres, 1990).

Um das Ergebnis der qualitativen Methode zu bestätigen, wurde die freigesetzte Menge an Wasserstoffperoxid mit einer quantitativen photometrischen Methode bestimmt (Kowald *et al.*, 2012). Übereinstimmend wurde ein ca. 5-fach erhöhter Wasserstoffperoxid-Ausstoß bei Wildtyp-Stämmen angezogen auf 20 μM Gossypol im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt. Der Ausstoß nimmt mit erhöhter Konzentration (200 μM) deutlich, auf einen fast 10-fachen Wert, zu (Abbildung 20B). Diese erhöhte Freisetzung ist ein indirektes Maß für eine erhöhte ROS-Menge in den verschiedenen Zell-Kompartimenten, inklusive Zytoplasma und der Mitochondrien. In letzteren wird Wasserstoffperoxid durch die PaSOD3 in der Matrix und durch die PaSOD1 im Intermembranraum gebildet. Anschließend kann es aus den Mitochondrien ins Zytoplasma translozieren und weiter über das Plasmalemma aus der Zelle gelangen. Zusammen mit der stark verringerten Wachstumsrate des *P. anserina*-Wildtyps auf Medium mit 200 μM Gossypol (Abbildung 15F) deutet dieser starke Anstieg des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes auf eine Induktion von oxidativem Stress durch die Behandlung mit Gossypol hin.

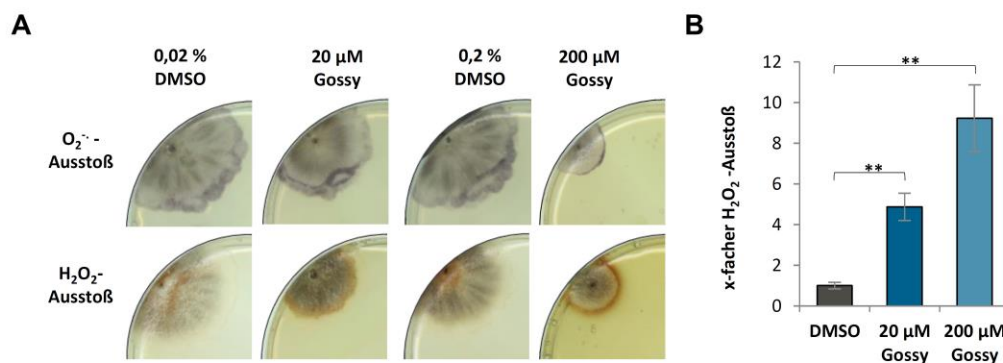


Abbildung 20: Erhöhung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes durch Gossypol. (A) Qualitative Bestimmung des Superoxid- ($\text{O}_2^{\bullet-}$; NBT-Färbung) und Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (H_2O_2 ; DAB-Färbung) von Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit DMSO- oder Gossypol-Zusatz. Die Intensität der Myzelfärbung entspricht der Menge des ausgestoßenen Superoxids bzw. Wasserstoffperoxids. (B) Quantitative Messung der H_2O_2 -Freisetzung von Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit DMSO oder Gossypol (5 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten). Der mittlere H_2O_2 -Ausstoß der DMSO-behandelten Wildtypen wurde auf 1 gesetzt. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „**“ gekennzeichnet. ** $p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Als nächstes wurde die Frage nach der Ursache des erhöhten Wasserstoffperoxid-Ausstoßes bearbeitet. Ursächlich kann einerseits eine vermehrte Bildung oder aber ein verringerter Abbau von Wasserstoffperoxid sein. Um zwischen den beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde zunächst die Bildung und im Anschluss der Abbau von Wasserstoffperoxid unter Mitochondrien-schädigenden Bedingungen (4 h 20 μM Gossypol) analysiert. Die Bildung von Wasserstoffperoxid hängt von der Menge an Superoxid ab, welches größtenteils durch die SODs zu Wasserstoffperoxid abgebaut wird. Analysen der SOD-Aktivitäten durch „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen ergaben einen

deutlichen Anstieg der PaSOD1-Aktivität in den Gossypol-behandelten Stämmen im Vergleich zu den DMSO-behandelten (Abbildung 21A). PaSOD1 ist post-translational reguliert (Borghouts *et al.*, 2002; Wiemer und Osiewacz, 2014), entsprechend wurde kein signifikanter Unterschied in der Protein-Menge zwischen den beiden Behandlungen gefunden (Abbildung 21B, C).

Im Gegensatz dazu ist die PaSOD2-Aktivität bei gleichbleibender Protein-Menge verringert (Abbildung 21A-C) und die Aktivität der mitochondrialen PaSOD3 unverändert (Abbildung 21D). Eine weitere Möglichkeit der Superoxid-Mengen-Reduzierung und somit der Beeinflussung der Wasserstoffperoxid-Menge ist das „Abfangen“ durch das mitochondriale Protein Cytochrom C (PaCYTc). Analysen der Menge dieses mitochondrialen Proteins ergaben keine Unterschiede zwischen der Gossypol-Behandlung und der DMSO-Kontrolle (Abbildung 21E, F).

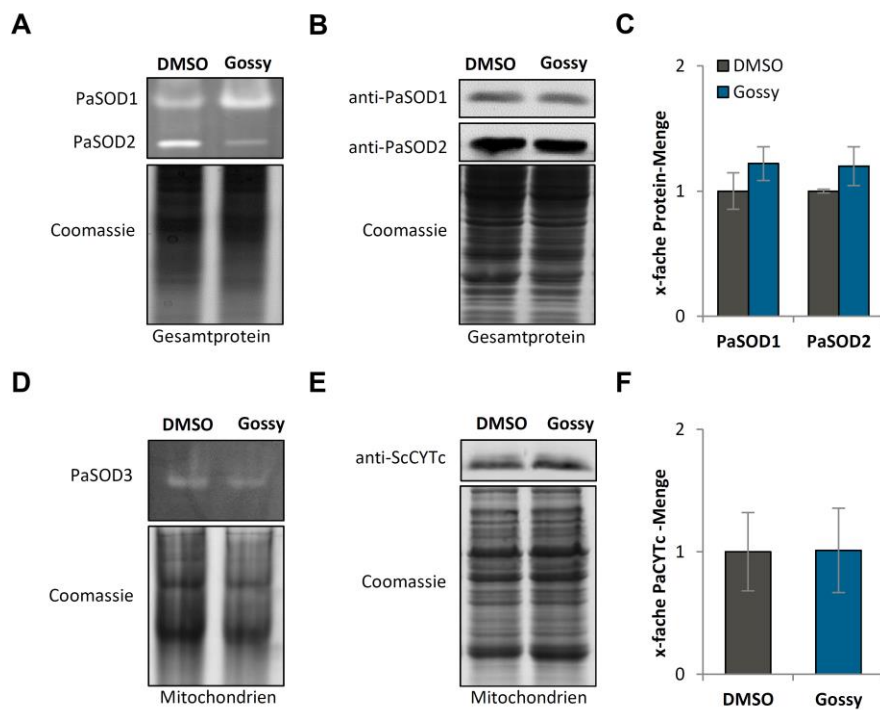


Abbildung 21: Einfluss von Gossypol auf Superoxid-abbauende Enzyme des *P. anserina*-Wildtyps. Repräsentative Ausschnitte (A) einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität und (B) einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der SOD-Mengen in Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach 4 h Inkubation mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol. Es wurde je 100 μ g Gesamtprotein von insgesamt drei biologischen Replikaten analysiert. Als Ladekontrolle dienten die Coomassie-gefärbten Gele. (C) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (B). Protein-Mengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. (D) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD3-Aktivität und (E) repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaCYTc-Mengen in mitochondrialen Proteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach 4 h Inkubation mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol. Es wurden je 100 μ g Mitochondrien Protein von insgesamt drei biologischen Replikaten analysiert. Als Ladekontrolle dienten die gefärbten Gele. (F) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (E). Die PaCYTc-Mengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Als nächstes wurde die Reduktion der Wasserstoffperoxid-Menge durch die verschiedenen abbauenden Enzyme untersucht. Analysen der Peroxidase-Aktivität mit einer „In-Gel“-Aktivitätsfärbung ergaben keine Veränderung in den Gossypol-behandelten Stämmen im Vergleich zu den DMSO-behandelten (Abbildung 22A). Ebenfalls ist die Aktivität der Katalasen in einer „In-Gel“-Aktivitätsfärbung unverändert (Abbildung 22B). Ein drittes Enzym, welches Wasserstoffperoxid abbaut, ist die mitochondriale Peroxidase Peroxiredoxin (PaPRX). Da für dieses Protein kein Aktivitäts-Assay vorlag, wurde die Protein-Menge analysiert. Ein Vergleich dieser ergab keinen Unterschied zwischen Gossypol- und DMSO-behandelten Wildtyp-Stämmen (Abbildung 22C, D).

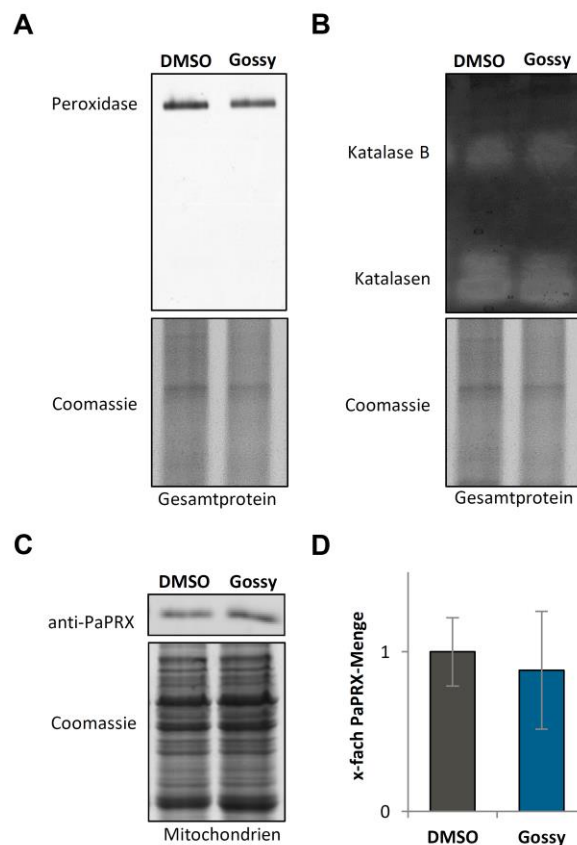


Abbildung 22: Einfluss von Gossypol auf H₂O₂-abbauende Enzyme des *P. anserina*-Wildtyps. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-Peroxidase-Aktivitätsfärbung und (B) einer „In-Gel“-Katalase-Aktivitätsfärbung mit Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach 4 h Inkubation mit 0,02 % DMSO oder 20 µM Gossypol. Es wurden je 30 µg Gesamtproteinextrakt von insgesamt drei biologischen Replikaten analysiert. Als Ladekontrolle diente ein Coomassie-gefärbtes Gel. (C) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaPRX-Mengen mit je 100 µg Gesamtproteinextrakt aus Wildtyp-Stämmen nach 4 h Inkubation mit 0,02 % DMSO oder 20 µM Gossypol. (D) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (C). Die PaPRX-Mengen wurden auf das Coomassie gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zur DMSO-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Insgesamt zeigten die Analysen der ROS-bildenden und-abbauenden Enzyme, dass die erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge bzw. die erhöhte Freisetzung in Gossypol-behandelten *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf einer gesteigerten Bildung, durch eine vermehrte PaSOD1-Aktivität, beruht.

PaCYPD-abhängige Autophagie-Induktion durch Gossypol

Wasserstoffperoxid ist in Säugerzellen ein bekannter Induktor von Autophagie (Lee *et al.*, 2012), und weiterhin ist bekannt, dass Gossypol in Krebszellen Autophagie induzieren kann (Antonietti *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2010; Mani *et al.*, 2015). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob Gossypol in *P. anserina* Autophagie auslösen kann. Dazu wurde als erstes die nicht-selektive Autophagie-Rate in *PaSod1::Gfp*-Stämmen mit dem sogenannten „GFP-cleavage-assays“ und verschiedenen Anzuchtsbedingungen untersucht.

Zum Nachweis der Autophagie wurde ein biochemischer Assay, der sogenannte „GFP-cleavage-assay“ (Kanki *et al.*, 2009; Meiling-Wesse *et al.*, 2002) verwendet. Dieser Assay wurde in Hefe entwickelt und kürzlich in *P. anserina* etabliert und angepasst (Knuppertz *et al.*, 2014; Knuppertz *et al.*, 2017). Grundlage dieses Assays ist der vakuoläre Abbau (autophagische Proteolyse) von GFP-Reporterproteinen. Je nach Lokalisation des Reporterproteins kann zwischen nicht-selektiver (*PaSod1::Gfp* bzw. PaSOD1::GFP im Zytosol) oder selektiver (z. B. *PaSod3^{H26L}::Gfp* bzw. PaSOD3^{H26L}::GFP in den Mitochondrien) Autophagie unterschieden werden. Im Falle einer Autophagie-Induktion wird das Reporterprotein in der Vakuole abgebaut, wobei der GFP-Teil aufgrund struktureller Eigenschaften längere Zeit stabil in der Vakuole verbleibt. Dieses sogenannte „freie GFP“ (ca. 25 kDa) kann durch Western-Blot-Analyse anschließend quantifiziert werden.

Zunächst wurde die Rate der nicht-selektiven Autophagie anhand der „freien GFP“-Menge nach dauerhafter Anzucht mit 20 µM entsprechend der Bedingungen der Lebensspannen-Analysen untersucht. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Stämmen behandelt mit Gossypol oder DMSO gefunden (Abbildung 23A, C). Um zu testen, ob eine Induktion der nicht-selektiven Autophagie in *P. anserina* durch Gossypol überhaupt möglich ist, wurden Stämme für kurze Zeit mit einer stark erhöhten Gossypol-Konzentration behandelt (24 h 200 µM). Diese veränderte Anzucht führte zu einem 2-fachen Anstieg der „freien GFP“-Menge und somit zu einer Induktion der nicht-selektiven Autophagie (Abbildung 23A, C).

Bei der Induktion von Autophagie in *P. anserina* spielt das mitochondriale Protein Cyclophilin D (PaCYPD), welches der Regulator der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) ist, eine Rolle (Kramer *et al.*, 2016). Daher wurde als nächstes untersucht, ob PaCYPD auch bei der Induzierung von Autophagie durch Gossypol involviert ist. Im direkten Vergleich zum Wildtyp wird in einem $\Delta PaCypD/PaSod1::Gfp$ -Stamm die „freie GFP“-Menge und somit die nicht-selektive Autophagie nur leicht aber nicht signifikant erhöht (Abbildung 23B, D). Diese Daten demonstrieren

eine wesentliche Rolle von PaCYPD bzw. der mPTP bei der Induktion von Autophagie durch Gossypol.

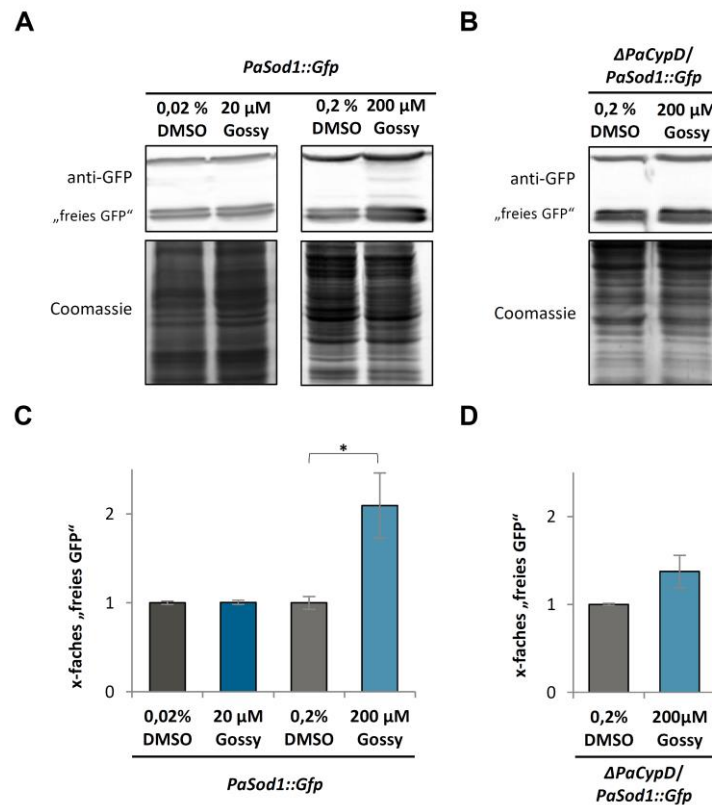


Abbildung 23: PaCYPD-abhängige Induktion der nicht-selektiven Autophagie. Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Autophagie-Raten verschiedener 10 d alter *P. anserina*-Stämme. **(A)** In *PaSod1::Gfp*-Stämmen nach dauerhafter Inkubation mit 0,02 % DMSO oder 20 μM Gossypol bzw. nach 24-stündiger Inkubation mit 0,2 % DMSO oder 200 μM Gossypol und **(B)** in $\Delta PaCypD/PaSod1::Gfp$ -Stämmen nach 24-stündiger Inkubation mit 0,2 % DMSO oder 200 μM Gossypol. Von allen Stämmen wurde jeweils 100 μg Gesamtproteinextrakt von insgesamt drei biologischen Replikaten analysiert. **(C)** Quantifizierung der Western-Blot-Analysen aus (A) und **(D)** Quantifizierung der Western-Blot-Analysen aus (B). Die Menge an „freien GFP“ wurde jeweils auf die Ladekontrolle (Coomassie-gefärbtes SDS-Gel) normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Induktion von selektiver Autophagie von Mitochondrien (Mitophagie) durch Gossypol

Neben der Induktion der nicht-selektiven Autophagie kann Wasserstoffperoxid auch eine Form der selektiven Autophagie, den selektiven Abbau von Mitochondrien durch Mitophagie, induzieren. Das Induzieren von Mitophagie durch Gossypol ist denkbar, da die vorherigen Untersuchungen eine Reduktion des mtMP und der mitochondrialen Atmung durch Gossypol zeigen und dies in anderen Organismen zu einer Mitophagie-Induktion führt (Gautier *et al.*, 2008; Graef und Nunnari, 2011; Narendra *et al.*, 2008; Nowikovsky *et al.*, 2007; Priault *et al.*, 2005; Twig *et al.*, 2008; Wu *et al.*,

2010). Aus diesem Grund wurde im Weiteren der Abbau von mitochondrialen Proteinen durch Mitophagie in Gossypol-behandelten Stämmen vergleichend zu DMSO-behandelten untersucht.

Hierzu wurde zunächst die Menge an verschiedenen mitochondrialen Proteinen im Gesamtprotein von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen untersucht. Eine 24-stündige Inkubation mit 200 μ M Gossypol führt zu einer Abnahme der Mengen der mitochondrialen Proteine im Vergleich zu derjenigen in der DMSO-Kontrolle (Abbildung 24A). Die Quantifizierung durch eine densitometrische Auswertung der Mengen ergab eine signifikante Reduktion der F_0F_1 -ATP-Synthase-Untereinheit PaATP5 auf das 0,4-fache, sowie eine Abnahme auf das 0,6-fache der Menge des mitochondrialen Membranproteins PaPORIN (Abbildung 24B). Desweiteren nimmt die Menge der mitochondrialen PaSOD3 um das auf das 0,7-fache und die der mitochondrialen PaPRX auf das 0,3-fache der Kontrollmenge ab (Abbildung 24B).

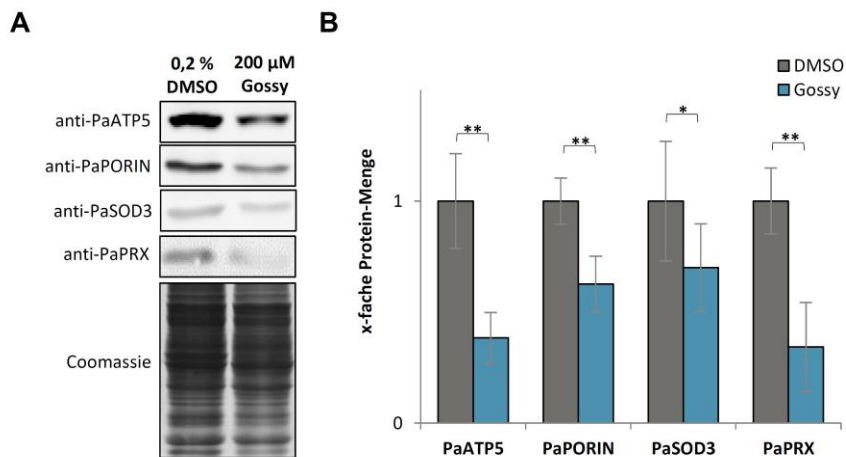


Abbildung 24: Abnahme der Menge mitochondrialer Proteine nach 24-stündiger Gossypol-Behandlung. (A) Repräsentative Ausschnitte einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis von mitochondrialen Proteinen im Gesamtprotein von 10 d alten Wildtyp-Stämmen nach 24 h Inkubation mit 0,2 % DMSO oder 200 μ M Gossypol. **(B)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (A). Die Mengen der verschiedenen mitochondrialen Proteine wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der jeweiligen DMSO-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Meyer *et al.* (zur Publikation angenommen).

Diese Abnahme der Menge an mitochondrialen Proteinen ist ein Hinweis auf die Induktion von Mitophagie durch Gossypol. Daher wurde im Weiteren die „freie GFP“-Menge in *PaSod3^{H26L}::Gfp*-Stämmen ermittelt. Verglichen zur DMSO-Kontrolle zeigen die Western-Blot-Analysen eine signifikante gut 2-fache Erhöhung der „freien GFP“-Menge nach Gossypol-Behandlung (Abbildung 25A, B).

Zur Überprüfung, ob die Erhöhung der „freien GFP“-Menge wirklich auf der Induktion von Mitophagie beruht, wurden Untersuchungen im Hintergrund der *PaAtg1*-Deletionsmutante durchgeführt. Überraschend war in dieser Autophagie-defizienten Mutante auch eine Erhöhung der „freien GFP“-Menge nachzuweisen (Abbildung 25A, B). Die Menge ist in der Mutante um das ca. 1,5-fache erhöht, was im Gegensatz zum Wildtyp-Hintergrund (hier ist es 1,8-fach) geringer ist (Abbildung 25B). Zusammengefasst deutet dies auf einen zumindest teilweise Gossypol-induzierten *PaAtg1*-unabhängigen Abbau von Mitochondrien hin. Möglicherweise geschieht dies über sogenannte „mitochondrial derived vesicles“ (MDV) (Neuspiel *et al.*, 2008). Diese Daten wären der erste Hinweis auf einen solchen Abbauweg in Pilzen. Um dies bestätigen zu können, müssten in zukünftigen Arbeiten weitere Untersuchungen mit anderen Autophagie-defizienten Mutanten durchgeführt werden. Beispielsweise sollte die Abhängigkeit von PaATG8 bestimmt werden, um einen Hinweis auf die Bildung von Autophagosomen zu bekommen.

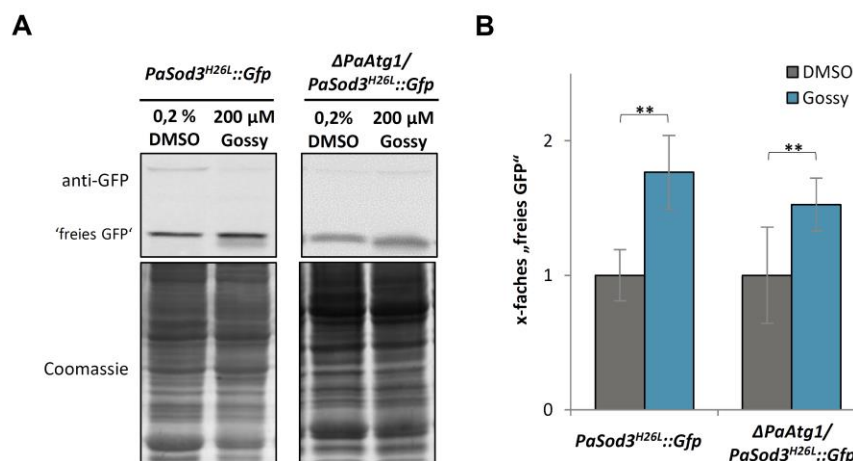


Abbildung 25: *PaAtg1*-unabhängige Mitophagie-Induktion durch Gossypol. (A) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Mitophagie-Raten mit Gesamtproteinextrakten aus 10 d alten *PaSod3^{H26L}::Gfp*- und $\Delta PaAtg1/PaSod3^{H26L}::Gfp$ -Stämmen nach 24-stündiger Inkubation mit 0,2 % DMSO oder 200 μ M Gossypol. **(B)** Quantifizierung der Western-Blot-Analysen aus (A). Die Menge an „freiem GFP“ wurde jeweils auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „**“ gekennzeichnet. $**p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Meyer *et al.* (zur Publikation angenommen).

PaCYPD ist notwendig für die Induktion von mitochondrialer Dysfunktion und Zelltod

Wasserstoffperoxid kann nicht nur, wie bereits erwähnt, Autophagie induzieren, sondern auch das PaCYPD-vermittelte Öffnen der mPTP (Baines *et al.*, 2005; Nguyen *et al.*, 2011). Darüber hinaus wurden in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine Verbindung von PaCYPD und der Gossypol-induzierten Autophagie gezeigt. Daher ist eine Rolle von PaCYPD in der Gossypol-induzierten mitochondrialen Dysfunktion und dem Zelltod denkbar.

Eine weitere anerkannte Komponente der mPTP ist die F_0F_1 -ATP-Synthase (Bernardi, 2013; Giorgio *et al.*, 2009; Giorgio *et al.*, 2013). Untersuchungen dieser Komponente durch OCR-Messungen unter Verwendung des spezifischen Inhibitors Oligomycin sollten weitere Hinweise auf eine Rolle der mPTP in den Gossypol-Effekten liefern. Die OCR-Messungen zeigen eine verringerte Inhibition der F_0F_1 -ATP-Synthase durch Oligomycin nach Kurzzeit-Inkubation der isolierten *P. anserina* Wildtyp-Mitochondrien mit Gossypol (Abbildung 26A). In der DMSO-Kontrolle wird 78 % des Sauerstoffverbrauchs inhibiert, wohingegen in den Gossypol behandelten Mitochondrien nur 34 % des Sauerstoffverbrauches inhibiert werden (Abbildung 26A). Diese verringerte Inhibition deutet auf eine Interaktion von Gossypol mit der mPTP hin.

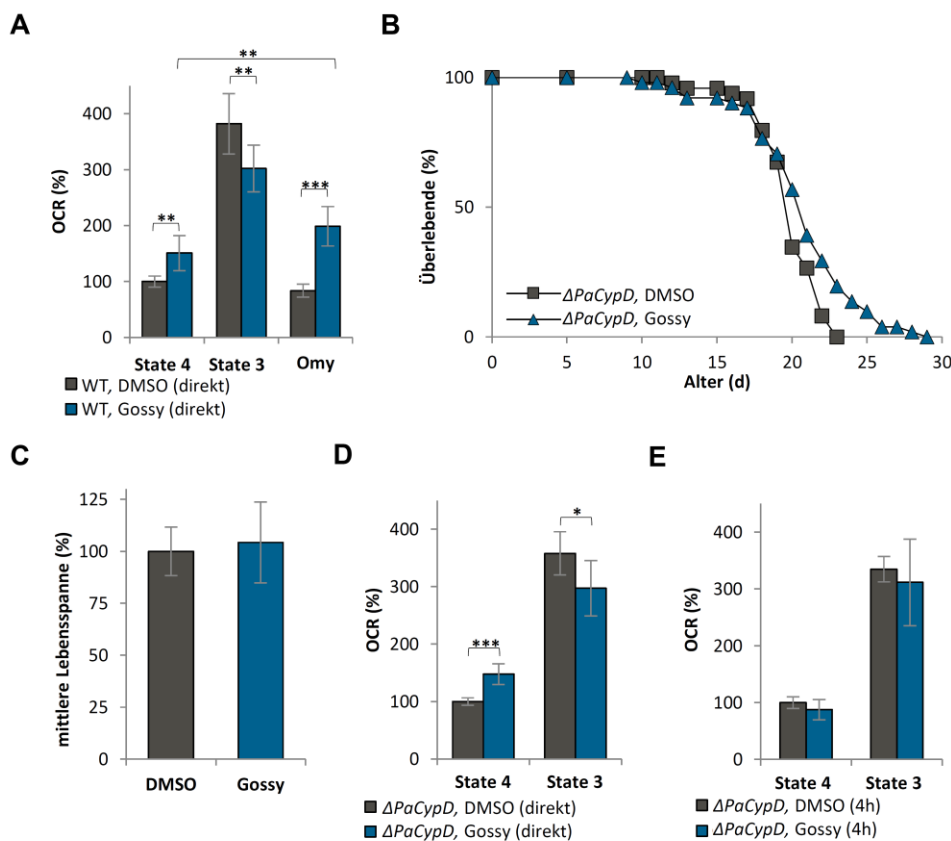


Abbildung 26: Lebensverkürzung und mitochondriale Dysfunktion sind abhängig von *PaCypD*. (A) CI-abhängige Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien von 10 d alten Wildtyp-Isolaten, die während der Messung mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol behandelt wurden. Es wurden 2 biologische Replikate (Mitochondrien-Präparationen) mit je 4 technischen Replikaten analysiert. Abweichend zu anderen OCR-Messungen wurde nach Erreichen des „State 3“ die F_0F_1 -ATP-Synthase mit Oligomycin (Omy) inhibiert. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO-Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. (B) Lebensspanne der $\Delta PaCypD$ -Deletionsmutante auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO (n = 40) oder 20 μ M Gossypol (Gossy; n = 40; *p*-Wert = 0,01). (C) Mittlere Lebensspanne der Stämme aus (A). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle angegeben. (D) CI-abhängige Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 10 d alten $\Delta PaCypD$ -Kulturen, die während der Messung mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol behandelt wurden. Es wurden 3 biologische Replikate (Mitochondrien-Präparationen) mit je 3-5 technischen Replikaten analysiert. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO-Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. (E) CI-abhängige Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 10 d

alten $\Delta PaCypD$ -Kulturen, die 4 h mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol behandelt wurden. Es wurden 3 biologische Replikate (Mitochondrien-Präparationen) mit je 4 technischen Replikaten analysiert. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (2018).

Um diese Vermutung weiter nachzugehen, wurden im Weiteren die im Wildtyp ermittelten Gossypol-Effekte in einer $PaCypD$ -Deletionsmutante untersucht. Zunächst wurde die Lebensspanne von $\Delta PaCypD$ -Stämmen auf M2-Medium mit 0,02 % DMSO oder 20 μ M Gossypol ermittelt. Im Gegensatz zum Wildtyp wurde im Deletionsstamm keine Verringerung der Lebensspanne durch Gossypol gefunden, sondern eher eine minimale Verlängerung (Abbildung 26B). Die mittlere Lebensspanne auf Medium mit Gossypol ist um ca. 4 % erhöht verglichen zum Medium mit DMSO (Abbildung 26C). Dies weist auf eine PaCYPD-abhängige Induktion von Zelltod durch Gossypol-Behandlung im *P. anserina*-Wildtyp hin.

Um festzustellen, ob die Gossypol-Effekte auf die Atmung auch PaCYPD-abhängig sind, wurden als nächstes die Effekte von Kurzzeit- und Langzeit-Inkubation mit Gossypol auf die CI-abhängige OCR von isolierten Mitochondrien aus $\Delta PaCypD$ -Stämmen untersucht. Ähnlich wie im Wildtyp führt eine Kurzzeit-Inkubation mit Gossypol von isolierten $\Delta PaCypD$ -Mitochondrien zu einer Entkopplung der Atmungskette, was sich in einer deutlichen Erhöhung der „State 4“-OCR widerspiegelt (Abbildung 26D). Gegensätzlich zum Wildtyp bleibt die „State 4“- und die „State 3“-OCR isolierter $\Delta PaCypD$ -Mitochondrien nach Langzeit-Inkubation unverändert in Bezug auf die DMSO-Kontrolle (Abbildung 26E). Diese Daten weisen auf eine PaCYPD-Abhängigkeit der Gossypol-induzierten mitochondrialen Dysfunktion hin.

Insgesamt zeigen die Analysen eine Gossypol-induzierte PaCYPD-abhängige Induktion von apoptotischem Zelltod in *P. anserina*. Dieser wird vermutlich durch eine erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge, hervorgerufen durch die mitochondriale Dysfunktion und einer Erhöhung der PaSOD1-Aktivität, induziert. Die hier beschriebenden Daten aus *P. anserina* werden durch Ergebnisse der AG von Prof. Kögel gestärkt. So konnte Nina Meyer zeigen, dass sowohl die mitochondriale Dysfunktion als auch die Zelltod-Induktion durch den mPTP-Inhibitor Olesoxime (TRO-19622) verringert wird (Meyer, 2015; Warnsmann *et al.*, 2018).

4.2.2 Curcumin - H₂O₂ als Signal zur Induktion von Langlebigkeit

Curcumin-induzierte Lebensverlängerung

Ein weiteres Polyphenol, welches im Rahmen der vorliegenden Dissertation bearbeitet wurde, ist Curcumin. In verschiedenen Studien wurden pleiotrope Effekte dieses Polyphenols beschrieben. Neben entzündungshemmenden, anti-karzinogenen, anti-oxidativen Eigenschaften sind auch „anti-Aging“-Eigenschaften bekannt (Esatbeyoglu *et al.*, 2012). So wird die Lebensspanne von *D. melanogaster* und *C. elegans* durch Curcumin verlängert (Shen *et al.*, 2013b). Trotz der vielen beschriebenen Effekte sind die zugrundeliegenden Mechanismen nur teilweise aufgeklärt. Daher sollte, wie schon im Fall von Gossypol, die vorliegende Dissertation dazu beitragen, den Wirkmechanismus weiter aufzuklären.

Zunächst wurden einige Vorversuche durchgeführt um zu überprüfen, ob Curcumin von *P. anserina* aufgenommen wird, welche Konzentrationen notwendig sind, um Effekte auszulösen und um Effekte des Lösungsmittels Ethanol (EtOH) auszuschließen. Mit einer Dosis-Wirkungs-Kurve wurde ein Effekt auf die Wachstumsrate des *P. anserina*-Wildtyps in kleiner Stichprobenanzahl untersucht und eine Dosis-abhängige Reduktion dieser gefunden (Abbildung 27).

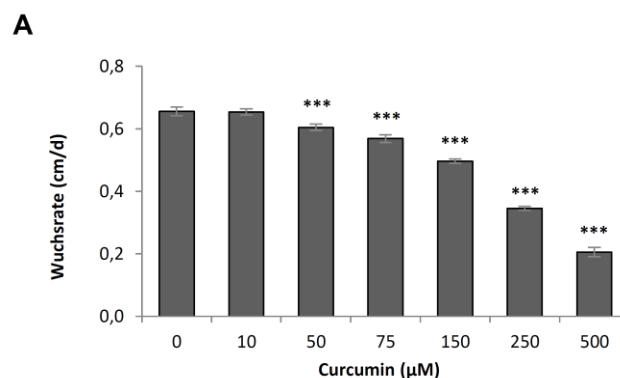


Abbildung 27: Dosis-abhängige Reduktion der Wachstumsrate des *P. anserina*-Wildtyps durch Curcumin. (A) Wachstumsraten des *P. anserina*-Wildtyps auf M2-Medium mit 0 µM, 10 µM, 50 µM, 75 µM, 150 µM, 250 µM und 500 µM Curcumin (je n = 3). Die Werte der Gossypol-behandelten Stämme wurden relativ zu den unbehandelten berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. ***p < 0,001.

Eine Konzentration von 500 µM reduziert die Wachstumsrate um 70 %, wohingegen 50 µM zu einer Verringerung um 10 % führt (Abbildung 27). Diese Abnahme zeigt, dass exogen zugegebenes Curcumin von *P. anserina* aufgenommen wird. Für die folgenden Analysen zur Aufklärung des Wirkmechanismus wurde eine Curcumin-Konzentration von 50 µM und entsprechend des

zugegebenen Volumens eine EtOH-Konzentration von 0,19 % als Kontrolle festgelegt. Analysen des Effekts von 0,19 % EtOH im Medium auf die Lebensspanne und Wachsrate des Wildtyps ergaben keine Veränderung im Vergleich zu denen ohne Zusatz (unbehandelt) (Abbildung 28A-C). Weiterhin ist auch der Aufbau der mitochondrialen Atmungskette, die CI-abhängige OCR kaum bis gar nicht durch die Zugabe von EtOH zum Medium beeinflusst (Abbildung 28D-E).

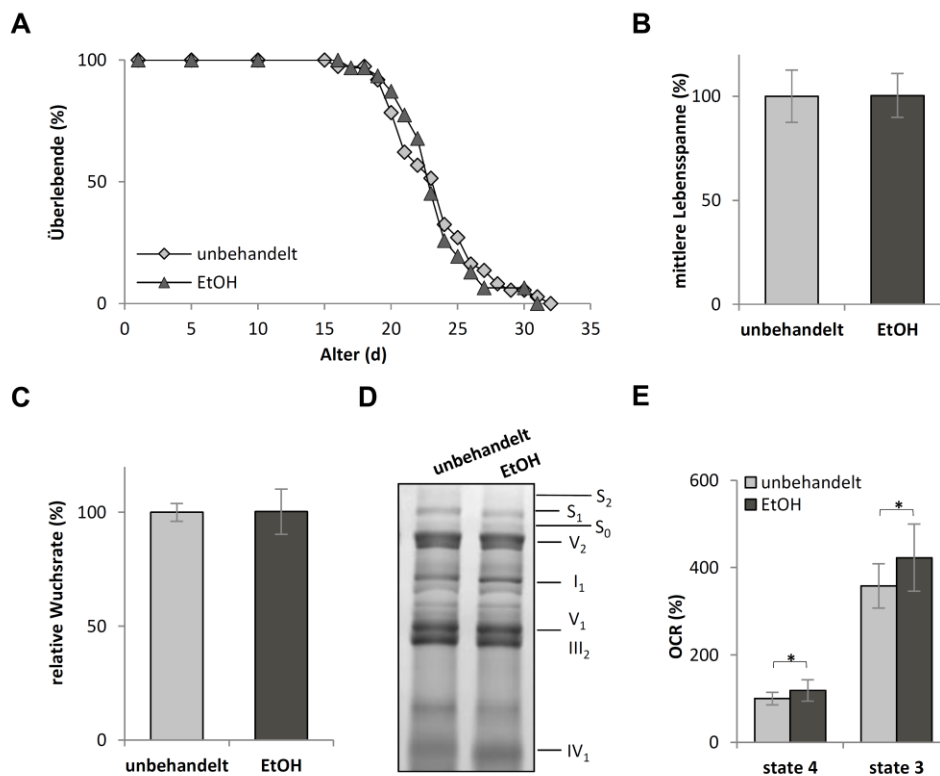


Abbildung 28: Einfluss von 0,19 % EtOH auf die Lebensspanne und Mitochondrienfunktion des *P. anserina*-Wildtyps. (A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 31) oder ohne Zusatz (unbehandelt; n = 37). (B) Mittlere Lebensspanne, (C) relative Wachsrate der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der unbehandelten Stämme wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für EtOH relativ dazu berechnet. (D) Repräsentative BN-PAGE-Analyse mit isolierten Mitochondrien aus unbehandelten oder mit 0,19 % Ethanol-behandelten Wildtyp-Stämmen. Es wurden je 100 µg von 3 biologischen Replikaten analysiert. Die Cl₁CIII₂CIV₀₋₂ (S₀₋₂) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III₂ und V₂) und die monomeren Komplexe I₁, IV₁ und V₁ wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (E) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 10 d alten unbehandelten oder mit 0,19 % Ethanol behandelten Wildtypisolaten. Der Mittelwert der unbehandelten Proben in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. *p < 0,05.

Nach diesen Vorversuchen wurde nun der Einfluss von Curcumin im Vergleich zu dem Lösungsmittel EtOH auf die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps untersucht. Die Zugabe von 50 µM Curcumin zum Anzuchtsmedium führte zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne (Abbildung 29A). Die maximale Lebensspanne wird um ca. 52 % von 31 d auf 47 d (Abbildung 29A) und die mittlere

um 30 % von 24 d auf 31 d (Abbildung 29B) verlängert. Wie durch die Vorversuche vermutet, wird die Wachsrates durch 50 μ M Curcumin um ca. 12 % verringert (Abbildung 29C). Trotz dieser Wachsratesverringering führt die längere Lebensspanne gemessen in Tagen auch zu einer signifikant verlängerten Gesamt-Wuchsstrecke um 23 % (Abbildung 29D). Dieser lebensverlängernde Effekt in *P. anserina* wurde zuvor auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* gefunden (Shen *et al.*, 2013b).

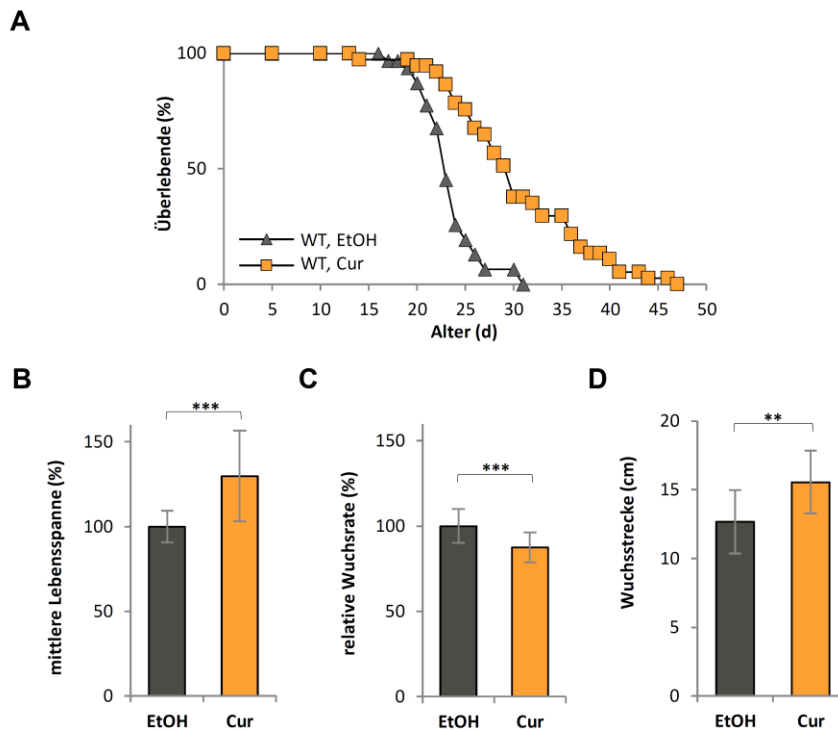


Abbildung 29: Curcumin induziert eine Lebensverlängerung in *P. anserina*. (A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 31) oder 50 μ M Curcumin (Cur; n = 37; p -Wert = 0,00000006). (B) Mittlere Lebensspanne, (C) relative Wachsrates und (D) Gesamt-Wuchsstrecke der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der EtOH-Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für Gossypol relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Curcumin beeinflusst die Mitochondrienfunktion

Wie in Ratten Mitochondrien gezeigt, könnte die Lebensspannenverlängerung nach Curcumin-Behandlung auf dem Einfluss von Curcumin auf die Mitochondrienfunktion beruhen (Trujillo *et al.*, 2014). Daher wurde im Weiteren der Einfluss von Curcumin auf die Mitochondrienfunktion des *P. anserina*-Wildtyps untersucht. Hierzu wurde, um erste Hinweise auf Veränderungen auf Proteinebene zu erhalten, das mitochondriale Proteom von Wildtyp-Stämmen, die mit EtOH oder Curcumin angezogen wurden, durch 2D-PAGE verglichen (Abbildung 30A, B).

Als Proteom wird die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle oder einem Zellkompartiment unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt bezeichnet. Das Proteom ist, anders als das sehr statische Genom, ständig Änderungen in seiner Zusammensetzung unterworfen. Es herrscht ein Gleichgewicht ständiger Neusynthese von Proteinen und dem Abbau nicht mehr benötigter Proteine.

Nach isoelektrischer Fokussierung und anschließender Auftrennung anhand der Größe wurde das Muster der mitochondrialen Proteine durch Überlagerung der beiden Gele genauer beurteilt (Abbildung 30C). Vier der in Abbildung 30C markierten Protein-Spots (1-4) sind vermehrt oder nur in den Mitochondrien aus Curcumin-behandelten Stämmen sichtbar. Wohingegen die fünfte Markierung im Gel einen Spot hervorhebt, der hauptsächlich in den Mitochondrien der EtOH-behandelten Stämme vorkommt.

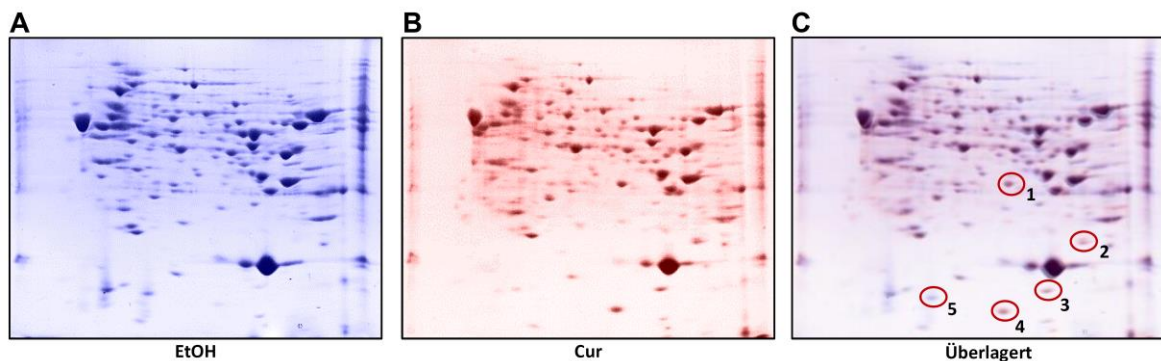


Abbildung 30: Veränderung des mitochondrialen Proteoms durch Curcumin. Zweidimensionale Auftrennung von je 450 µg mitochondrialen Proteinextrakten gemischt zu je gleichen Teilen aus 4 Individuen angezogen auf (A) 0,19 % Ethanol (EtOH) oder (B) 50 µM Curcumin (Cur). Die Proteine wurden mit Coomassie angefärbt. Das Gel in (B) wurde durch Falschfarbendarstellung künstlich rot eingefärbt, sodass eine (C) Überlagerung der beiden Gele möglich ist. Rote Kreise markieren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gelen.

Diese veränderten Proteine wurden zwar nicht weiter untersucht bzw. per Massenspektrometrie identifiziert, allerdings sind diese Modifikationen Hinweise auf eine veränderte Mitochondrienfunktion durch die Anzucht auf Curcumin-haltigem gegenüber EtOH-haltigem Medium. Daher wurde im Folgenden die Mitochondrienfunktion genauer analysiert. Zuerst wurde der Aufbau der mitochondrialen Atmungskette mit einer BN-PAGE untersucht und ein verändertes Bandenmuster zwischen den Curcumin- und EtOH-Proben gefunden (Abbildung 31A). Die Kultivierung auf Curcumin-haltigem Medium führt zu einem signifikanten 2,3-fachen Anstieg der Menge des mtRSCs S_2 und zu einem 1,7-fachen der mtRSCs S_1 -Menge (Abbildung 31B). Die Mengen der monomeren und dimeren Atmungskettenkomplexe sind durch die Curcumin-Behandlung nicht verändert.

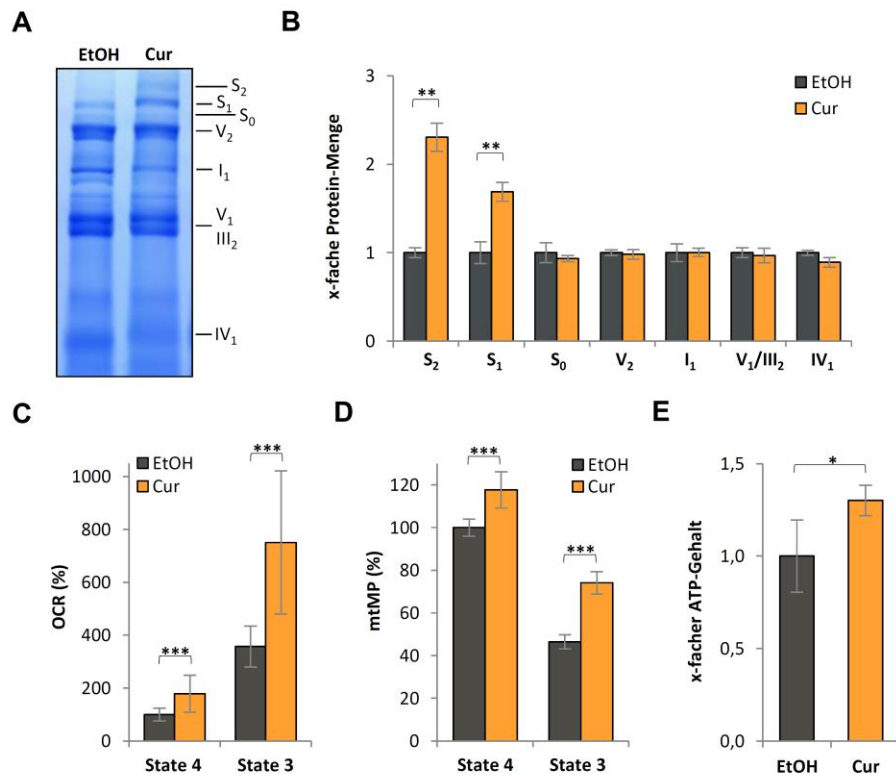


Abbildung 31: Curcumin erhöht den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und den ATP-Gehalt. (A) Repräsentative BN-PAGE-Analyse mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen nach dauerhafter Inkubation mit 0,19 % Ethanol (EtOH) oder 50 μ M Curcumin (Cur). Je 100 μ g von 3 biologischen Replikaten. Die Cl₁CIII₂CIV₀₋₂ (S₀₋₂) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III₂ und V₂) und die monomeren Komplexe I₁, IV₁ und V₁ wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. **(B)** Densitometrische Auswertung der BN-PAGE in (A). Die Mengen der Komplexe wurden auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Spur normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. **(C)** Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 10 d alten Wildtyp-Isolaten, die entweder mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 4 biologische Replikate, mit je 3 technischen Replikaten) oder 50 μ M Curcumin (n = 4 biologische Replikate, mit je 3-4 technischen Replikaten) behandelt wurden. Der Sauerstoffverbrauch der EtOH-Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. **(D)** Messungen des mtMP von 10 d alten Wildtypisolaten nach Kurzzeit-Inkubation durch die mtMP-abhängiger Akkumulation von TMRM in den Mitochondrien. Es wurden 3 biologische Replikate mit je 6 technischen Replikaten analysiert und der durchschnittliche Wert des Wildtyps im „State 4“ auf 100 % gesetzt und alle anderen Werte relativ dazu berechnet. **(E)** Relative ATP-Menge von 10 d alten Wildtyp-Stämmen (7 biologische Replikate, mit je 3 technischen Replikaten) angezogen auf 0,19 % Ethanol (EtOH, wurde gleich 1 gesetzt) oder 50 μ M Curcumin (Cur). Angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Wie bereits in Zusammenhang mit den Gossypol-Untersuchungen erwähnt, verbessern die mtRSCs den Elektronenfluss in der Atmungskette, was in der Regel in einer gesteigerten OCR resultiert (Bianchi *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2004; Schägger und Pfeiffer, 2000). Um zu überprüfen, ob dies auch auf die durch Curcumin erhöhte Menge an mtRSCs zutrifft, wurde im nächsten Schritt die Atmung des *P. anserina*-Wildtyps genauer untersucht. Hierzu wurde die Cl-abhängige OCR isolierter Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen, die auf Curcumin oder EtOH angezogen wurden, ermittelt.

Im direkten Vergleich zeigt sich, dass durch Curcumin-Zugabe ein ca. 2-facher Anstieg der „State 4“ und der „State 3“ OCR (Abbildung 31C) ausgelöst wird.

Da durch eine erhöhte Cl-abhängige Atmung im Normalfall mehr Protonen über die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum gepumpt werden, sollte es zu einem Anstieg des Protonengradienten bzw. des mtMP kommen. Dadurch kann es zu einer vermehrten ATP-Produktion über die F_0F_1 -ATP-Synthase kommen, da diese durch den Protonengradienten angetrieben wird. Um dies zu überprüfen, wurden simultane OCR- und mtMP-Messungen unter Verwendung des Farbstoffes TMRM durchgeführt. Erwartungsgemäß führt die erhöhte OCR zu einer signifikanten Erhöhung des mtMP. Das mtMP wird durch Curcumin im „State 4“ um 18 % und im „State 3“ um ca. 60 % erhöht im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. (Abbildung 31D). Entsprechend dem erhöhten mtMP wurde in den mit Curcumin behandelten Stämmen ein erhöhter ATP-Gehalt mit einem Luciferin-Luciferase-Assay bestimmt (Abbildung 31E).

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen der Mitochondrienfunktion, dass Curcumin die mitochondriale Atmung erhöht, vermutlich resultierend von einem verbesserten Elektronenfluss durch die Zunahme der mtRSCs. Dies führt zu einer gesteigerten ATP-Produktion durch den höheren elektrochemischen Protonengradienten (mtMP) der die F_0F_1 -ATP-Synthase antreibt.

Curcumin beeinflusst die Wasserstoffperoxid-Menge

Wie bereits zuvor beschrieben, führt eine veränderte Atmung meist zu Veränderungen im ROS-Stoffwechsel. Eine histochemische Färbung des ROS-Ausstoßes ist aufgrund der starken Eigenfärbung von Curcumin nicht möglich, daher wurde direkt die SOD-Aktivitäten mit „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen analysiert. Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle erhöht eine dauerhafte, zur Lebensspannen-Analyse vergleichbare, Behandlung mit 50 μ M Curcumin die Aktivität der zytosolischen PaSOD1 leicht (Abbildung 32A). Vergleichbar zu den Gossypol-Effekten sind die Aktivitäten der PaSOD2 und der PaSOD3 kaum bis gar nicht beeinflusst (Abbildung 32A, D). Entsprechend der bekannten post-translationalen Regulation der SOD sind die Protein-Mengen der PaSOD1 und der PaSOD2 nicht verändert (Abbildung 32B, C). Auffällig war, dass der Effekt auf die PaSOD1-Aktivität im Wildtyp durch eine kurzzeitige (24-stündige) Inkubation mit einer auf 200 μ M erhöhten Curcumin-Konzentration deutlich verstärkt wurde (Abbildung 32E).

Die vorherigen Untersuchungen mit Gossypol ergaben neben einer erhöhten PaSOD1-Aktivität einen Anstieg der Wasserstoffperoxid-Freisetzung, daher wurde als nächstes der Einfluss von Curcumin auf den Ausstoß photometrisch bestimmt. Ähnlich zur Gossypol-Behandlung steigt der Wasserstoffperoxid-Ausstoß durch Kultivierung auf Curcumin-haltigem im Vergleich zu EtOH-

haltigem Medium um das 2-fache an (Abbildung 32F). Analog zur Erhöhung der PaSOD1-Aktivität durch die kurzzeitige Inkubation mit höherer Curcumin-Konzentration steigt durch diese Inkubation auch die Wasserstoffperoxid-Freisetzung weiter an, bis auf das 4,5-fache (Abbildung 32F).

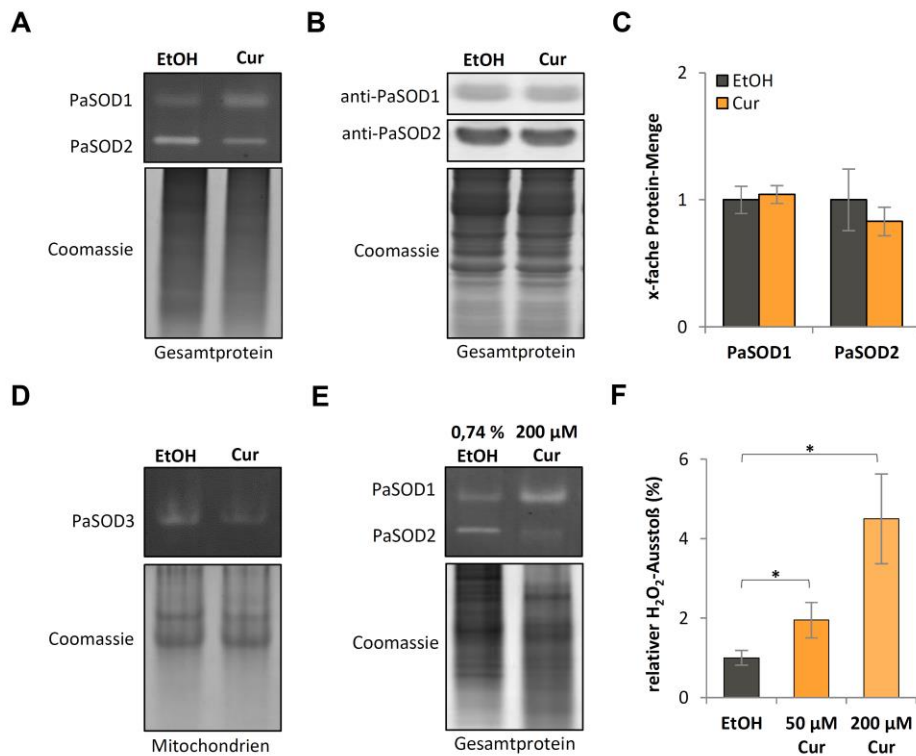


Abbildung 32: Einfluss auf die Wasserstoffperoxid-Menge. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität und (B) repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der SOD-Mengen in Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach Anzucht mit 0,19 % Ethanol oder 50 µM Curcumin (je n = 4). Als Ladekontrolle dienten die jeweiligen Coomassie gefärbten Gele. (C) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (B). Protein-Mengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der Ethanol-Kontrolle berechnet. (D) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD3-Aktivität in mitochondrialen Proteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach Anzucht mit 0,19 % Ethanol oder 50 µM Curcumin (je n = 3). (E) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität und in Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach Anzucht mit 0,74 % Ethanol oder 200 µM Curcumin für 24 h (je n = 4). (F) Quantitative Messung der H₂O₂-Freisetzung von Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit EtOH oder Curcumin (5 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten). Der mittlere H₂O₂-Ausstoß der EtOH-behandelten Wildtypen wurde auf 1 gesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. **p* < 0,05. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Curcumin-induzierte Lebensverlängerung ist abhängig von Autophagie

Aufgrund dieser Befunde stellt sich die Frage, welchen Effekt hat diese leichte Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Menge im Gegensatz zur starken Erhöhung durch Gossypol? Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, ist Wasserstoffperoxid ein bekannter Induktor der Autophagie (Lee *et al.*, 2012). Daher wurde im Weiteren der Einfluss von Curcumin auf die Autophagie untersucht. Mit

Hilfe des „GFP-cleavage-assay“ und des Reporterstammes *PaSod1::Gfp* wurde zunächst die Induktion von nicht-selektiver Autophagie untersucht. Da eine erhöhte Curcumin-Konzentration über einen kurzen Zeitraum einen deutlich größeren Effekt auf die PaSOD1-Aktivität und den Wasserstoffperoxid-Ausstoß ausübt, wurden diese Bedingungen gewählt, um nachweisen zu können, ob Autophagie überhaupt durch Behandlung mit Curcumin induziert werden kann. Western-Blot-Analysen zeigen eine Erhöhung des „freien GFPs“ (Abbildung 33A). Im Vergleich zur EtOH-Kontrolle erhöht die Curcumin-Behandlung die Menge an „freiem GFP“ um das 2-fache (Abbildung 33B). Dies ist ein Hinweis dafür, dass Curcumin im Prinzip nicht-selektive Autophagie induzieren kann.

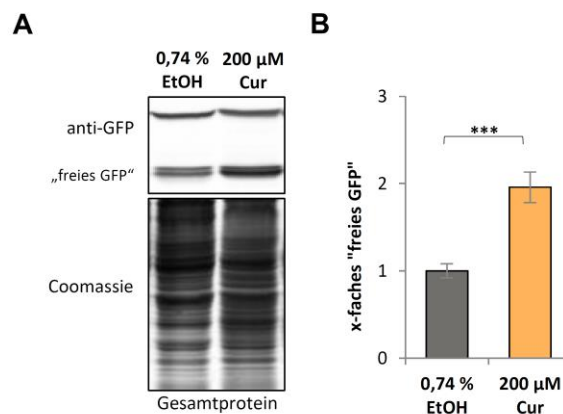


Abbildung 33: Induktion von nicht-selektiver Autophagie durch Curcumin. (A) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Autophagie-Raten von 10 d alten *P. anserina PaSod1::Gfp* Stämmen nach Anzucht mit 0,74 % Ethanol oder 200 µM Curcumin. Von allen Stämmen wurde 100 µg Gesamtproteinextrakt von insgesamt je vier biologischen Replikaten analysiert. (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analysen aus (A) Die Menge an „freiem GFP“ wurde jeweils auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ auf den Mittelwert der Ethanol-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Da durch Curcumin der ROS-Stoffwechsel verändert wird, ist auch ein Einfluss auf die Mitophagie möglich. Daher wurde als nächstes untersucht, ob eine Curcumin-Behandlung zur Induktion von Mitophagie führt. Hierzu wurde die Menge an „freiem GFP“ in *PaSod3^{H26L}::Gfp*-Stämmen nach Behandlung mit Curcumin oder EtOH untersucht. Ein direkter Vergleich ergab einen signifikanten Anstieg um das 4,2-fache in den auf Curcumin angezogenen Stämmen (Abbildung 34A, B). Zur Klärung, ob durch die gesteigerte Mitophagie-Rate auch tatsächlich vermehrt Mitochondrien unter den Lebensspannen-Bedingungen abgebaut werden, wurde die Menge verschiedener mitochondrialer Proteine im Gesamtprotein überprüft. Sowohl die Menge an PaATP5 als auch PaPORIN und die PaCYPD bleiben im Gesamtprotein unverändert zwischen dauerhafter Curcumin- und EtOH-Behandlung (Abbildung 34C, D). Da die Mengen bei Behandlung mit 50 µM Curcumin,

vergleichbar zu den Lebensspannenanalysen, nicht abnehmen, basiert die Lebensverlängerung nicht auf einer erhöhten Mitophagie und damit besseren Qualitätskontrolle der Mitochondrien.

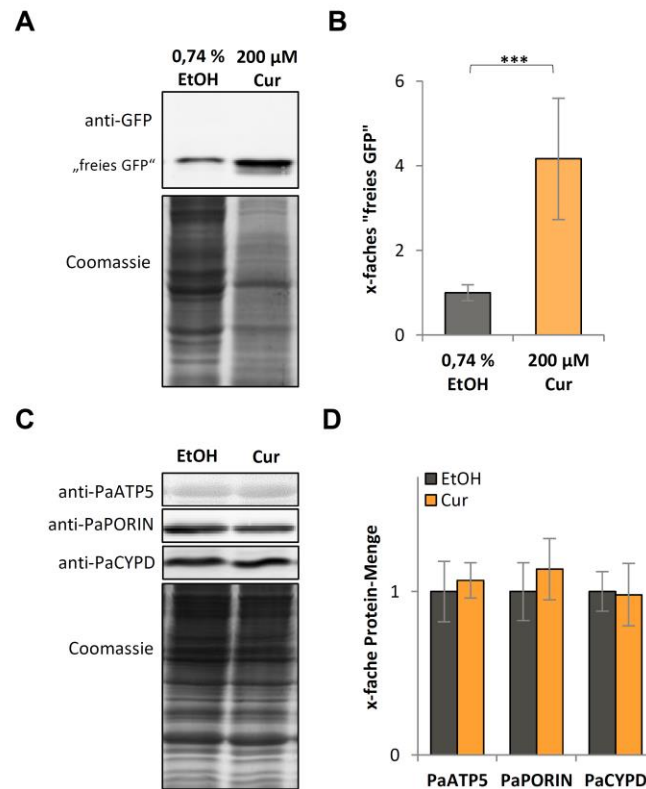


Abbildung 34: Mitochondrien-Menge bleibt trotz gesteigerter Mitophagie-Rate unverändert. (A) Western-Blot-Analysen zur Bestimmung der Mitophagie-Raten von 10 d alten *P. anserina PaSod3^{H26L}::Gfp* Stämmen nach Anzucht mit 0,74 % Ethanol oder 200 µM Curcumin (je n = 7) für 24 Stunden. (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analysen aus (A) Die Menge an „freiem GFP“ wurde jeweils auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der EtOH-Kontrollen berechnet. (C) Western-Blot-Analyse zum Nachweis der Menge verschiedener mitochondrialer Proteine im Gesamtprotein von 10 d alten Wildtyp-Stämmen nach dauerhafter Anzucht auf 0,19 % EtOH oder 50 µM Curcumin (je n = 4). (D) Quantifizierung der Menge an mitochondrialen Proteinen aus (C). Die Mengen der Proteine wurden auf das Coomassie-gefärbte Gel normalisiert und anschließend relativ zum Mittelwert der EtOH-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ****p* < 0,001.

Aufgrund der potentiellen Induktion von Autophagie stellte sich nun die Frage, ob eine intakte Autophagie-Maschinerie notwendig für die Curcumin-induzierte Lebensverlängerung ist. Um diese mögliche Verbindung zu überprüfen, wurden vergleichende Lebensspannenanalysen mit $\Delta PaAtg1$ - und Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 50 µM Curcumin oder 0,19 % EtOH durchgeführt.

Tatsächlich wird die Lebensspanne von $\Delta PaAtg1$ durch Curcumin-Behandlung im Vergleich zur Wildtyp nicht verlängert (Abbildung 35A). Die mittlere Lebensspanne der $\Delta PaAtg1$ auf Curcuminhaltigem Medium ist unverändert im Vergleich zur EtOH-Kontrolle (Abbildung 35B). Anders als die Lebensspanne wird die Wachstumsrate der $\Delta PaAtg1$ genauso wie die des Wildtyps durch Curcumin

leicht verringert (Abbildung 35C). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass Autophagie notwendig ist für die Curcumin-induzierte Lebensverlängerung des *P. anserina*-Wildtyps.

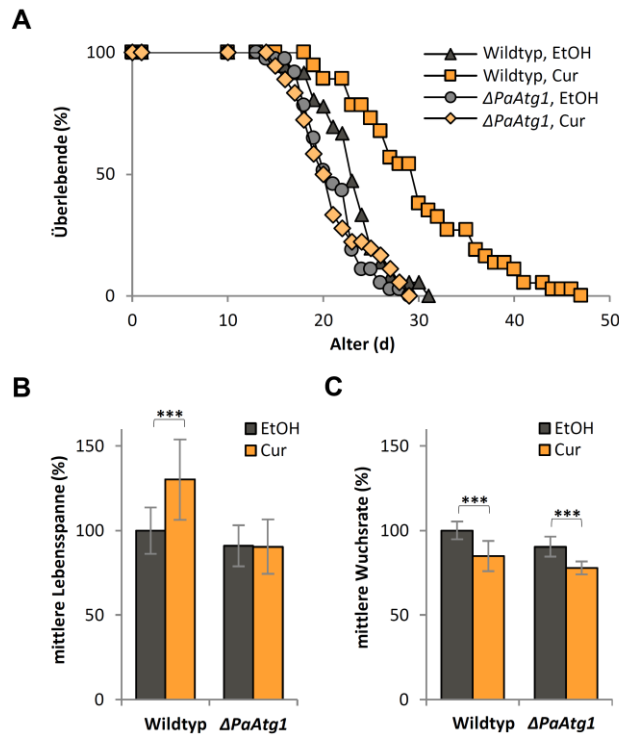


Abbildung 35: Curcumin induziert Autophagie-abhängige Lebensverlängerung. (A) Lebensspanne von $\Delta PaAtg1$ - und Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 36) oder 50 μ M Curcumin (Cur; n = 36). (B) Mittlere Lebensspanne und (C) relative Wuchsrates der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der EtOH-Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für Curcumin relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Curcumin-induzierte Lebensverlängerung ist abhängig von der PaSOD1-Aktivität und der H₂O₂-Menge

Als nächstes wurde die Frage angegangen, wodurch die Autophagie und somit die Lebensverlängerung induziert wird. Aus den vorangegangenen Untersuchungen wird die durch eine gesteigerte PaSOD1-Aktivität erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge als mögliche Ursache vermutet. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden verschiedene Lebensspannen-Analysen durchgeführt. Sollte tatsächlich die Lebensverlängerung von der durch PaSOD1 generierten erhöhten Wasserstoffperoxidmenge abhängen, dann sollte eine *PaSod1*-Deletionsmutante nicht länger leben nach Curcumin-Behandlung. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere SODs die Funktion von PaSOD1 zumindest teilweise übernehmen. Daher wurde zuerst eine Mutante untersucht, der alle drei SODs fehlen. Eine Behandlung dieser Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) mit Curcumin zeigte, verglichen zur EtOH-Behandlung, keinen Einfluss auf die

Lebensspanne (Abbildung 36A). Also wird in $\Delta PaSod1/2/3$ keine Langlebigkeit durch Curcumin induziert. Auch die mittlere Lebensspanne (Abbildung 36B) und die Wachsrates (Abbildung 36C) sind in der Deletionsmutante nach Curcumin-Behandlung unverändert. Dies bestätigt die Vermutung, dass die SOD-Aktivität eine entscheidende Rolle bei der Curcumin-induzierten Lebensverlängerung spielt. Ob nun ausschließlich die PaSOD1 ursächlich für die Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Menge ist und damit den Effekt auf die Lebensspanne verursacht, sollte nun mit Hilfe von Lebensspannenanalysen einer *PaSod1*-Deletionsmutante ($\Delta PaSod1$) ermittelt werden. Und tatsächlich ist die Lebensspanne von $\Delta PaSod1$ durch Curcumin im Vergleich zu EtOH ebenfalls nicht verlängert (Abbildung 36D). Wie im Falle der Dreifach-Deletion, ist auch in der $\Delta PaSod1$ die mittlere Lebensspanne (Abbildung 36E) und die Wachsrates (Abbildung 36F) unverändert.

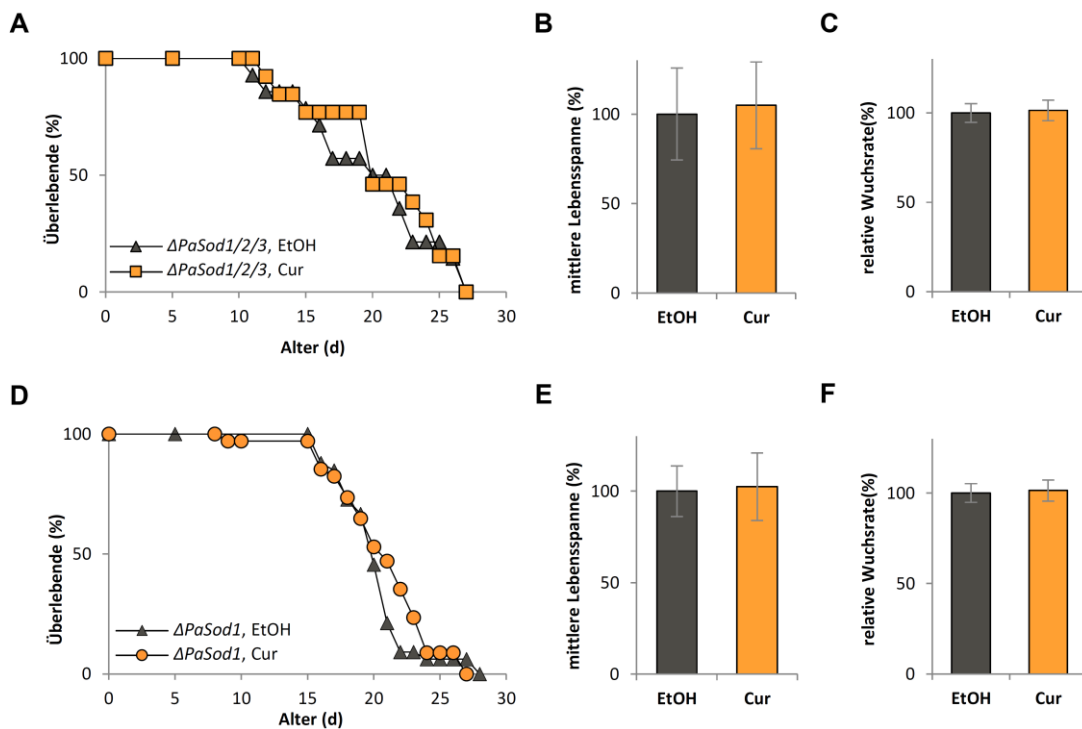


Abbildung 36: Curcumin-induzierte Lebensverlängerung ist PaSOD1-abhängig. (A) Lebensspanne von $\Delta PaSod1/2/3$ -Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 13) oder 50 μ M Curcumin (Cur; n = 13; *p*-Wert = 0,683). (B) Mittlere Lebensspanne und (C) relative Wachsrates der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der EtOH-Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für Curcumin relativ dazu berechnet. (D) Lebensspanne von $\Delta PaSod1$ -Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 33) oder 50 μ M Curcumin (Cur; n = 34; *p*-Wert = 0,315). (E) Mittlere Lebensspanne und (F) relative Wachsrates der Stämme aus (D). Die Mittelwerte der EtOH-Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für Curcumin relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach Warnsmann und Osiewacz (2016).

Da die Curcumin-induzierte Lebensverlängerung abhängig von der PaSOD1-Aktivität ist, ist es auch denkbar, dass die daraus resultierend erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge notwendig für die Lebensspannen-Verlängerung ist. Um dies zu analysieren, wurden Lebensspannen mit Curcumin

und EtOH unter Zugabe des Antioxidationsmittels N-Acetyl-L-Cystein (NAC) durchgeführt. Dieses Antioxidationsmittel ist dafür bekannt, dass es bevorzugt Wasserstoffperoxid abfängt. Durch die so reduzierte Wasserstoffperoxid-Menge wird die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps weniger stark durch Curcumin verlängert als ohne die zusätzliche Zugabe von NAC (Abbildung 37A). Die Verlängerung der mittleren Lebensspanne beträgt gerade 9 % durch Curcumin plus NAC, im Vergleich zu einer Verlängerung um 25 % durch Curcumin allein (Abbildung 37B). Dieses Ergebnis bestätigt eine Rolle von Wasserstoffperoxid in der Curcumin-induzierten Lebensverlängerung.

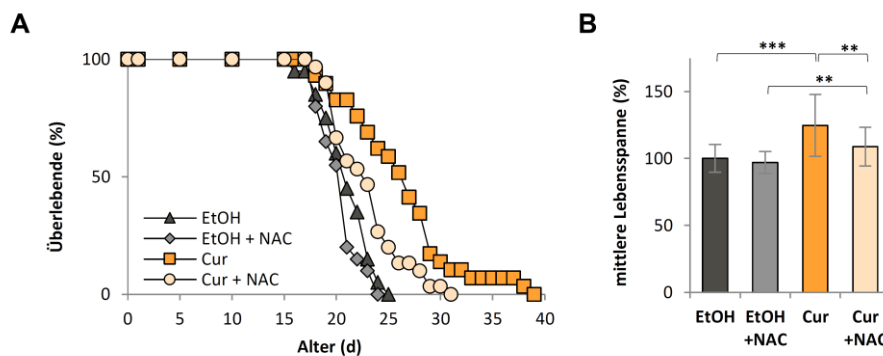


Abbildung 37: Wasserstoffperoxid ist notwendig für die Curcumin-induzierte Langlebigkeit. (A) Lebensspanne von Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,19 % Ethanol (EtOH; n = 20), 0,19 % EtOH + 200 μ M NAC (n = 20), 50 μ M Curcumin (Cur; n = 29; *p*-Wert (bezogen auf EtOH) = 0,000012) oder 50 μ M Curcumin + 200 μ M NAC (n = 30; *p*-Wert (bezogen auf EtOH + NAC) = 0,0019). **(B)** Mittlere Lebensspanne der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der EtOH-Kontrollen wurden auf 100 % gesetzt und die anderen Werte relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ***p* < 0,01; *** *p* < 0,001.

Alle Daten aus den Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Curcumin ergaben, dass Curcumin die Atmungsrate steigert, das entstehende Superoxid wird durch die erhöhte PaSOD1-Aktivität verstärkt zu Wasserstoffperoxid umgesetzt. Das Wasserstoffperoxid reichert sich in der Zelle an und führt zu einer Induktion der nicht-selektiven Autophagie, welche positiv auf die Lebensspanne wirkt. Diese positive Wirkung ist notwendig für die Curcumin-induzierte Lebensverlängerung und abhängig von Wasserstoffperoxid.

4.2.3 Quercetin - Methyltransferase-vermittelte Lebensverlängerung

Quercetin bewirkt eine Lebensverlängerung in *P. anserina*

Initiale Daten zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Quercetin im Rahmen der Bachelorarbeit von Saskia Hainbuch (Hainbuch, 2016) machen dieses Polyphenol zu einem interessanten Kandidaten für weitere detaillierte Analysen. Übereinstimmend mit Befunden aus *S. cerevisiae* und *C. elegans* (Belinha *et al.*, 2007; Kampkötter *et al.*, 2008; Pietsch *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2008) wurde von Saskia Hainbuch eine Lebensverlängerung des *P. anserina*-Wildtyps nach Behandlung mit 300 μ M Quercetin ermittelt (Hainbuch, 2016). Erste Analysen des zugrundeliegenden Mechanismus in geringer Stichprobenzahl wurden bereits im Rahmen der Bachelorarbeit durchgeführt und ergaben Hinweise auf eine veränderte Mitochondrienfunktion sowie einen veränderten ROS-Stoffwechsel, jedoch ohne Bezug auf die Lösungsmittel-Kontrolle (DMSO) (Hainbuch, 2016). Interessanterweise wurden auch Hinweise auf eine Induktion der Catechol-O-Methyltransferase PaMTH1 gefunden (Hainbuch, 2016). Diese O-Methyltransferase wurde schon in früheren Untersuchungen mit dem Alterungsprozess und dem ROS-Haushalt von *P. anserina* in Verbindung gebracht (Averbeck *et al.*, 2000; Groebe *et al.*, 2007; Kunstmann und Osiewacz, 2008, 2009). Zusätzlich wurde in *in-vitro* Studien Quercetin als ein mögliches Substrat von PaMTH1 gefunden (Kunstmann und Osiewacz, 2008). Dennoch ist der zugrundeliegenden Wirkmechanismus der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung nicht vollständig aufgeklärt.

Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, die Befunde der Bachelorarbeit von Saskia Hainbuch in einer größeren Stichprobenzahl zu verifizieren und statistisch abzusichern. Darüber hinaus sollte der Wirkmechanismus, insbesondere die Rolle der PaMTH1, detailliert untersucht werden. Dazu wurde zunächst der Effekt des Lösungsmittels DMSO untersucht. Übereinstimmend zu den Analysen von Saskia Hainbuch wurden in der vorliegenden Arbeit 300 μ M Quercetin und entsprechend des zugegebenen Volumens 0,15 % DMSO verwendet. Untersuchungen der Lebensspanne, der Wachstumsrate und des Sauerstoffverbrauches ergaben keine Veränderungen durch eine DMSO-Behandlung im Vergleich zum unbehandelten *P. anserina*-Wildtyps (Abbildung 38A-C).

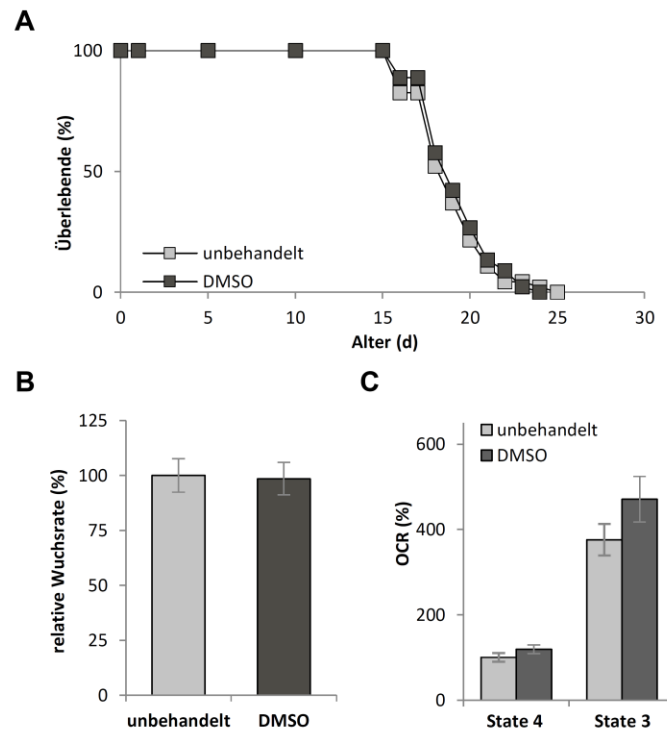


Abbildung 38: Einfluss von 0,15 % DMSO auf die Lebensspanne und Atmung des *P. anserina*-Wildtyps. (A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 45) oder ohne Zusatz (unbehandelt; n = 46). **(B)** Relative Wuchsrate der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der der unbehandelten Stämme wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für DMSO relativ dazu berechnet. **(C)** Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 7 d alten Wildtyp-Isolaten, die entweder mit 0,15 % DMSO behandelt wurden oder ohne Behandlung (je 3 biologische Replikate, mit jeweils 3-4 technischen Replikaten). Der Sauerstoffverbrauch der unbehandelten Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relative dazu berechnet. Angegeben sind die relativen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Die anschließenden Analysen der Lebensspanne von Wildtyp-Stämmen angezogen auf Medium mit Quercetin oder DMSO ergaben einen lebensverlängernden Effekt von Quercetin (Abbildung 39A). Die maximale Lebensspanne wird durch Quercetin um ca. 17 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle verlängert (Abbildung 39A). Passend dazu wird die mittlere Lebensspanne durch Quercetin um 10,2 %, von 19 d auf 21 d, verlängert (Abbildung 39B). Wie aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen von Saskia Hainbuch zu erwarten (Hainbuch, 2016), wird die Wuchsrate durch diese Quercetin-Konzentration (300 μ M) kaum beeinflusst und nur um 5 % verringert (Abbildung 39C).

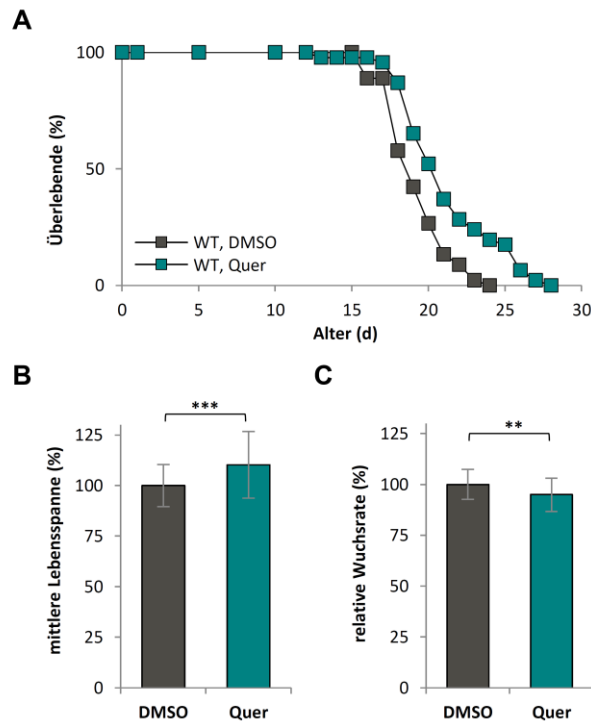


Abbildung 39: Lebensspannenverlängerung des *P. anserina*-Wildtyps durch Quercetin. (A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 45) oder 300 μ M Quercetin (Quer; n = 46; p-Wert = 0,0002). (B) Mittlere Lebensspanne und (C) relative Wachstumsrate der Stämme aus (A). Die Mittelwerte der DMSO-Kontrollen wurden jeweils auf 100 % gesetzt und die Werte für Quercetin relativ dazu berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. **p < 0,01; ***p < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Erhöhung der mitochondrialen Atmung durch Quercetin

In der vorangegangenen Bachelorarbeit wurde bereits der Effekt von Quercetin im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp untersucht und Veränderungen aufgedeckt (Hainbuch, 2016). Zur Abklärung und Bestätigung dieser Veränderungen wurde nun der Effekt einer Quercetin-Behandlung gegenüber einer DMSO-Behandlung (Lösungsmittel-Kontrolle) auf den *P. anserina*-Wildtyp untersucht. Die Analysen der Wirkung von Quercetin auf die CI-abhängige OCR zeigten eine deutliche Erhöhung der OCR im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abbildung 40A). Sowohl die „State 4“- als auch die „State 3“-OCR wird signifikant um 47 % bzw. 41 % durch Quercetin gegenüber der Kontrolle erhöht (Abbildung 40A). Diese Atmungserhöhungen stehen sehr häufig mit einer Veränderung in den Atmungskettenkomplexen, genauer den mtRSCs, in Verbindung (Bianchi *et al.*, 2004; Genova und Lenaz, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000). Daher wurde als nächstes der Aufbau der Atmungskette durch BN-PAGE Analyse untersucht und Veränderungen gefunden. Im Einzelnen erhöht die Anzucht auf Medium mit Quercetin die Menge der mtRSCs S_2 und S_1 und verringert die Menge an mtRSC S_0 und den monomeren Komplexen I und IV (Abbildung 40B, C). So beruht die Quercetin-vermittelte Erhöhung der CI-abhängigen OCR vermutlich auf einer Zunahme der mtRSCs.

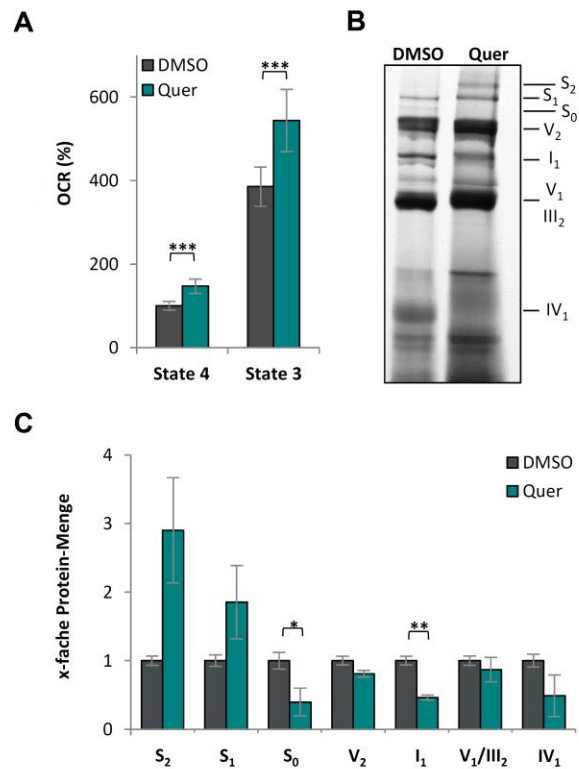


Abbildung 40: Quercetin erhöht die mitochondriale Atmung und Menge der Atmungskettenkomplexe. (A) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 7 d alten Wildtyp-Isolaten, die entweder mit 0,15 % DMSO (n = 4 biologische Replikate, mit jeweils 3-5 technischen Replikaten) oder 300 µM Quercetin (n = 4 biologische Replikate, mit jeweils 4-7 technischen Replikaten) behandelt wurden. Der Sauerstoffverbrauch der DMSO-Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relativ dazu berechnet. (B) Repräsentative BN-PAGE-Analyse mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf 0,15 % DMSO oder 300 µM Quercetin (n = 3, je 100 µg). Die Cl₁CIII₂CIV₀₋₂ (S₀₋₂) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III₂ und V₂) und die monomeren Komplexe I₁, IV₁ und V₁ wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (C) Densitometrische Auswertung der BN-PAGE in (B). Die Mengen der Komplexe wurden auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Spur normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Gesteigerter Superoxid-Ausstoß durch Quercetin

Wie zuvor bei den anderen Polyphenolen folgte standardmäßig die Analyse des Quercetin-Einflusses auf den ROS-Stoffwechsel. Unterstützt wird dieses Standardvorgehen zum einen durch die Tatsache, dass Änderungen der Atmung die ROS-Bildung beeinflussen und zum anderen, dass die charakteristischen Catechol-Gruppen von Quercetin zwei benachbarte (vicinale) Hydroxyl-Reste enthalten, welche ebenso die ROS-Bildung beeinflussen können (Knab und Osiewacz, 2010). Daher wurde die ROS-Menge nach Quercetin-Behandlung mit histochemischen Färbungen der extrazellulären ROS-Menge (Munkres, 1990) untersucht und Unterschiede gefunden. Im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle erhöht eine Quercetin-Behandlung den Superoxid-Ausstoß und verringert den Wasserstoffperoxid-Ausstoß (Abbildung 41A).

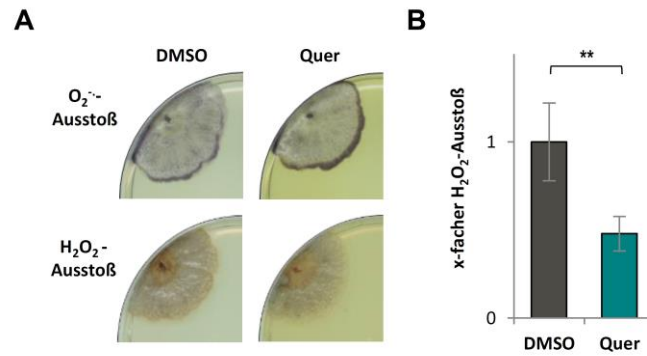


Abbildung 41: Veränderungen der ROS-Menge durch Quercetin-Behandlung. (A) Qualitative Bestimmung der extrazellulären Superoxid- ($O_2^{\bullet-}$; NBT-Färbung) und Wasserstoffperoxid-Menge (H_2O_2 ; DAB-Färbung) von 7 d alten Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin. Die Intensität der Myzelfärbung entspricht der Menge des ausgestoßenen Superoxids bzw. Wasserstoffperoxids. **(B)** Quantitative Messung des H_2O_2 -Ausstoßes von 7 d alten Wildtyp-Stämmen. (5 biologische Replikate mit je 3 technischen Replikaten, angezogen wie in (A)). Abgebildet sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. $**p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Die verringerte Wasserstoffperoxid-Freisetzung wurde durch eine photometrische Messung quantifiziert. Übereinstimmend ergab diese Messung eine 50%ige Reduktion des Wasserstoffperoxids durch die Anzucht auf Quercetin im Vergleich zu DMSO (Abbildung 41B). Dies deutet, im Gegenteil zu den Ergebnissen der anderen beiden Polyphenole, auf eine Verringerung der SOD-Aktivitäten hin. Da durch eine verringerte SOD-Aktivität weniger Superoxid zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird, würde sich das Superoxid anstauen und die Wasserstoffperoxid-Menge abnehmen. Daher wurden als nächstes die Aktivitäten und Protein-Mengen der SODs bestimmt. „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen ergaben eine deutliche Abnahme der PaSOD1-Aktivität in auf Quercetin-haltigem Medium angezogenen Wildtyp-Stämmen verglichen zu auf DMSO-haltigem Medium angezogenen Stämmen (Abbildung 42A). Im Gegensatz hierzu sind die Aktivitäten der sekretierten PaSOD2 (Abbildung 42A) und der mitochondrialen PaSOD3 (Abbildung 42B) nicht verändert. Wie in den Untersuchungen mit den anderen Polyphenolen ist die Protein-Menge der SODs unverändert (Abbildung 42C, D), da sie bekanntermaßen post-translational reguliert werden (Borghouts *et al.*, 2002; Wiemer und Osiewacz, 2014).

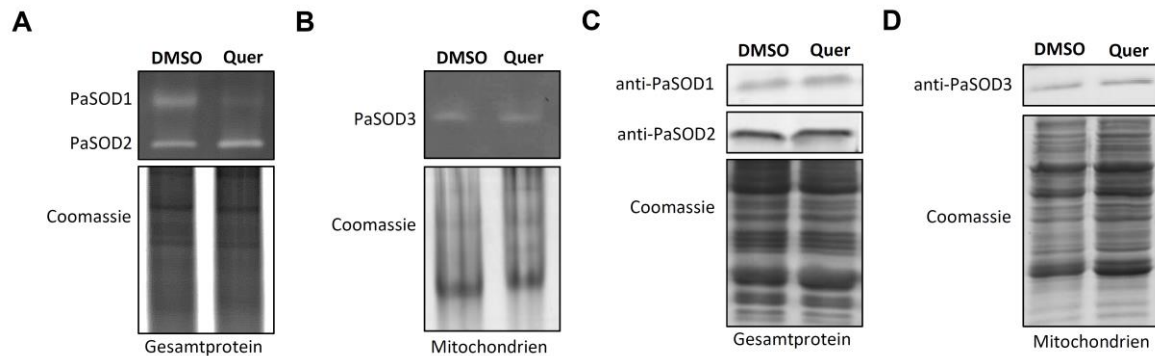


Abbildung 42: Veränderung der ROS-Menge beruht auf einer veränderten Superoxid-Detoxifizierung. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität in Gesamtproteinextrakten und (B) repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD3-Aktivität in mitochondrialen Proteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin. Es wurden je 100 μ g Gesamtprotein ($n = 4$) oder Mitochondrienprotein ($n = 3$) aufgetragen. Als Ladekontrolle dienen die Coomassie-gefärbten Gele (C) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der SOD-Mengen. Es wurden dieselben Proben wie in (A) verwendet. (D) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaSOD3-Mengen in den gleichen Proben wie (B). Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Durch die reduzierte Wasserstoffperoxid-Menge ist eine Abnahme der Aktivitäten von Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzymen anzunehmen. Deshalb wurden im Anschluss die Aktivitäten der Peroxidase und der Katalasen mit „In-Gel“-Färbungen untersucht. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nimmt die Aktivität der Peroxidase in Quercetin behandelten *P. anserina* Wildtyp-Stämmen ab (Abbildung 43A). Wohingegen die Aktivität der Katalasen durch die Quercetin-Behandlung unverändert bleibt (Abbildung 43B).

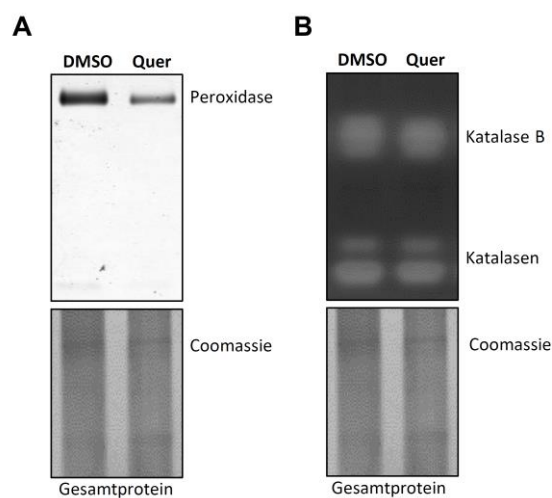


Abbildung 43: Quercetin reduziert die Peroxidase-Aktivität. (A) Repräsentative Ausschnitte einer „In-Gel“-Peroxidase-Aktivitätsfärbung und (B) einer „In-Gel“-Katalase-Aktivitätsfärbung mit Gesamtproteinextrakten aus 7 d alten Wildtyp-Stämmen nach Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin. Es wurden je 30 μ g Gesamtproteinextrakt von insgesamt vier biologischen Replikaten analysiert. Als Ladekontrolle diente ein Coomassie-gefärbtes Gel. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass das ROS-Detoxifizierungssystem durch Quercetin-Behandlung beeinträchtigt wird. Diese Beeinträchtigung trägt zu einer erhöhten Superoxid-Menge im *P. anserina*-Wildtyp bei. Dies ist das genaue Gegenteil des Effektes einer Behandlung mit den anderen beiden Polyphenolen, bei denen die Superoxid-Detoxifizierung gesteigert ist und dadurch die Wasserstoffperoxid-Menge ansteigt, und belegt, dass eine Erhöhung von Wasserstoffperoxid kein allgemeingültiger Bestandteil des Wirkmechanismus von Polyphenolen ist. Denkbar ist aber, dass auch eine Abnahme der Wasserstoffperoxid-Menge Signale in der Zelle auslösen kann.

PaMTH1 ist notwendig für die induzierte Lebensverlängerung

Da eine Methylierung der vicinalen Hydroxyl-Gruppen von Polyphenolen die ROS-Bildung beeinflussen kann (Heijnen *et al.*, 2002) und frühere *in-vitro*-Analysen in *P. anserina* zeigten, dass Quercetin ein mögliches Substrat der *O*-Methyltransferase PaMTH1 ist (Kunstmann und Osiewacz, 2008), wurde nun untersucht, ob Quercetin einen Einfluss auf die PaMTH1-Menge hat. Eine Western-Blot-Analyse mit Gesamtprotein aus Wildtyp-Stämmen behandelt mit Quercetin oder DMSO ergab, dass die PaMTH1-Menge durch Quercetin-Behandlung signifikant um das 1,6-fache im Vergleich zur DMSO-Behandlung ansteigt (Abbildung 44A, B). Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Befunden aus der Bachelorarbeit von Saskia Hainbuch mit einer geringeren Stichprobenzahl überein (Hainbuch, 2016).

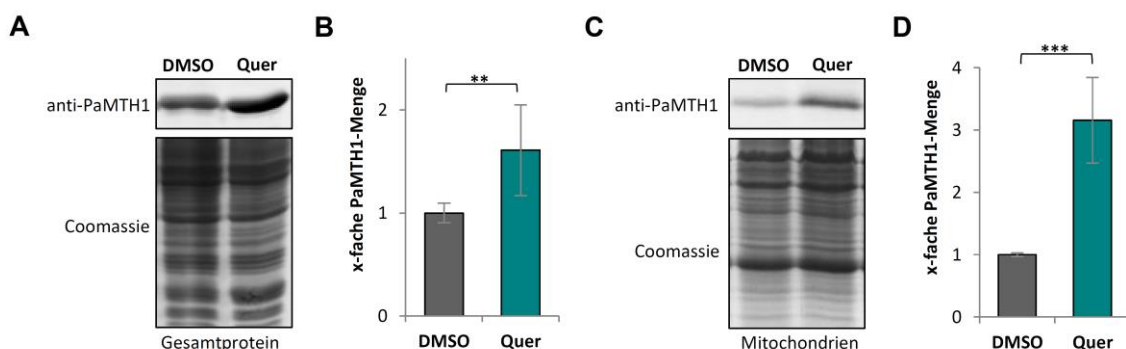


Abbildung 44: Quercetin erhöht die PaMTH1-Menge des Wildtyps. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaMTH1-Menge in Gesamtprotein von Wildtyp-Stämmen angezogen auf 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin (je n = 10). (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (A). Protein-Mengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. (C) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaMTH1-Menge in mitochondrialen Proteinextrakten von Wildtyp-Stämmen angezogen auf 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin (je n = 6). (D) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (C). Protein-Mengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Wegen der bekannten Translokation der PaMTH1 aus dem Zytosol in die Mitochondrien während der Alterung (Averbeck *et al.*, 2000; Groebe *et al.*, 2007; Kunstmann und Osiewacz, 2008) wurde ferner die Menge in den Mitochondrien bestimmt. Im Verhältnis zum Anstieg im Zytosol stieg die Menge in den Mitochondrien doppelt so stark, nämlich um das 3,2-fache, in den Quercetin-behandelten Wildtyp-Stämmen an (Abbildung 44C, D).

Dieser Anstieg der PaMTH1-Menge suggeriert eine Rolle der O-Methyltransferasen in der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung. Um diese Annahme experimentell zu belegen, wurde der Einfluss von Quercetin in einer *PaMth1*-Deletionsmutante ($\Delta PaMth1$) bzw. einer *PaMth1*-Überexpressionsmutante (*PaMth1_OEx*) untersucht. Zuerst wurde die Lebensspanne der beiden Mutanten auf Medium mit Quercetin oder dem Lösungsmittel DMSO bestimmt. Auffällig hierbei war, dass im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 39A) die maximale Lebensspanne von $\Delta PaMth1$ nicht von Quercetin verändert wird (Abbildung 45A). Entsprechend wurde die mittlere Lebensspanne der Deletionsmutante nicht verlängert (Abbildung 45B). Ebenso weist auch die Wachstumsrate der Deletionsmutante keine Veränderungen durch Quercetin auf (Abbildung 45C).

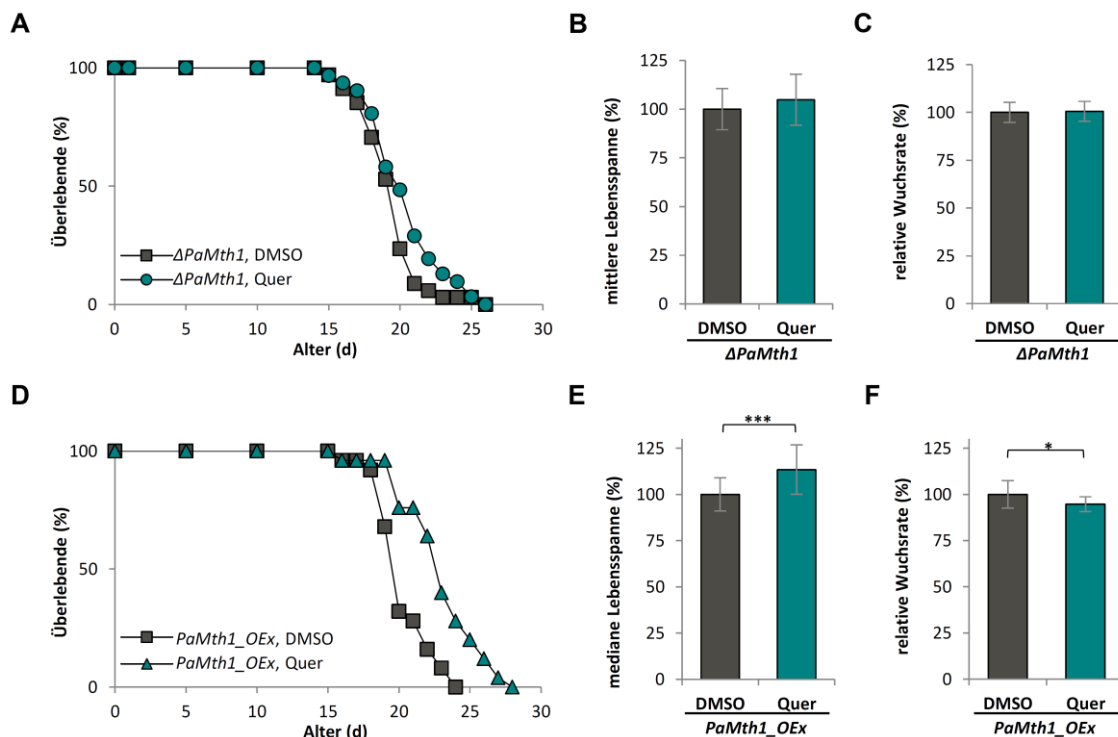


Abbildung 45: Quercetin-induzierte Lebensverlängerung hängt von PaMTH1-Menge ab. (A) Lebensspanne von $\Delta PaMth1$ -Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 34) oder 300 μ M Quercetin (Quer; n = 31; p-Wert = 0,11). (B) Mittlere Lebensspanne und (C) relative Wachstumsrate der Stämme aus (A). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle \pm Standardabweichung angegeben. (D) Lebensspanne von *PaMth1_OEx*-Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 25) oder 300 μ M Quercetin (Quer; n = 25; p-Wert = 0,0005). (E) Mittlere Lebensspanne und (F) relative Wachstumsrate der Stämme aus (D). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle \pm Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. *p < 0,05; ***p < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Anders als im Wildtyp zeigt Quercetin keinen lebensverlängernden Effekt auf die *PaMth1*-Deletionsmutante. Im Gegensatz dazu wird durch Quercetin die Lebensspanne der *PaMth1*-Überexpressionsmutante verlängert (Abbildung 45D). Interessanterweise ist die mittlere Lebensspanne der *PaMth1_OEx* signifikant stärker erhöht durch die Anzucht auf Quercetin als die des Wildtyps verglichen zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (Abbildung 45E). In Zahlen ist die mittlere Lebensspanne der Mutante um 13,4 %, von 20 d auf 23 d erhöht (Abbildung 45E), während zuvor eine 10,2%ige Erhöhung im Wildtyp gezeigt wurde (Abbildung 39B). Darüber hinaus wird die Wachstumsrate in der *PaMth1_OEx*, wie im Wildtyp, leicht um 5 % verringert (Abbildung 45F). Vergleichende Analysen der PaMTH1-Menge im Wildtyp und der *PaMth1*-Überexpressionsmutante ergaben eine deutlich erhöhte Menge in der Mutante (Abbildung 46A, B). Auch im Vergleich zum Quercetin-behandelten Wildtyp steigt die PaMTH1-Menge in der Überexpressionsmutante deutlich an.

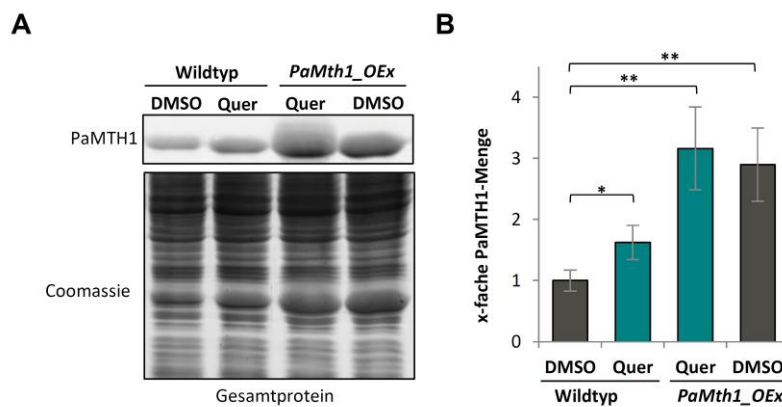


Abbildung 46: Die PaMTH1-Menge ist in *PaMth1_OEx* höher als im Wildtyp mit Quercetin. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaMTH1-Menge in Gesamtprotein von Stämmen des *P. anserina*-Wildtyps und der *PaMth1*-Überexpressionsmutante angezogen auf 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin (jeweils n = 4). **(B)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (A). Proteinmengen wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der Wildtyp DMSO-Kontrollen berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Diese Daten deuten darauf hin, dass Quercetin im *P. anserina*-Wildtyp zumindest teilweise methyliert wird. Entsprechend wird das Flavonoid in der *PaMth1*-Deletionsmutante kaum oder gar nicht und dagegen in der Überexpressionsmutante vermehrt methyliert. Demnach scheint die Lebensverlängerung abhängig vom Methylierungs-Status von Quercetin zu sein. Somit ist eine PaMTH1-abhängige Methylierung von Quercetin notwendig für die vermittelte Lebensverlängerung.

Effekte auf Atmung und ROS-Menge sind abhängig von der PaMTH1-Menge

Da der Lebensspannen-Effekt von Quercetin PaMTH1-abhängig ist, steht die Vermutung im Raum, dass auch die anderen ermittelten Quercetin-Effekte auf die Atmung und den ROS-Stoffwechsel mit der O-Methyltransferase-Aktivität verbunden sind. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde zuerst die Atmung der auf Quercetin- oder DMSO-haltigem Medium angezogenen *PaMth1*-Mutanten mit Sauerstoffverbrauchs-Messungen untersucht. Überraschenderweise ist die CI-abhängige OCR von $\Delta PaMth1$ sowohl in „State 4“ als auch „State 3“ deutlicher erhöht in den Quercetin-behandelten verglichen zu DMSO-behandelten Stämmen (Abbildung 47A) als es im Wildtyp der Fall ist. So erhöht Quercetin die OCR in der Deletionsmutante ca. um das 2-fache (Abbildung 47A), im Wildtyp jedoch nur um 47 % bzw. 41 % (Abbildung 40A). Im Gegensatz dazu ist der Effekt von Quercetin auf die CI-abhängige OCR der *PaMth1_OEx* viel geringer als der Effekt auf den Wildtyp. Die CI-abhängige OCR wird nur um 40 % bzw. 29 % gegenüber der DMSO-Kontrolle reduziert (Abbildung 47B).

Als nächstes wurde untersucht, ob der Methylierungs-Status von Quercetin einen Einfluss auf die detektierten Effekte auf den ROS-Stoffwechsel hat. Hierzu wurde zunächst die Freisetzung von Superoxid- und Wasserstoffperoxid der beiden *PaMth1*-Mutanten auf Medium mit Quercetin- oder DMSO-Zusatz mit histochemischen Myzelfärbungen untersucht. Im Vergleich zum Wildtyp ist die freigesetzte Superoxid-Menge in der Deletionsmutante deutlich höher und in der Überexpressionsmutante kaum verändert durch Quercetin-Behandlung jeweils bezogen auf die DMSO-Kontrolle (Abbildung 47C). Ein ähnliches Verhältnis wurde auch in Bezug auf den Wasserstoffperoxid-Ausstoß gefunden. Hier ist der Ausstoß in $\Delta PaMth1$ verglichen zum Wildtyp deutlich verringert und in *PaMth1_OEx* kaum bis gar nicht beeinflusst durch Quercetin (Abbildung 47C).

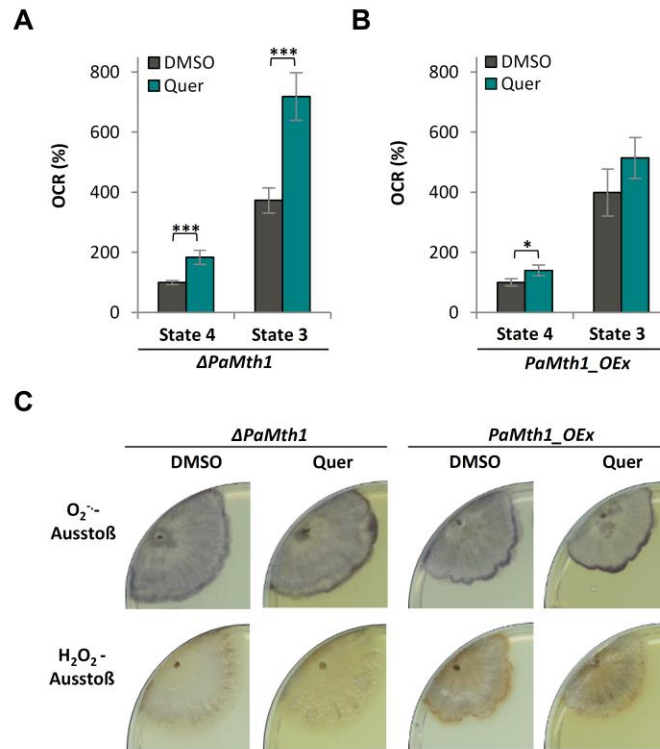


Abbildung 47: Effekte auf Atmung und ROS-Menge sind abhängig von der Quercetin-Methylierung. (A) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 7 d alten $\Delta PaMth1$ -Isolaten, die entweder mit 0,15 % DMSO (3 biologische Replikate, mit jeweils 5 technischen Replikaten) oder 300 μ M Quercetin (3 biologische Replikate, mit jeweils 6 technischen Replikaten) behandelt wurden. Die einzelnen Werte wurden relativ zum „State 4“ der DMSO-Kontrolle berechnet. **(B)** Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 7 d alten $PaMth1_OEx$ -Isolaten, die entweder mit 0,15 % DMSO (3 biologische Replikate, mit jeweils 5 technischen Replikaten) oder 300 μ M Quercetin (3 biologische Replikate, mit jeweils 5-6 technischen Replikaten) inkubiert wurden. Die einzelnen Werte wurden relativ zum „State 4“ der DMSO-Kontrolle berechnet. Angegeben sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. **(C)** Qualitative Bestimmung der extrazellulären Superoxid- ($O_2^{\cdot-}$; NBT-Färbung) und Wasserstoffperoxid-Menge (H_2O_2 ; DAB-Färbung) von 7 d alten $\Delta PaMth1$ - und $PaMth1_OEx$ -Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin. Die Intensität der Myzelfärbung entspricht der Menge des ausgestoßenen $O_2^{\cdot-}$ bzw. H_2O_2 . Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Diese unterschiedlichen Quercetin-Effekte, abhängig vom Methylierungs-Status, ließen die Vermutung aufkommen, dass auch die Effekte auf die ROS-Detoxifizierung in den $PaMth1$ -Mutanten verändert sind. Analysen der PaSOD1-Aktivität durch „In-Gel“-Färbungen bekräftigen diese Vermutung. In $\Delta PaMth1$ ist die Aktivität von PaSOD1 im Vergleich zum Wildtyp durch Quercetin stärker reduziert (Abbildung 48A). Wie zuvor schon im Wildtyp gezeigt, ist diese verringerte Aktivität nicht auf eine veränderte Protein-Menge zurückzuführen (Abbildung 48B). Analog zeigten „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen der Peroxidase, dass diese in $\Delta PaMth1$ eine geringere Aktivität zeigt als im Wildtyp verglichen zur jeweiligen DMSO-Kontrolle (Abbildung 48C). In $PaMth1_OEx$ -Stämmen sind die Effekte genau gegensätzlich zu $\Delta PaMth1$ -Stämmen. Im Vergleich zum Wildtyp und zur Deletionsmutante bleibt die PaSOD1-Aktivität der Überexpressionsmutante

durch Quercetin gegenüber DMSO unverändert (Abbildung 48D), sowie auch die Menge an PaSOD1 (Abbildung 48E). Entsprechend des scheinbar nicht veränderten ROS-Stoffwechsels durch Quercetin in *PaMth1_OEx*, zeigen „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen der Peroxidase lediglich eine geringe Reduktion der Aktivität durch Quercetin-Behandlung verglichen zu einer Behandlung DMSO (Abbildung 48F).

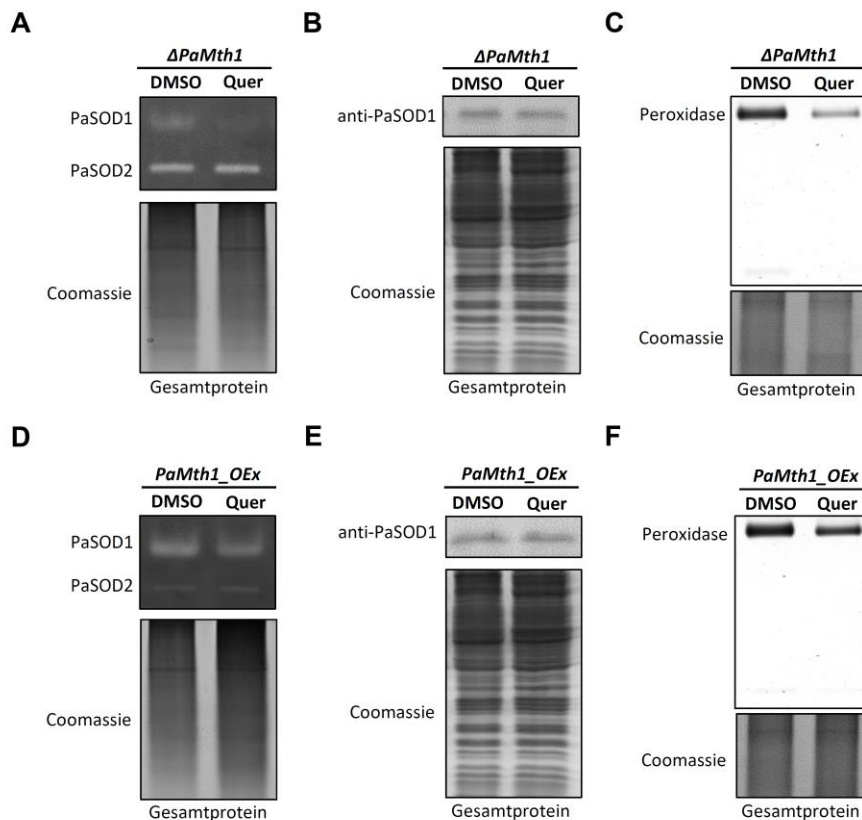


Abbildung 48: ROS-Detoxifizierung wird Methyltransferase-abhängig beeinflusst. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität, (B) repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaSOD1-Menge und (C) ein repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-Peroxidase-Aktivitätsfärbung mit Gesamtproteinextrakten aus $\Delta PaMth1$ -Stämmen nach Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin (je n = 4). Als Ladekontrolle dienten die jeweiligen Coomassie-gefärbten Gele. (D) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität, (E) repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaSOD1-Menge und (F) ein repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-Peroxidase-Aktivitätsfärbung mit Gesamtproteinextrakten aus *PaMth1_OEx*-Stämmen nach Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Quercetin (je n = 4). Als Ladekontrolle dienten die jeweiligen Coomassie-gefärbten Gele. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Diese Daten zur mitochondrialen Atmung und zum ROS-Stoffwechsel bestätigen den Verdacht einer Methyltransferase-abhängigen Quercetin-Wirkung in *P. anserina*. Nichtsdestotrotz sind nicht alle Effekte gleichermaßen von der Quercetin-Methylierung abhängig. Anders als der Effekt auf die Lebensspanne sind die Effekte auf die Atmung und den ROS-Stoffwechsel unabhängig von der

Quercetin-Methylierung. Scheinbar ist das methylierte Quercetin für den lebensverlängernden Effekt verantwortlich, wohingegen das unmethylierte Quercetin die Atmung und den ROS-Stoffwechsel beeinflusst und somit pro-oxidative Fähigkeiten aufweist.

Isorhamnetin verlängert die Lebensspanne des Wildtyps und der $\Delta PaMth1$

Um die Hypothese einer Methylierungs-Status abhängigen Wirkung von Quercetin experimentell nachzugehen, wurden Analysen mit einem am 3'-Hydroxyl-Rest methyliertem Quercetin-Derivat, dem Isorhamnetin, durchgeführt. Wie eine Quercetin-Behandlung verlängert auch eine Isorhamnetin-Behandlung die Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen verglichen zu DMSO-behandelten Wildtyp-Stämmen (Abbildung 49A). Die mittlere Lebensspanne wird gegenüber der DMSO-Kontrolle durch Isorhamnetin-Behandlung signifikant um 17,5 % von 20 d auf 23 d verlängert (Abbildung 49B). Auffällig hierbei ist, dass die Verlängerung der mittleren Lebensspanne durch Isorhamnetin (+ 17,5 %) ausgeprägter ist, als die durch Quercetin (+ 10,2 %). Da Quercetin in *P. anserina* Wildtyp-Stämmen im Gegensatz zu Isorhamnetin bei der Behandlung nur zum Teil methyliert in der Zelle vorliegt, bestätigen diese Ergebnisse einen Methylierungs-Status-abhängigen Effekt von Quercetin auf die Lebensspanne.

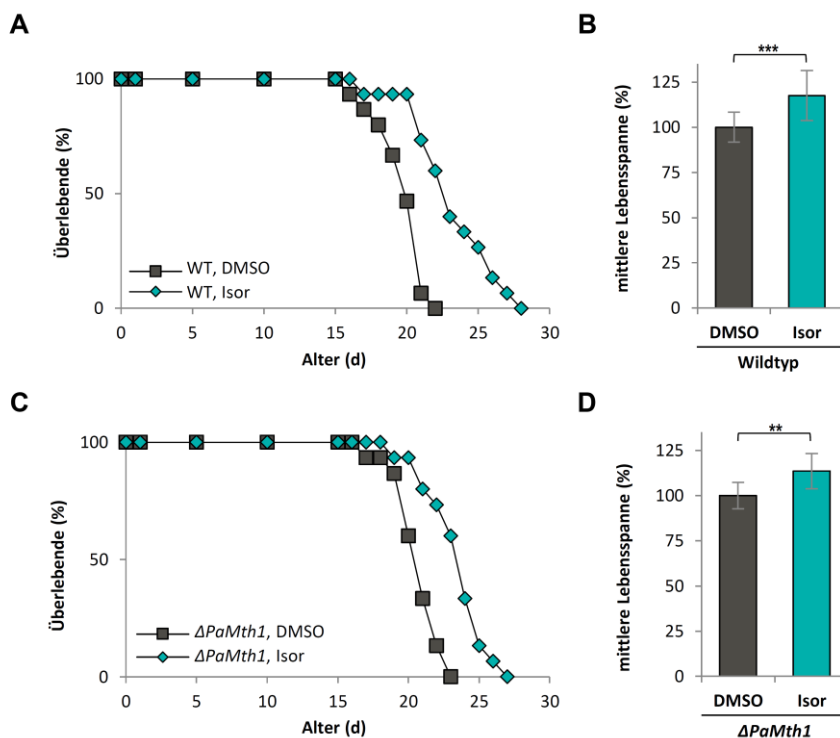


Abbildung 49: Isorhamnetin verlängert die Lebensspanne des Wildtyps und von $\Delta PaMth1$. (A) Lebensspanne von Wildtyp-Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 15) oder 300 μ M Isorhamnetin (Isor; n = 15; p-Wert = 0,00005). (B) Mittlere Lebensspanne der Stämme aus (A). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle \pm Standardabweichung angeben. (C) Lebensspanne von $\Delta PaMth1$ -

Stämmen auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO (n = 15) oder 300 µM Isorhamnetin (Isor; n = 15; *p*-Wert = 0,00008). (D) Mittlere Lebensspanne der Stämme aus (C). Die Daten sind als relative Werte bezogen auf die DMSO-Kontrolle ± Standardabweichung angeben. Signifikante Unterschiede sind mit „*“ gekennzeichnet. ***p* < 0,01; ****p* < 0,001. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Untersuchungen des Effekts einer Isorhamnetin-Behandlung der *PaMth1*-Deletionsmutante untermauern die Befunde aus den Untersuchungen mit *P. anserina* Wildtyp-Stämmen. Im Gegensatz zu Quercetin, dessen Methylierung eine PaMTH1-Aktivität benötigt, verlängert Isorhamnetin auch die Lebensspanne der *PaMth1*-Deletionsmutante (Abbildung 49C). Somit ist die Isorhamnetin-vermittelte Lebensverlängerung unabhängig der *O*-Methyltransferase. Entsprechend wird auch die mittlere Lebensspanne der Deletionsmutante durch eine Isorhamnetin-Behandlung signifikant um 13,5 % von 21 d auf 24 d im Vergleich zu einer DMSO-Behandlung erhöht (Abbildung 49D).

Als nächstes wurde mit einer Western-Blot-Analyse die Menge der PaMTH1 im Wildtyp nach Anzucht auf Isorhamnetin untersucht, um zu bestätigen, dass die Lebensverlängerung durch Isorhamnetin nicht mit einem Anstieg der PaMTH1-Menge verbunden ist. Wie erwartet ist die Protein-Menge der PaMTH1 in Wildtyp-Stämmen angezogen auf Medium mit Isorhamnetin im Vergleich zu Stämmen angezogen auf Medium mit DMSO unverändert (Abbildung 50A, B).

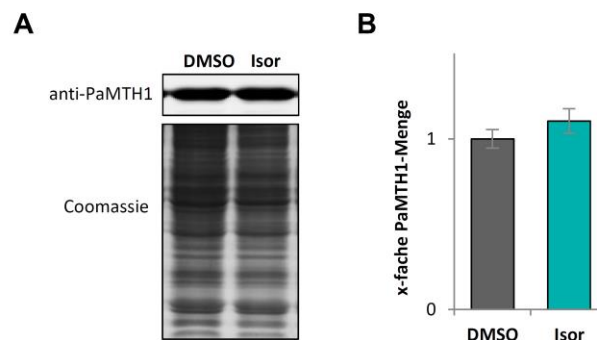


Abbildung 50: Keine Erhöhung der PaMTH1-Menge durch Isorhamnetin. (A) Repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der PaMTH1-Menge in Gesamtprotein von Wildtyp-Stämmen angezogen auf 0,15 % DMSO oder 300 µM Isorhamnetin (je n = 4). (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse aus (A). Protein-Menge wurden auf das Coomassie-gefärbte SDS-Gel normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet und als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Atmung und ROS-Menge durch Isorhamnetin nicht beeinflusst

Zur Überprüfung der Hypothese, dass nur unmethyliertes Quercetin einen Einfluss auf die Atmung und den ROS-Stoffwechsel hat, wurde der Effekt von Isorhamnetin untersucht. Zuerst wurde der Einfluss von Isorhamnetin auf den CI-abhängigen Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen angezogen auf Medium mit Isorhamnetin oder DMSO (Abbildung 51A) analysiert. Bezogen auf die DMSO-Kontrolle und abweichend zu den Ergebnissen mit Quercetin, ist die CI-abhängige OCR durch Isorhamnetin kaum beeinflusst. Nur die „State 4“-OCR wird leicht erhöht, während die „State 3“-OCR unverändert bleibt (Abbildung 51A).

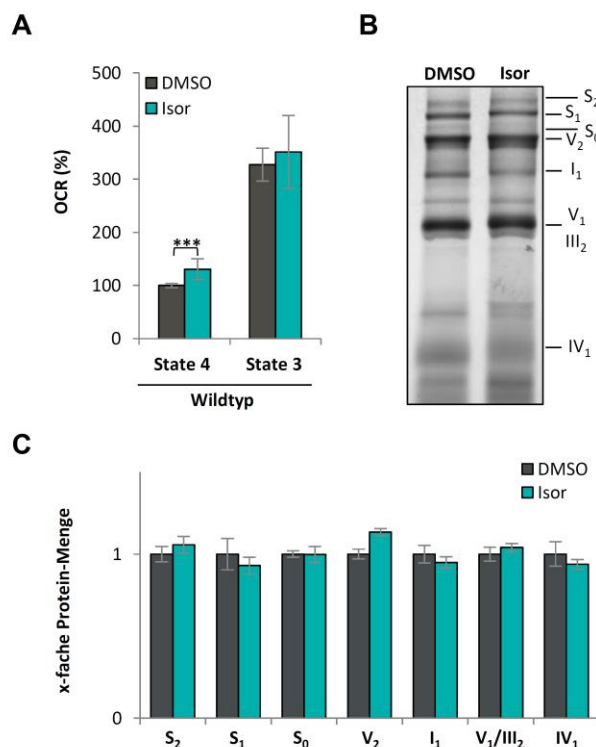


Abbildung 51: Isorhamnetin beeinflusst die mitochondriale Atmung nicht. (A) Sauerstoffverbrauchs-Messungen mit isolierten Mitochondrien aus 7 d alten Wildtyp-Isolaten, die entweder mit 0,15 % DMSO oder 300 µM Isorhamnetin behandelt wurden (je 4 biologische Replikate, mit jeweils 3-6 technischen Replikaten). Der Sauerstoffverbrauch der DMSO Kontrolle in „State 4“ wurde auf 100 % gesetzt und die übrigen Werte relative dazu berechnet. (B) Repräsentative BN-PAGE-Analyse mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp-Stämmen nach dauerhafter Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 µM Isorhamnetin (n = 3, je 100 µg). Die Cl₁ClIII₂CIV₀₋₂ (S₀₋₂) Superkomplexe, die dimeren Komplexe III und V (III₂ und V₂) und die monomeren Komplexe I₁, IV₁ und V₁ wurden nach der Auftrennung durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (C) Densitometrische Auswertung der BN-PAGE in (B). Die Mengen der Komplexe wurden auf die Gesamtfärbung der jeweiligen Spur normalisiert und relativ zum Mittelwert der DMSO-Kontrollen berechnet. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Entsprechend der nicht veränderten OCR zeigen BN-PAGE-Analysen einen unveränderten Aufbau der mitochondrialen Atmungskette von Isorhamnetin- und DMSO-behandelten Stämmen

(Abbildung 51B). Der optische Eindruck wurde durch eine densitometrische Quantifizierung bestätigt (Abbildung 51C).

Da die Atmung durch die Isorhamnetin-Behandlung nicht beeinflusst wird, ist es denkbar, dass auch der ROS-Stoffwechsel nicht beeinflusst wird. Zur Überprüfung wurde zunächst der Einfluss von Isorhamnetin auf die extrazelluläre ROS-Menge untersucht. Histochemische Färbungen von Wildtyp-Myzel, angezogen auf Medium mit Isorhamnetin oder DMSO, zeigen keine Unterschiede in der freigesetzten Superoxid- bzw. Wasserstoffperoxid-Menge (Abbildung 52A).

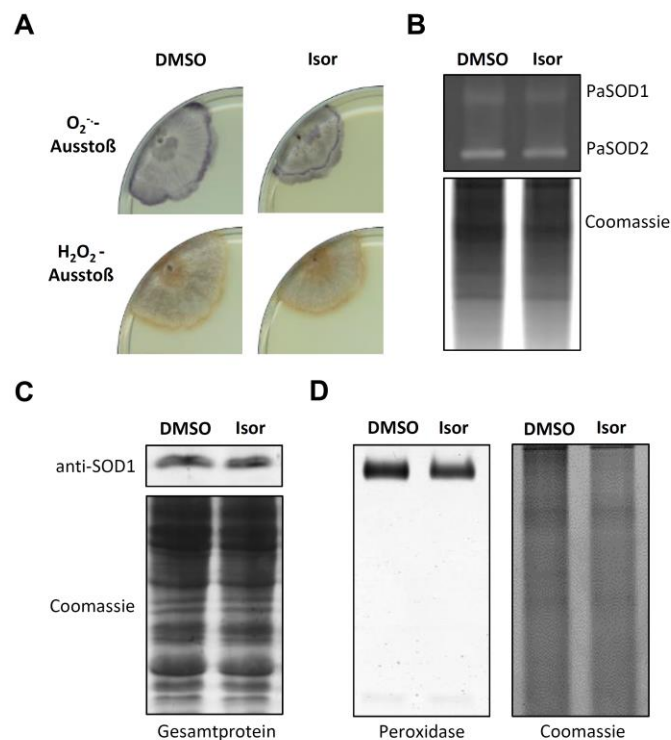


Abbildung 52: ROS-Stoffwechsel bleibt unverändert durch die Isorhamnetin-Behandlung. (A) Qualitative Bestimmung des Superoxid-Ausstoßes ($O_2^{\cdot-}$; NBT-Färbung) und Wasserstoffperoxid-Ausstoßes (H_2O_2 ; DAB-Färbung) von 7 d alten Wildtyp-Stämmen nach Anzucht auf M2-Medium mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Isorhamnetin (je $n = 4$). Die Intensität der Myzelfärbung entspricht der Menge des ausgestoßenen $O_2^{\cdot-}$ bzw. H_2O_2 . (B) Repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-SOD-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität, (C) repräsentativer Ausschnitt einer Western-Blot-Analyse zum Nachweis der SOD-Mengen und (D) ein repräsentativer Ausschnitt einer „In-Gel“-Peroxidase-Aktivitätsfärbung mit Gesamtproteinextrakten aus Wildtyp-Stämmen nach Inkubation mit 0,15 % DMSO oder 300 μ M Isorhamnetin (je $n = 4$). Als Ladekontrolle dienen die jeweiligen Coomassie-gefärbten Gele. Abbildung modifiziert nach Warnsmann *et al.* (eingereicht).

Als nächstes wurde die PaSOD1-Aktivität untersucht und übereinstimmend mit der unveränderten Superoxid-Menge ergaben „In-Gel“-Aktivitätsfärbungen keine Veränderungen der PaSOD1-Aktivität in Isorhamnetin im Vergleich zu DMSO behandelten Wildtyp-Stämmen (Abbildung 52B). Entsprechend ergab eine Western-Blot-Analyse eine gleichbleibende PaSOD1-Menge der

Isorhamnetin- und DMSO-behandelten Stämme (Abbildung 52C). Darüber hinaus wurde die Aktivität der Peroxidase mit „In-Gel“-Färbungen analysiert und keine Veränderungen durch Isorhamnetin gefunden (Abbildung 52D). Diese Ergebnisse unterstützen das Resultat der Analysen mit den *PaMth1*-Mutanten, dass methyliertes Quercetin die Lebensspanne beeinflusst aber nicht die OCR oder den ROS-Stoffwechsel. Die beiden letzteren werden durch unmethyliertes Quercetin beeinflusst.

Zusammenfassend zeigen die Analysen, dass Quercetin in einer methylierten Form wirkt und daher die Quercetin-vermittelte Lebensverlängerung in *P. anserina* abhängig von der *O*-Methyltransferase PaMTH1 ist. Die für die Lebensverlängerung unbedeutenden Nebeneffekte auf die Atmung und den ROS-Stoffwechsel sind auf unmethyliertes Quercetin zurückzuführen und deuten auf eine pro-oxidative Wirkung von unmethyliertem Quercetin hin.

5 DISKUSSION

Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle im Stoffwechsel ein und stellen daher zentrale Weichensteller zwischen Leben und Tod von Zellen bzw. ganzen Organismen dar. Beeinträchtigungen ihrer Funktionen beeinflussen nicht nur die Alterung eines Organismus, sondern auch die Entstehung einer Vielzahl meist altersbedingter Krankheiten, wie Krebs und neurodegenerative Erkrankungen (genaueres siehe Kapitel 1.3 und 1.4). So sind die Mitochondrien und ihre Funktionen Ansatzpunkt für „anti-Aging“-Behandlungen und zur Bekämpfung von Krankheiten wie Krebs, Morbus Alzheimer oder auch Morbus Parkinson (Bhat *et al.*, 2015; Gaude und Frezza, 2014; López-Otín *et al.*, 2013; Reddy und Reddy, 2011; Smith *et al.*, 2012; Suliman und Piantadosi, 2016; Weinberg und Chandel, 2015). Hierbei kommen vermehrt Naturstoffe, zumeist Polyphenole, aufgrund ihres großen pharmakologischen Wirkungsspektrums zum Einsatz.

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit den Effekten der Polyphenole Gossypol, Curcumin und Quercetin auf die Mitochondrienfunktion, den Alterungsprozess und die damit verbundenen weiteren Auswirkungen auf den Modellorganismus *P. anserina*. Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, die grundlegenden Wirkmechanismen und die Verbindung zu der Mitochondrienfunktion weiter aufzuklären (I). Darüber hinaus sollten die Ergebnisse Aufschluss über das Vorhandensein eines allgemeingültigen Wirkmechanismus von Polyphenolen geben (II). Und zu guter Letzt sollten die Analysen Ansatzpunkte für neue Therapien oder zur Verbesserung von bereits bestehende Therapien liefern (III).

5.1 *P. anserina* als ein Modellsystem zur Untersuchung der Wirkmechanismen von Polyphenolen

Polyphenole können sowohl fördernd („pro-survival“) als auch hemmend („pro-death“) auf das Überleben von Organismen und Zellen, wie z. B. Krebszellen, wirken. Für die untersuchten Polyphenole Gossypol, Curcumin und Quercetin sind aus der Literatur Einflüsse auf das Überleben verschiedener Organismen oder Zell-Kulturen bekannt. Für den Modellorganismus *P. anserina* waren vor dieser Doktorarbeit keine Effekte bekannt. Auffallend während der Sichtung der Literatur war, dass die Wirkung eines Polyphenols nicht bei allen Organismen identisch ist. Ein Polyphenol kann das Überleben des einen Organismus beeinflussen und das Überleben eines anderen Organismus unbeeinflusst lassen. Um aus den Ergebnissen mit *P. anserina* auf allgemeingültige Wirkprinzipien schließen zu können und diese auf den Menschen übertragen zu können, musste als Voraussetzung das Polyphenol den selben Effekt auf die Lebensspanne von *P. anserina* aufweisen, wie auf die Lebensspanne bzw. das Überleben in anderer Organismen. Durch die Analysen der

Effekte auf die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps wurde die Eignung als ein Modellsystem zur Klärung der Wirkmechanismen von Polyphenolen überprüft.

Übereinstimmend zu Befunden aus Krebszellen mit intakter Apoptose-Maschinerie vermittelt Gossypol in *P. anserina* eine Verkürzung der Lebensspanne durch eine Metacaspase-abhängige Induktion von apoptotischem Zelltod (Warnsmann *et al.*, 2018). Dies ähnelt Befunden mit chronischen lymphatischen Leukämie-Zellen, in denen durch Gossypol eine Caspase-abhängige Apoptose vermittelt wird (Balakrishnan *et al.*, 2008). Außerdem wurde eine krebshemmende Wirkung auf Tumore im Urogenitaltrakt gefunden. Gossypol induziert sowohl in Blasen- als auch Prostata-Krebszellen Apoptose und hemmt das Wachstum (Mani *et al.*, 2015; Meng *et al.*, 2008). Aber nicht nur Zelllinien, sondern auch ganze Organismen sind von der wachstumshemmenden Wirkung von Gossypol betroffen. So nimmt die Reproduktions- und Überlebensrate der Gurkenblattlaus (*Aphis gossypii*) mit steigender Gossypol-Konzentration in der aufgenommenen Nahrung ab (Du *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2008).

Entgegen der lebensverkürzenden Wirkung von Gossypol auf *P. anserina*, wirkt Curcumin fördernd auf das Überleben. Die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps wird durch die Anzucht auf Curcumin-haltigem Medium deutlich verlängert (Warnsmann und Osiewacz, 2016). Diese Verlängerung entspricht früheren Befunden aus *D. melanogaster* und *C. elegans* (Shen *et al.*, 2013b). Liao und Kollegen beobachteten eine ca. 40%ige Verlängerung der mittleren Lebensspanne von *C. elegans* (Liao *et al.*, 2011). Ebenfalls wurde in mehreren unabhängigen Studien eine Lebensverlängerung von *D. melanogaster* durch eine Curcumin-Behandlung ermittelt (Lee *et al.*, 2010; Shen *et al.*, 2013a; Soh *et al.*, 2013; Suckow und Suckow, 2006).

Wie schon in einer vorangegangenen Bachelorarbeit gezeigt (Hainbuch, 2016) und in der vorliegenden Doktorarbeit verifiziert, vermittelt Quercetin in *P. anserina* eine Lebensverlängerung. Dies passt zu veröffentlichten Daten aus anderer Organismen. Sowohl in *S. cerevisiae* als auch *C. elegans* wurde eine Erhöhung der Überlebensrate durch Quercetin beschrieben (Belinha *et al.*, 2007; Kampkötter *et al.*, 2008; Pietsch *et al.*, 2009; Saul *et al.*, 2008). Ebenfalls wurde eine erhöhte Überlebensrate humaner Zell-Kulturen nach Quercetin-Exposition beobachtet (Niklas *et al.*, 2012).

Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass die untersuchten Polyphenole in *P. anserina* ähnliche Effekte auf das Überleben des Organismus hervorrufen, wie bereits aus komplexeren Modellsystemen bekannt ist. Damit bietet *P. anserina* ein geeignetes Modellsystem zur Analyse der zugrundeliegenden Wirkmechanismen von Polyphenolen. Darüber hinaus können alle im Weiteren gewonnenen Erkenntnisse dazu verwendet werden, Hinweise auf mögliche Wirkungen im Menschen und für eine Verbesserung oder Neuentwicklung von „anti-Aging“ Behandlungen oder Behandlungen von Krankheiten zu erhalten.

5.2 Veränderungen der Mitochondrienfunktion zur Kompensation von zellulären Dysfunktionen und Stressbedingungen

Die zentrale Rolle der Mitochondrien in der Regulation des Alterungsprozesses ist schon seit gut 50 Jahren bekannt, insbesondere durch Analysen an *P. anserina* (Belcour, 1981; Belcour und Begel, 1977; Cummings *et al.*, 1979; Esser und Tudzynski, 1980; Marcour, 1961; Osiewacz, 2002). Zahlreiche Untersuchungen an *P. anserina* und anderen Organismen zeigen, dass Veränderungen der Lebensspanne oft mit Veränderungen der Mitochondrienfunktion zusammenhängen. Beispielsweise wurde in *P. anserina* gezeigt, dass eine Veränderung der Mitochondrien-Morphologie bzw. der Ultrastruktur die Lebensspanne beeinflusst (Rampello *et al.*, 2018; Scheckhuber *et al.*, 2007). Außerdem wurde in *S. cerevisiae* beobachtet, dass die mitochondriale Atmung in Verbindung mit der Regulation der Lebensspanne steht. So ist eine erhöhte Lebensspanne mit einer erhöhten mitochondrialen Atmung verbunden (Barros *et al.*, 2004; Bonawitz *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2000). Zudem zeigen Untersuchungen an *S. cerevisiae* und auch *C. elegans*, dass eine verringerte Lebensspanne mit einer verringerten Atmung einhergeht (Bonawitz *et al.*, 2006b; Zarse *et al.*, 2007).

Analysen der Mitochondrienfunktion nach genetischer Modulation ($\Delta PaSod3$) oder der Modulation durch Polyphenole im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit lieferten teilweise unerwartete Ergebnisse. Die auftretenden Veränderungen der Mitochondrien und deren Funktion sind darüber hinaus teilweise widersprüchlich zu der beschriebenen Verbindung von Mitochondrienfunktion und Lebensspanne. So wurde u. a. eine verbesserte Mitochondrienfunktion unabhängig von der Veränderung der Lebensspanne ($\Delta PaSod3$, Quercetin-Behandlung) oder sogar in Stämmen mit einer verringerten Lebensspanne (Gossypol-Behandlung) beobachtet. Genauere Betrachtungen dieser Veränderungen und der Zusammenhänge ergaben eine mögliche zelluläre Antwort auf Dysfunktionen, hervorgerufen durch die verschiedenen Modulationen, durch eine Anpassung der Mitochondrienfunktion. Es scheint, als würden Stressbedingungen, wie z. B. oxidativer Stress, durch eine Veränderung der Mitochondrienfunktion ausgeglichen werden. Dies spricht dafür, dass die Veränderung/Anpassung der Mitochondrienfunktion eine Art Kompensations-Mechanismus oder zumindest Teil eines Kompensations-Mechanismus ist.

Für einen derartigen Kompensations-Mechanismus sprechen auch Ergebnisse und Hinweise früherer Doktorarbeiten in der Arbeitsgruppe. So zeigte Matthias Wiemer in seiner Doktorarbeit, dass exogener Stress durch Paraquat zu einer Verschiebung der normalen Cytochrom-C-Oxidase (COX)-abhängigen Atmung hin zu einer alternativen Oxidase (AOX)-abhängigen Atmung führt (Wiemer, 2015; Wiemer und Osiewacz, 2014).

Paraquat ist eine quartäre Ammoniumverbindung, welche verwendet wird, um intrazellulär oxidativen Stress, in Form von Superoxid, zu generieren (Cocheme und Murphy, 2008). Bekannt wurde Paraquat als Herbizid unter dem Handelsnamen Gramoxone. Es kann gezielt zum Abtöten von Pflanzen verwendet werden, da es in geringen Konzentrationen nach dem Auftragen auf die Blätter wirkt (Sagar, 1987). In einer irreversiblen Reaktion nimmt Paraquat im Photosystem I Elektronen von Ferredoxin und gibt sie unter Bildung von Superoxid an Sauerstoff ab, darüber hinaus wird aufgrund der fehlenden Elektronen die NADPH-Bildung gehemmt (Dodge, 1971). Jedoch wirkt es nicht nur auf Pflanzen, sondern auch auf Menschen und Tiere. In nicht phototrophen Organismen wirkt Paraquat in den Mitochondrien. Es nimmt Elektronen vom Komplex I und gibt diese unter Bildung von Superoxid an Sauerstoff ab (Cocheme und Murphy, 2008).

Diese AOX-abhängige Atmung umgeht den Komplex III und IV der Atmungskette. Infolgedessen kommt es zu einer verringerten ROS-Bildung (Dufour *et al.*, 2000; Gredilla *et al.*, 2006). Hierdurch versucht die Zelle, den weiteren Anstieg der ROS-Menge zu verringern, um so dem exogenen Stress entgegen zu wirken.

Weiterhin ergaben Analysen des Verlustes der PaSOD3, einer zentralen Komponente des molekularen Netzwerks zum Ausbalancieren der ROS-Menge, dass die unerwartet gesunde Lebensspanne dieser Deletionsmutante (Knuppertz *et al.*, 2017; Zintel *et al.*, 2010) durch eine mögliche Anpassung der Mitochondrienfunktion ausgeglichen wird bzw. diese Anpassung zum Ausgleich beiträgt. Im Rahmen ihrer Doktorarbeiten konnten Carolin Grimm und Laura Knuppertz zeigen, dass die unerwartete Lebensspanne der *PaSod3*-Deletionsmutante auf einer Kompensation durch gleichzeitige Induktion der Mitophagie und Mitochondrien-Biogenese beruht (Grimm, 2015; Knuppertz, 2017; Knuppertz *et al.*, 2017). Die Induktion der Biogenese wird durch Transkriptom-Analyse der *PaSod3*-Deletionsmutante bekräftigt. Im Vergleich zum *P. anserina*-Wildtyp sind mitochondriale Gene, insbesondere solche der Atmungskette und des mitochondrialen Metabolismus, hochreguliert (Grimm, 2015; Knuppertz *et al.*, 2017). Ähnliches wurde auch schon in Mäusen gezeigt, wo eine Deletion des Gens für die mitochondriale SOD in Nieren zu einem Anstieg der Autophagosomen-Bildung und Mitochondrien-Biogenese führt (Parajuli und MacMillan-Crow, 2013).

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde bestätigt, dass die Kompensation des Verlustes der PaSOD3 in Verbindung mit einer veränderten Mitochondrienfunktion steht, und zwar mit einer Abnahme der CI-abhängigen Atmung und einer Zunahme der CII-abhängigen Atmung (Abbildung 53). Die Abnahme der CI-abhängigen Atmung ist wahrscheinlich bedingt durch einen Aktivitätsverlust aufgrund von Schädigungen der Eisen-Schwefel-Cluster durch die erhöhte Superoxid-Menge. Eine solche Schädigung der Eisen-Schwefel-Cluster wurde in Untersuchungen mit Mäusen und menschlichen Lungenkarzinom-Zellen gezeigt. In den Untersuchungen wurde gezeigt, dass Superoxid bevorzugt mit dem Eisen der Eisen-Schwefel-Clustern des Komplex I reagiert und so die Aktivität beeinträchtigt (Powell und Jackson, 2003; Williams *et al.*, 1998). Eine verringerte CI-abhängige Atmung, beruhend auf einem Verlust der CI-Aktivität, wurde bereits in

einer Deletionsmutante in *C. elegans* gezeigt, der die mitochondriale SOD (SOD2) fehlt (Suthammarak *et al.*, 2013). Anders als in *C. elegans*, wo die CII-abhängige Atmung unverändert ist und die Atmung insgesamt verringert (Suthammarak *et al.*, 2013), gleicht in *P. anserina* eine erhöhte CII-abhängige Atmung den Aktivitätsverlust von CI aus. Messungen des mtMP bestätigen eine Verringerung des mtMP in der Deletionsmutante, wie aufgrund der verringerten CI-Aktivität vermutet wurde. Dieses verringerte Membranpotential kann neben der erhöhten Superoxid-Menge als Signal zur Induktion der Mitophagie führen (Graef und Nunnari, 2011; Nowikovsky *et al.*, 2007; Priault *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2009). Auf diesem Wege trägt die veränderte mitochondriale Atmung zur Kompensation des Verlustes der mitochondrialen SOD bei.

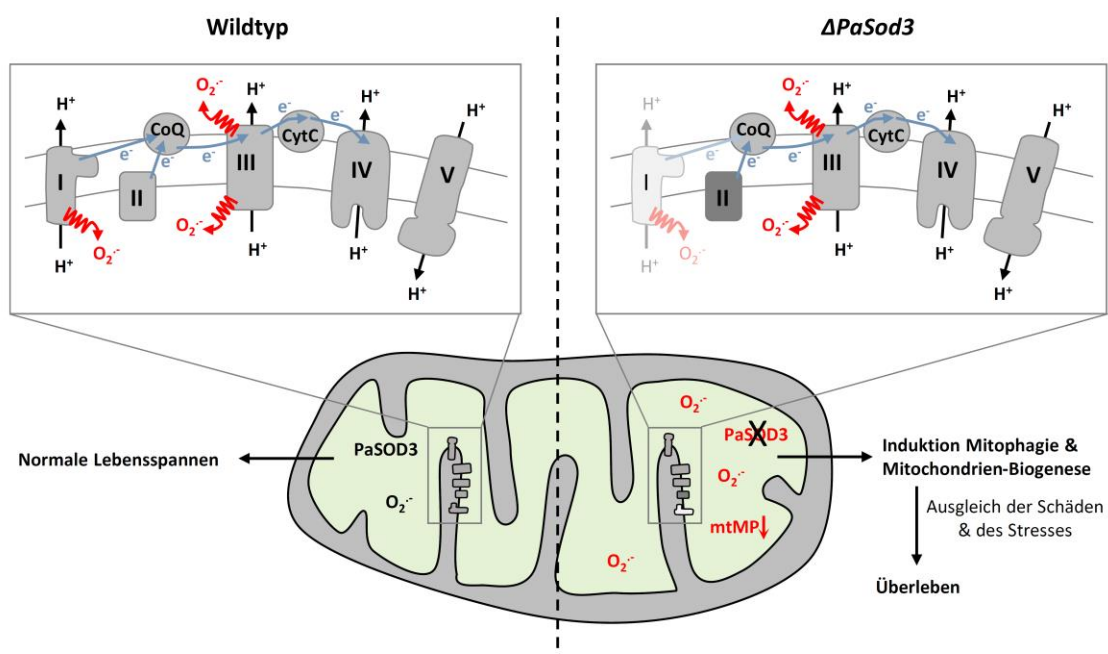


Abbildung 53: Veränderungen der mitochondrialen Atmung und die resultierenden Effekte in der *PaSod3*-Deletionsmutante. Im Wildtyp läuft die Atmung standardmäßig ab, wobei an Komplex I Protonen gepumpt und Superoxid gebildet wird. In der *PaSod3*-Deletionsmutante ist aufgrund der hohen Superoxid-Menge die Aktivität von Komplex I (hellgrau) herabgesetzt, wodurch weniger Protonen gepumpt und weniger Superoxid gebildet wird. Die verringerte Komplex I-abhängige Atmung wird durch eine erhöhte Komplex II-abhängige Atmung (dunkelgrau) kompensiert. Dadurch bleibt die Grundatmung unverändert, jedoch sinkt das mitochondriale Membranpotential (mtMP). Zusammen mit der erhöhten Superoxid-Menge führt dies zu einer Induktion der Mitophagie und Mitochondrien-Biogenese, wodurch Schäden und Stress ausgeglichen werden und das Überleben des Stammes gesichert wird.

An diese Beobachtungen und Vermutung, wonach Veränderungen der Mitochondrienfunktion als Kompensation-Mechanismus bzw. als Teil eines Kompensations-Mechanismus fungieren, knüpfen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Wirkung der untersuchten Polyphenole an. Zusätzlich demonstrieren die Ergebnisse der Analysen mit den Polyphenolen, dass nicht nur Veränderungen der Funktion, sondern auch des Aufbaus der mitochondrialen Atmungskette eine Art

Kompensations-Mechanismus darstellen. Jedoch sind diese Versuche des Ausgleiches von Fehlfunktionen bzw. Stressbedingungen, ausgelöst durch die untersuchten Polyphenole, offenbar nicht ausreichend um den Wildtyp-Phänotyp vollständig wiederherzustellen.

In Untersuchungen mit *P. anserina* Wildtyp-Stämmen behandelt mit Gossypol oder Quercetin wurde eine vermehrte Bildung von mitochondrialen Atmungskettensuperkomplexen (mtRSCs) gefunden. Die Anordnung der Atmungskettenkomplexe in Superkomplexen führt zu einer Verbesserung des Elektronenflusses innerhalb der Elektronentransportkette, dies resultiert in einer Erhöhung der mitochondrialen Atmung (Bianchi *et al.*, 2003; Bianchi *et al.*, 2004; Genova und Lenaz, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000). Weiterhin führt der verbesserte Elektronenfluss zu einer Verringerung der Fehlübertragung von Elektronen, wodurch die ROS-Bildung vermindert wird (Maranzana *et al.*, 2013; Schägger und Pfeiffer, 2000). Dies führt zu der Annahme, dass eine Zunahme der Menge an mtRSCs positiv ist und fördernd auf das Überleben wirkt. Die induzierte Bildung von mtRSCs bei der Induktion von Zelltod z. B. durch Gossypol erscheint daher auf den ersten Blick widersinnig, da kein positiver Effekt auf das Überleben zu ermitteln ist. Allerdings wirkt Gossypol wie ein Entkoppler (Abou-Donia und Dieckert, 1976; Reyes und Benos, 1988; Warnsmann *et al.*, 2018) und verursacht sowohl in Glioblastom-Zellen als auch *P. anserina* eine mitochondriale Dysfunktion (Voss *et al.*, 2010; Warnsmann *et al.*, 2018). Vermutlich wird die Bildung der Superkomplexe induziert, um den negativen bzw. schädlichen Einfluss von Gossypol durch einen verbesserten Elektronenfluss zu minimieren. Dennoch reicht dies offenbar nicht aus, um die mitochondriale Dysfunktion zu kompensieren, was in einer deutlichen Reduktion der mitochondrialen Atmung von Gossypol-behandelten *P. anserina* Wildtyp-Stämmen und der reduzierten Lebensspanne sichtbar wird.

Im Gegensatz zur Behandlung mit Gossypol führt in den Quercetin-behandelten Wildtyp-Stämmen die erhöhte Menge von mtRSCs erwartungsgemäß zu einer Erhöhung der mitochondrialen Atmung. Dennoch ergaben die genaueren Analysen, dass die Quercetin-vermittelte Lebensverlängerung unabhängig von der veränderten Atmung ist (genauere Erläuterung folgt zu einem späteren Zeitpunkt). Vielmehr scheint der verbesserte Elektronenfluss durch die mtRSCs eine Art Kompensation des pro-oxidativen Effektes von Quercetin, der Bildung von Superoxid und der Schädigung von ROS-abbauenden Enzymen, zu sein. Durch diese Wirkung wird eine weitere Bildung von Superoxid durch die Atmungskette minimiert.

Der beobachtete Ausgleich von Dysfunktionen bzw. Stressbedingungen in der Zelle durch eine Anpassung der Mitochondrienfunktion spielt auch bei dem Schweregrad von Krankheiten und deren Behandlungsmöglichkeiten eine Rolle. Ein Beispiel ist eine Neuropathie des Sehnervs, die Autosomal-dominante Optikusatrophie (ADOA), deren Ursache ist in über 60 % der Fälle eine

Mutation im OPA1-Gen, welches für einen wichtigen Teil der Mitochondrien-Fusions-Maschinerie kodiert (Kjer, 1959). Bei dieser Erkrankung kommt es zur Degeneration der Ganglienzellen der Netzhaut (Carelli *et al.*, 2004; Yu-Wai-Man *et al.*, 2010). Diese Degeneration führt zu einem bereits im Kindesalter beginnenden Sehverlust, welcher unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (Votruba *et al.*, 2003). Studien ergaben, dass ein ausgeprägter Sehverlust mit einer OXPHOS-Dysfunktion und einer Abnahme der ATP-Synthese verbunden ist (Lodi *et al.*, 2004; Van Bergen *et al.*, 2011; Zanna *et al.*, 2008). Untersuchungen von Patienten mit keinem oder nur einem geringen Sehverlust zeigten überraschend eine erhöhte ATP-Synthese und eine erhöhte mitochondriale Atmung. Diese beruht auf einer Zunahme der Menge und Aktivität der mitochondrialen Atmungskomplexe (Van Bergen *et al.*, 2011). Daraus schließen Van Bergen und Kollegen, dass der Sehverlust durch eine erhöhte mitochondriale Atmung verhindert wird.

Insgesamt zeigen die Daten der Analysen der Mitochondrienfunktionen nach den verschiedenen Modulationen, dass die Zelle in der Lage ist, Stressbedingungen durch Veränderungen der Mitochondrienfunktion zu kompensieren bzw. den Stresssituationen bis zu einem gewissen Punkt entgegen zu wirken. Desweiteren zeigen diese Befunde Möglichkeiten auf, wie die Mitochondrienfunktion gezielt beeinflusst werden kann, um positive Effekte für den Organismus hervorzurufen. Beispielsweise wird die Wiederherstellung von einer möglichst normalen Mitochondrienfunktion als Ansatzpunkt für die Krebstherapie verwendet (Bhat *et al.*, 2015). Mit Hilfe der hier gezeigten Daten bieten sich Möglichkeiten derartige Therapieansätze zu erweitern und zu verbessern.

5.3 Die Wirkung von Polyphenolen beruht nicht auf einem gemeinsamen grundlegenden Wirkprinzip

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es keinen allgemeingültigen Wirkmechanismus von Polyphenolen gibt. Aufgrund der großen Vielfalt der Polyphenole ist dies auch nicht überraschend. Auffallend war dennoch, dass ein Teil der beobachteten Effekte auf den Alterungsprozess von *P. anserina* mit einer Veränderung des ROS-Stoffwechsels einhergeht, genauer gesagt, führt die Behandlung mit Polyphenolen in zwei Fällen zu einem Anstieg des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes. Entgegen den Befunden mit Gossypol und Curcumin, zeigten die Analysen der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung keinen Zusammenhang bzw. keine Abhängigkeit vom ROS-Stoffwechsel. Daraus lässt sich schließen, dass es mindestens zwei Wirkmechanismen von Polyphenolen geben muss, welche im Folgenden genauer diskutiert werden.

Für eine bessere Übersicht, Vergleichbarkeit und Nachvollziehbarkeit der weiteren Diskussion sind die, im Rahmen der vorliegenden Dissertation, erhaltenen Ergebnisse in Tabelle 16 noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 16: Zusammenfassung der phänotypischen und zellulären Veränderungen durch die Behandlung des *P. anserina*-Wildtyps mit Gossypol, Curcumin oder Quercetin.

| | Gossypol | Curcumin | Quercetin |
|-------------------------------|--|---|--|
| Lebensspanne | verkürzt; Metacaspase-abhängig | verlängert; Autophagie- / H ₂ O ₂ -abhängig | verlängert; Methyltransferase-abhängig |
| ROS-Stoffwechsel | H ₂ O ₂ -Ausstoß stark erhöht; PaSOD1-Aktivität erhöht | H ₂ O ₂ -Ausstoß erhöht; PaSOD1-Aktivität erhöht | H ₂ O ₂ -Ausstoß verringert; PaSOD1-Aktivität verringert; Superoxid-Ausstoß erhöht |
| Mitochondrien-Funktion | mitochondriale Dysfunktion; reduzierte OCR; reduziertes mtMP; mtRSCs erhöht | erhöhte OCR; erhöhtes mtMP; mtRSCs erhöht | erhöhte OCR abhängig von der PaMTH1-Menge mtRSCs erhöht |
| Autophagie | erhöht; abhängig von PaCYPD | erhöht | verringert (Hainbuch, 2016) |
| Mitophagie | erhöht; unabhängig von PaATG1 | keine Abnahme mitochondrialer Proteine | verringert (Hainbuch, 2016) |
| PaCYPD / mPTP | notwendig für Lebensverkürzung | kein Einfluss (Daten nicht gezeigt) | (nicht untersucht) |

5.3.1 Hormetische Wirkung von Wasserstoffperoxid auf die Regulation der Alterung von *P. anserina*

Schon seit den 1950er Jahren, ausgehend von den Theorien von Denham Harman, werden ROS als schädlich und als ursächlich für molekulare Schäden, die zum Altern führen, angesehen (Harman, 1956, 1972). Bis heute gibt es zahlreiche Studien, die diese Theorie untermauern und eine erhöhte ROS-Menge, z. B. durch Mutationen der ROS-engiftenden Enzyme, in Verbindung mit einer verkürzten Lebensspanne bringen (Dai *et al.*, 2009; Melov *et al.*, 2000; Orr und Sohal, 1994; Phillips *et al.*, 1989; Unlu und Koc, 2007). Jedoch sind mittlerweile fast genau so viele Befunde bekannt, die gegen diese Theorie sprechen und darlegen, dass eine erhöhte ROS-Menge zu einer Lebensverlängerung führen kann (Barja, 1993; Lapointe und Hekimi, 2010; Perez *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2007). In diesen Studien wird insbesondere Wasserstoffperoxid als ein Signalmolekül zur Induktion einer Lebensverlängerung beschrieben. Untersuchungen an *S. cerevisiae* und *C. elegans* zeigen einen Dosis-abhängigen positiven Effekt von schädlichem Wasserstoffperoxid auf das

Wachstum. Mit ansteigender Konzentration kommt es, bis zum Erreichen eines Schwellenwertes, zu einer Verlängerung der Lebensspanne. Ab diesem Schwellenwert sind die Konzentrationen zu hoch und verursachen einen hohen oxidativen Stress, der zu einer deutlichen Reduktion der Lebensspanne führt (Mesquita *et al.*, 2010; Semchyshyn und Valishkevych, 2016; Xie und Roy, 2012). Der positive Effekt geringer Dosen (milder Stress) eines in hohen Dosen schädlichen Stoffes wird als Hormesis bezeichnet (zusammen gefasst in Calabrese *et al.* (2015)).

Hormesis (griech. Anregung, Anstoß) beschreibt die Hypothese, dass geringe Dosen einer schädlichen Substanz (milder Stress) positive Wirkungen auf einen Organismus haben können, welche zu einer Lebensverlängerung führen (Calabrese und Baldwin, 1998; Calabrese *et al.*, 2015; Stebbing, 1982). Diese Hypothese wurde bereits im 16. Jahrhundert von Paracelsus (Theophrastus Bombast von Hohenheim) mit den Worten „All Ding' sind Gift und nichts ohn' Gift“ („Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist“) beschrieben (Grandjean, 2016). Der Begriff Hormesis wurde das erste Mal 1943 in einem wissenschaftlichen Artikel verwendet und damit geprägt (Southam und Ehrlich, 1943).

Übereinstimmend zur genannten hormetischen Wirkung von Wasserstoffperoxid, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation positive und negative Einflüsse der Polyphenole auf die Lebensspanne von *P. anserina* in Verbindung mit einer erhöhten Wasserstoffperoxid-Freisetzung.

Durch die Behandlung mit Gossypol wird die Lebensspanne des *P. anserina*-Wildtyps in Abhängigkeit der mPTP und Metacaspasen reduziert. Damit einhergehend wird der Ausstoß von Wasserstoffperoxid aus dem Myzel des Wildtyps stark erhöht (Warnsmann *et al.*, 2018). Dem gegenüber steht die Autophagie-abhängige Lebensverlängerung des *P. anserina* Wildtyps durch die Behandlung mit Curcumin. Diese Verlängerung geht mit einer leichten Erhöhung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes einher (Warnsmann und Osiewacz, 2016). Im Vergleich ist die Menge des freigesetzten Wasserstoffperoxids der Gossypol-behandelten Stämme 2,4-fach höher als bei den Curcumin-behandelten Stämmen. Dies entspricht einem Wasserstoffperoxid-Ausstoß von 380 μM aus den auf Gossypol-haltigem Medium angezogenen Wildtyp-Stämmen im Vergleich zu 160 μM aus den auf Curcumin-haltigem Medium angezogenen. Aufgrund des Unterschiedes in der freigesetzten Wasserstoffperoxid-Menge kann davon ausgegangen werden, dass auch in den Zellen der Gossypol-behandelten Stämmen eine deutlich höhere Wasserstoffperoxid-Konzentration vorherrscht. Der hohe Wasserstoffperoxid-Ausstoß durch Gossypol beruht auf der induzierten mitochondrialen Dysfunktion und der im Vergleich zu Curcumin deutlich stärker erhöhten Aktivität der PaSOD1.

Ausgehend von den Effekten auf die Lebensspanne und der beschriebenen unterschiedlichen Erhöhung der freigesetzten Wasserstoffperoxid-Menge, verursacht die Behandlung mit 50 μM Curcumin einen milden oxidativen Stress in der Zelle, wohingegen die Gossypol-Behandlung (20 μM) einen hohen Stress induziert. So wird die Lebensspanne abhängig von der Höhe des oxidativen

Stress-Niveaus durch die untersuchten Konzentrationen der Polyphenole unterschiedlich beeinflusst (Abbildung 54).

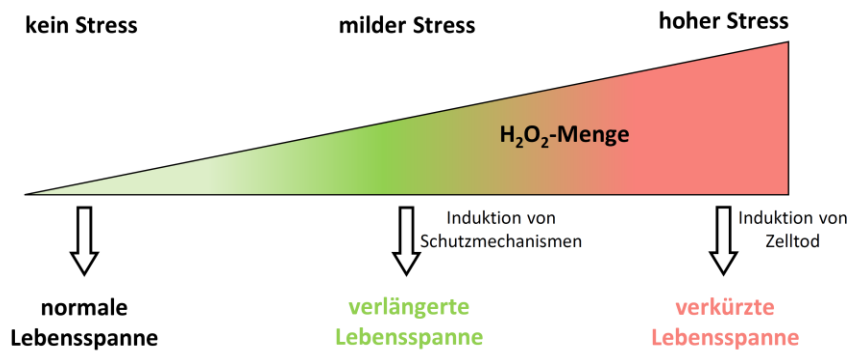


Abbildung 54: Hormetische Wirkung von Wasserstoffperoxid und die Auswirkungen auf die Lebensspanne. Eine Erhöhung der Wasserstoffperoxid (H₂O₂)-Menge bedingt durch Veränderungen des zellulären Metabolismus oder durch exogene Zugabe führen zu einem Anstieg des Stress-Niveaus der Zelle. Dabei aktiviert ein milder Stress verschiedene zelluläre Schutzmechanismen. Diese beheben entstandene Schäden und lösen positive Effekte in der Zelle aus. Durch hohen Stress werden Signalkaskaden aktiviert, die im programmierten Zelltod enden. So wird die Lebensspanne unterschiedlich beeinflusst.

Milder Stress aktiviert in der Zelle Signalkaskaden, die positive Effekte, wie die Aktivierung von Schutzmechanismen, in der Zelle hervorrufen und eine Langlebigkeit vermitteln. Dem gegenüber führt hoher Stress zu einer Aktivierung von Signalkaskaden, welche programmierten Zelltod induzieren und die Lebensspanne verkürzen. Ähnliche Reaktionen werden auch durch verschiedene Mengen Wasserstoffperoxid in menschlichen Zell-Kulturen hervorgerufen. Untersuchungen an verschiedenen Karzinom- und Fibroblasten-Zellen ergaben, dass geringe Mengen an Wasserstoffperoxid durch Induktion von Antioxidantien einen Zellschutz vermitteln. Im Gegensatz zeigen die Untersuchungen auch, dass eine große Menge an Wasserstoffperoxid apoptotischen Zelltod stimuliert (Sablina *et al.*, 2005).

Wasserstoffperoxid fördert das Überleben durch Induktion von Autophagie

Ein Schutzmechanismus, der durch Wasserstoffperoxid induziert wird, ist die Autophagie (Lee *et al.*, 2012; Scherz-Shouval und Elazar, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007). Der Prozess der Autophagie spielt nicht nur in der Entwicklung eines Organismus eine wichtige Rolle (Houry *et al.*, 1995; Levine und Klionsky, 2004; Pollack *et al.*, 2009), sondern auch für sein Überleben. Beeinträchtigungen der Autophagie-Maschinerie werden schon lange mit dem generellen Alterungsprozess (zusammengefasst in: Knuppertz *et al.* (2014); Rubinsztein *et al.* (2011)) und der Entstehung von humanen Krankheiten (zusammengefasst in: Wirawan *et al.* (2012)) in Verbindung gebracht. Bis

heute werden vor allem neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson aber auch Herz-Kreislauf- und Krebs-Erkrankungen mit einer veränderten Autophagie-Rate assoziiert (Cuervo, 2004; Cuervo und Macian, 2014; Karantza-Wadsworth und White, 2007; Levine und Kroemer, 2008, 2009; Mizushima *et al.*, 2008; Wirawan *et al.*, 2012). Verschiedene Studien an Geweben und Organen von Ratten zeigen, dass die Autophagie-Rate mit zunehmendem Alter abnimmt (Cuervo und Dice, 2000; Donati *et al.*, 2001; Makrides, 1983). Zudem wurde gezeigt, dass die Induktion von Autophagie zur Langlebigkeit von Organismen, wie z. B. *P. anserina*, *C. elegans*, *D. melanogaster* und *S. cerevisiae*, beiträgt, wohingegen eine Reduktion der Autophagie eine Verkürzung der Lebensspanne zur Folge hat (Hansen *et al.*, 2008; Hars *et al.*, 2007; Knuppertz *et al.*, 2014; Matecic *et al.*, 2010; Melendez *et al.*, 2003; Pyo *et al.*, 2013; Simonsen *et al.*, 2008; Toth *et al.*, 2008).

Übereinstimmend mit der Lebensspannen-regulierenden Funktion von Autophagie zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zum ersten Mal, dass die Curcumin-induzierte Langlebigkeit von einer intakten Autophagie-Maschinerie abhängt. Eine Behandlung von *P. anserina* mit Curcumin führt zu einer Induktion der nicht-selektiven Autophagie. In einer *P. anserina*-Mutante mit defekter Autophagie-Maschinerie wurde keine Lebensverlängerung beobachtet (Warnsmann und Osiewacz, 2016). Genauere Analysen der Ursachen der Curcumin-vermittelten Lebensverlängerung mit Hilfe von weiteren Deletionsmutanten zeigen eine Abhängigkeit der Curcumin-vermittelten Langlebigkeit von der PaSOD1-Aktivität, welche im *P. anserina*-Wildtyp durch Curcumin erhöht wird. Der Zusammenhang von Curcumin-induzierter Langlebigkeit und erhöhter SOD-Aktivität wurde bereits in Untersuchungen mit *D. melanogaster* gefunden (Shen *et al.*, 2013a). Jedoch wurde in diesen Analysen kein direkter experimenteller Nachweis der Abhängigkeit der Lebensverlängerung von der SOD1-Aktivität durchgeführt. In einer weiteren Studie an *D. melanogaster* wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Curcumin und Disulfiram, einem Inhibitor der SOD1, den lebensverlängernden Effekt von Curcumin verhindert, jedoch wurde nicht analysiert, ob Curcumin die Aktivität der SOD1 selbst beeinflusst (Suckow und Suckow, 2006). So sind die Analysen dieser Dissertation der erste Nachweis, dass die erhöhte PaSOD1-Aktivität wirklich notwendig für die Curcumin-vermittelte Lebensspanne ist. Weiterhin ergaben Analysen des lebensverlängernden Effektes von Curcumin zusammen mit dem Antioxidationsmittel N-Acetyl-L-Cystein eine Abhängigkeit der Curcumin-induzierten Langlebigkeit von der leicht erhöhten Wasserstoffperoxid-Menge. Entsprechend der bekannten Induktion von Autophagie durch Wasserstoffperoxid (Scherz-Shouval und Elazar, 2007; Scherz-Shouval *et al.*, 2007), ist Wasserstoffperoxid vermutlich das Signal zur Übermittlung der Curcumin-Effekte.

Ähnliche lebensverlängernde Effekte der Induktion von Autophagie wurden auch schon für andere Polyphenole, wie z. B. Rapamycin, Spermidin oder Resveratrol, ermittelt. In diesen Fällen sind die

Mechanismen hinter der Autophagie-Induktion jedoch nicht vollständig geklärt (Bjedov *et al.*, 2010; Eisenberg *et al.*, 2009; Harrison *et al.*, 2009; Madeo *et al.*, 2010; Morselli *et al.*, 2010). Es ist gut möglich, dass auch bei diesen Polyphenolen eine Induktion über Wasserstoffperoxid oder ROS im Allgemeinen erfolgt.

Vorherige Untersuchungen in der Arbeitsgruppe zeigten, dass Autophagie in *P. anserina* nicht nur als „longevity assurance pathway“, sondern auch als Kompensations-Mechanismus von Stresssituationen, z. B. durch den Verlust von Komponenten der mitochondrialen Qualitätskontrolle, dient (Knuppertz, 2017; Knuppertz und Osiewacz, 2017; Knuppertz *et al.*, 2017). Ähnlich ist die Induktion von nicht-selektiver Autophagie und Mitophagie durch die Behandlung von *P. anserina* mit Gossypol einzustufen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Gossypol-induzierte Lebensverkürzung nicht von einer intakten Autophagie-Maschinerie abhängt (Warnsmann *et al.*, 2018). Dennoch kann die Induktion von Autophagie durch Gossypol-Behandlung eine Art Kompensation der beschriebenen mitochondrialen Dysfunktion darstellen. Jedoch ist dieser Ausgleich nicht ausreichend um die negativen Effekte und somit die Lebensverkürzung auszugleichen. Für die Hypothese der Kompensation durch Autophagie-Induktion sprechen auch frühere Befunde aus Untersuchungen an humanen Zelllinien. So wird in Brust- und Blasenkrebszellen durch Gossypol gleichzeitig Apoptose und eine zytoprotektive Form der Autophagie induziert (Antonietti *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2010; Mani *et al.*, 2015). Die spezifische Inhibierung der Autophagie, durch Methyladenin oder Bafilomycin, führt in beiden Krebsarten zu einer deutlich gesteigerten Induktion von Apoptose durch eine Behandlung mit Gossypol (Antonietti *et al.*, 2016; Mani *et al.*, 2015). Dieser Effekt wurde in Brustkrebszellen auch mit einem weiteren spezifischen Inhibitor der Autophagie, dem Wortmannin, beobachtet (Gao *et al.*, 2010). Möglicherweise dient die Induktion der Autophagie dem Ausgleich einer reduzierten ATP-Menge, welche aufgrund der mitochondrialen Dysfunktion vermutlich geringer ist als in unbehandelten Stämmen. Ein solcher Ausgleich der ATP-Menge wurde in *P. anserina* schon von Frau Laura Knuppertz in ihrer Dissertation bei den Untersuchungen der *PaClpXP*-Deletionsmutante beschrieben (Knuppertz, 2017; Knuppertz und Osiewacz, 2017). Auch für höhere Organismen, wie z. B. Mäusen, wurde ein Ausgleich geringerer ATP-Mengen durch autophagische Prozesse beschrieben (Hubbard *et al.*, 2010; Tang und Rando, 2014).

Interessanterweise ist die Gossypol-vermittelte Induktion der Mitophagie unabhängig von PaATG1, einem Protein der initialen Schritte der Autophagie-Maschinerie. Somit ist der detektierte Abbau des mitochondrialen Reporterproteins *PaSod3^{H26L}::Gfp* unabhängig von der normalen Autophagie-Maschinerie. Diese Befunde deuten auf einen ATG1-unabhängigen Abbau der geschädigten Mitochondrien hin. Denkbar ist ein Abbau geschädigter Mitochondrien durch die Bildung von sogenannten „mitochondria derived vesicles“ (kurz: MDV). Dabei werden in Säuger-Zellen Teile von

geschädigten Mitochondrien gezielt abgeschnürt und zum Abbau in die Lysosomen transportiert. Dieser Vorgang ist unabhängig von den bekannten Autophagie-Proteinen (Neuspiel *et al.*, 2008; Soubannier *et al.*, 2012a; Soubannier *et al.*, 2012b). In Untersuchungen mit HeLa-Zellen und Rinderherz-Mitochondrien wurde gezeigt, dass die Bildung der MDVs durch oxidativen Stress stimuliert wird und die gebildeten Vesikel oxidative geschädigte Proteine enthalten (Soubannier *et al.*, 2012a; Soubannier *et al.*, 2012b). Die Gossypol-Behandlung führt in *P. anserina* zu einem starken Anstieg der Wasserstoffperoxid-Menge und einer Reduktion der Wachstumsrate, dies zusammen spricht für oxidativen Stress in der Zelle. Daher ist eine Bildung von MDVs zum Abbau von Mitochondrien denkbar. Zur genaueren Abklärung müssten jedoch weiteren Analysen, z. B. mit anderen ATG-Deletionsmutanten, folgen. Eine Bestätigung dieser Hypothese wäre der erste Nachweis eines ATG-unabhängigen Abbaus von Mitochondrien über die Bildung von MDVs in Pilzen.

Insgesamt zeigen die Befunde einen neuen mechanistischen Einblick in die Wirkung von Curcumin, speziell, dass eine erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge zur Induktion von Autophagie beiträgt, welche der Grund der Lebensverlängerung darstellt. Darüber hinaus zeigen die Daten zur überlebensfördernden und kompensierenden Wirkung der Autophagie-Induktion Möglichkeiten auf, um bestehende Therapien von Krankheiten gezielt zu verbessern oder neue Therapieansätze zu entwickeln.

Wasserstoffperoxid reduziert das Überleben durch PaCYPD-abhängige Induktion von programmiertem Zelltod

Die detaillierte Analyse des Metacaspase-abhängigen apoptotischen Zelltods durch Behandlung von *P. anserina*-Wildtyp-Stämmen mit Gossypol ergab einen starken Anstieg des Wasserstoffperoxid-Austoßes (Warnsmann *et al.*, 2018). Ein ähnlicher Anstieg der Wasserstoffperoxid-Menge wurde bereits in Untersuchungen mit verschiedenen Krebszellen nach Behandlung mit Gossypol beobachtet. So steigt z. B. in Dickdarmkrebs-Zellen und Myelom-Zellen die Wasserstoffperoxid-Konzentration gleichzeitig mit der Zelltod-Induktion an (Ko *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2014). Der in *P. anserina* beobachtete Anstieg der Wasserstoffperoxid-Menge passt zu der Theorie, dass eine stark erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge zur Induktion von programmiertem Zelltod, insbesondere Apoptose, führt (Kroemer *et al.*, 2007; Sablina *et al.*, 2005; Szabadkai *et al.*, 2004). Beispielsweise wird durch Wasserstoffperoxid in *S. cerevisiae* und auch in Pflanzen apoptotischer Zelltod induziert (Apel und Hirt, 2004; Carraro und Bernardi, 2016; Madeo *et al.*, 1999). Ebenfalls induziert eine Exposition von kortikalen Neuronen-Zellen aus Ratten mit Wasserstoffperoxid einen apoptotischen Zelltod (Whittemore *et al.*, 1995). Eine solche Induktion

von Zelltod scheint auch zum Absterben neuronaler Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer, zu führen. Bei beiden Erkrankungen wurde in absterbenden Zellen ein erhöhter oxidativer Stress ermittelt (Olanow, 1992; Richardson, 1993).

Die beschriebene Verbindung von Wasserstoffperoxid-Stress und apoptotischem Zelltod wurde in früheren Arbeiten auch für das hier verwendete Modellsystem *P. anserina* beschrieben. In seneszenten *P. anserina* Wildtyp-Stämmen wird Apoptose induziert und gleichzeitig deutlich vermehrt Wasserstoffperoxid ausgeschieden (Scheckhuber *et al.*, 2007). Weitere Studien ergaben, dass Wasserstoffperoxid ein Aktivator der Metacaspase PaMCA1 ist, wodurch die proteolytische Aktivität ansteigt und apoptotischer Zelltod induziert wird (Brust, 2011; Hamann *et al.*, 2007). Die Aktivierung von Metacaspasen durch Wasserstoffperoxid und die damit verbundene Induktion von Apoptose wurde auch schon in Pflanzen, wie *Arabidopsis*, und anderen Pilzen beobachtet (Cao *et al.*, 2009; He *et al.*, 2008; Madeo *et al.*, 1999).

Interessanterweise ist in *P. anserina* sowohl der Gossypol-induzierte Zelltod als auch die mitochondriale Dysfunktion abhängig von Cyclophilin D (PaCYPD). Beide Effekte wurden bei der Behandlung von *P. anserina* *CypD*-Deletionsstämmen nicht beobachtet. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die mPTP bzw. die Öffnung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore (mPTP) eine Rolle im Metacaspase-abhängigen Zelltod spielt. Der genaue Aufbau der mPTP ist nicht absolut bewiesen und die Bestandteile teilweise unbekannt. Jedoch ist die F_0F_1 -ATP-Synthase ein gesicherter Bestandteil der Pore (Bernardi, 2013; Giorgio *et al.*, 2009; Giorgio *et al.*, 2013) und CYPD der Regulator der Poren-Öffnung (Baines *et al.*, 2005; Basso *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2005; Schinzel *et al.*, 2005). Aus der Literatur ist bekannt, dass große Mengen Wasserstoffperoxid das Öffnen der mPTP induzieren (Baines *et al.*, 2005; Jacobson und Duchon, 2002; Nguyen *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist das CYPD-vermittelte Öffnen der Pore ein weiterer Faktor, der zur Induktion von apoptotischen Zelltod führt (Izzo *et al.*, 2016; Liang und Zhou, 2007; Palma *et al.*, 2009). Daraus lässt sich ableiten, dass der Anstieg der Wasserstoffperoxid-Menge durch die Behandlung mit Gossypol eine CYPD-vermittelte Öffnung der mPTP induziert. Durch diese Öffnung strömen weitere ROS in das Zytosol. Durch diesen Ausstrom können zusätzlich die Metacaspasen aktiviert werden, was zu einer Induktion von apoptotischem Zelltod führt.

Möglicherweise ist aber nicht CYPD, als Regulator der mPTP, der „Angriffspunkt“ von Gossypol, sondern die mPTP an sich. Daten aus der Kooperation mit der AG von Prof. Kögel zeigen nachweislich eine Reduktion der Gossypol-Effekte durch die Inhibierung der mPTP in Glioblastom-Zellen. So konnte Nina Meyer zeigen, dass in diesen Zellen der Gossypol-induzierte Zelltod und die induzierte mitochondriale Depolarisation durch die mPTP-Inhibitor Olesoxime (Bordet *et al.*, 2007), reduziert wird (Meyer, 2015; Warnsmann *et al.*, 2018). Anders als in *P. anserina* wird in den

Apoptose-resistenten Glioblastom-Zellen durch die Behandlung mit Gossypol autophagischer Zelltod induziert (Voss *et al.*, 2010). Neueste Daten, die sich in Veröffentlichung befinden, zeigen, dass der Zelltod auf selektiver Autophagie der Mitochondrien (Mitophagie) beruht (Meyer *et al.*, zur Publikation angenommen). Neben der bereits beschriebenen Rolle der mPTP in der Apoptose-Induktion, zeigen verschiedene Studien u. a. an Ratten-Hepatozyten, menschlichen Herzmuskel-Zellen und *P. anserina* eine Rolle der mPTP in der Induktion von Autophagie, insbesondere von Mitophagie (Carreira *et al.*, 2010; Elmore *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2016; Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2006). Zusammengenommen sprechen diese Daten für eine Wirkung von Gossypol abhängig von der mPTP. Auch für andere Polyphenole ist solch eine mPTP-abhängige Wirkung bekannt. Beispielsweise führt die Behandlung von Leukämie-Zellen mit Resveratrol zu einer mPTP-abhängigen Induktion von apoptotischem Zelltod (Zunino und Storms, 2006).

Nach wie vor ist die Frage offen, mit welcher Komponente der mPTP Gossypol interagiert. Eine naheliegende Möglichkeit ist die Interaktion von Gossypol mit der OSCP („oligomycin sensitivity conferring protein“)-Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase. Hierfür spricht zum einen, dass Untersuchungen an Mitochondrien aus Rinderherz, Mausleber und humanen Osteosarkom-Zellen eine Bindung von CYPD mit der OSCP-Untereinheit zeigen (Chinopoulos *et al.*, 2011; Giorgio *et al.*, 2009; Giorgio *et al.*, 2013). Zum anderen spricht die beobachtete, eingeschränkte Wirkung von Oligomycin, einem spezifischen Inhibitor der F_0F_1 -ATP-Synthase, sowohl in Glioblastomzellen als auch *P. anserina*-Wildtyp-Mitochondrien (Warnsmann *et al.*, 2018) für eine Interaktion von Gossypol mit der OSCP-Untereinheit. Die Bindestelle von Oligomycin an der F_0F_1 -ATP-Synthase ist von Mensch bis Hefe stark konserviert (Symersky *et al.*, 2012). So scheint Gossypol die Bindung von Oligomycin zu verhindern und im Gegenzug die Bindung von CYPD und somit die Öffnung der mPTP zu fördern.

Insgesamt zeigen die Daten dieser Dissertation und derjenigen aus der Zusammenarbeit mit der AG von Prof. Kögel eine mPTP-abhängige Induktion von Zelltod nach Behandlung mit Gossypol. Abhängig vom zellulären Hintergrund wird durch das Öffnen der mPTP entweder apoptotischer oder autophagischer Zelltod induziert. In *P. anserina* wird, aufgrund der intakten Apoptose-Maschinerie, durch die Behandlung mit Gossypol ein PaMCA1- und PaCYPD-abhängiger apoptotischer Zelltod induziert. Diese neue Rolle von CYPD bzw. der mPTP zeichnen sie als geeignete Ansatzpunkte für die Weiterentwicklung der Krebstherapien mit Gossypol aus. Darüber hinaus sind CYPD, die mPTP und ROS bereits bekannte und oft verwendete Ansatzpunkte für andere Therapien von Krebserkrankungen (Millimouno *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2013) und auch diese Therapien könnten mit Hilfe der in dieser Dissertation gefundenen Abhängigkeiten verbessert werden. ROS zählt beispielsweise zu den Ansatzpunkten, da Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen eine erhöhte ROS-Konzentration aufweisen (Toyokuni *et al.*, 1995). Daher kann durch eine

Erhöhung der ROS-Menge in Krebszellen schneller der Schwellenwert zur Induktion von Zelltod überschritten werden als in normalen, gesunden Zellen (Yang *et al.*, 2013).

5.3.2 Die O-Methyltransferase PaMTH1 als Regulator von Lebensspannen-Effekten

Die O-Methyltransferase PaMTH1 wurde das erste Mal in einer altersabhängigen Proteomanalyse von *P. anserina*-Wildtyp-Stämmen im Rahmen einer früheren Dissertation in der Arbeitsgruppe erwähnt (Averbeck *et al.*, 2000). Weitere Analysen in verschiedenen Arbeiten zeigten einen altersabhängigen Anstieg der PaMTH1-Menge nicht nur im Zytoplasma, sondern auch eine erhöhte Translokation in die Mitochondrien von Wildtyp-Stämmen (Averbeck *et al.*, 2000; Groebe *et al.*, 2007; Kunstmann und Osiewacz, 2008). Untersuchungen von *PaMth1*-Mutanten, in denen das *PaMth1*-Gen deletiert oder überexprimiert wurde, ergaben eine Verbindung der O-Methyltransferase zu oxidativem Stress und der Regulation der Lebensspanne von *P. anserina* (Kunstmann und Osiewacz, 2008, 2009). Ein Sequenz-Vergleich ergibt eine Homologie von PaMTH1 aus *P. anserina* zu Catechol-O-Methyltransferasen von Menschen und Nagern (Averbeck *et al.*, 2000). Der genauere Vergleich erlaubt eine Zuordnung von PaMTH1 zu den Klasse I-Methyltransferasen, zu denen auch die Catechol-O-Methyltransferasen aus Mensch und Nagern gehören (Kunstmann, 2009; Kunstmann und Osiewacz, 2008). Für verschiedene Klasse I-Methyltransferasen wurde in der Vergangenheit *in-vitro* beobachtet, dass sie Flavonoide, wie z. B. Quercetin, als Substrate verwenden und diese methylieren (Cacace *et al.*, 2003; Ibdah *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 1994). Übereinstimmend ergaben *in-vitro*-Studien, dass Flavonoide mögliche Substrate der PaMTH1 sind. Aktivitäts-Assays mit heterolog exprimierter PaMTH1 in Rahmen einer vorangegangenen Dissertation wiesen Flavonoide wie Myricetin oder Quercetin als potentielle Substrate nach (Knab und Osiewacz, 2010; Kunstmann und Osiewacz, 2008). Analysen mit NMR (engl. „nuclear magnetic resonance“)-Spektroskopie bestätigten, dass Flavonoide mögliche Substrate der PaMTH1 sind und ergaben zusätzlich, dass eine Dimerisierung der PaMTH1 für die Funktionalität erforderlich ist (Chatterjee *et al.*, 2015).

Wie bereits beschrieben, wirkt sich das Flavonoid Quercetin positiv auf das Überleben verschiedener Organismen aus. Dies gilt auch für *P. anserina*. Erste Analysen in der Bachelorarbeit von Saskia Hainbuch lieferten Hinweise auf eine Abhängigkeit der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung von der Aktivität der O-Methyltransferase PaMTH1 (Hainbuch, 2016). So steigt die Menge von PaMTH1 im Zytoplasma und den Mitochondrien durch eine Behandlung des *P. anserina*-Wildtyps mit Quercetin an (Hainbuch, 2016). Diese initialen Hinweise wurden durch Analysen in der vorliegenden Dissertation untermauert und im Detail untersucht. Analysen des

Quercetin-Effektes auf *PaMth1*-Mutanten belegen die Notwendigkeit der Anwesenheit von PaMTH1 für den Quercetin-vermittelten Lebensspannen-Effekt. Abhängig von der Anwesenheit des Proteins wird die Lebensspanne entweder nicht beeinflusst ($\Delta PaMth1$) oder im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlängert (*PaMth1_OEx*). Diese Abhängigkeit von PaMTH1 lässt eine Methylierung von Quercetin durch PaMTH1 in *P. anserina* vermuten. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der beschriebenen *in-vitro* Studien, die eine potentielle Methylierung von Quercetin vorhersagten (Chatterjee *et al.*, 2015; Kunstmann und Osiewacz, 2008). Weitere *in-vitro* Studien zeigten, dass Quercetin an den beiden vicinalen Hydroxyl-Resten methyliert wird (Heijnen *et al.*, 2002), dabei entsteht 3'-O-Methylquercetin (Isorhamnetin) und/oder 4'-O-Methylquercetin (Tamarixetin).

Übereinstimmend zu den Daten der Analyse des *PaMth1_OEx*-Stammes zeigen Analysen mit Isorhamnetin eine Lebensverlängerung des *P. anserina*-Wildtyps. Im Vergleich zu Quercetin ist der Isorhamnetin-Effekt größer und vergleichbar mit dem Quercetin-Effekt in der *PaMth1*-Überexpressionsmutante. Die Ergebnisse werden zusätzlich durch die Tatsache gestützt, dass Isorhamnetin im Gegenteil zu Quercetin die Lebensspanne der *PaMth1*-Deletionsmutante verlängert. Dadurch bestätigt sich die notwendige Methylierung von Quercetin, um einen Effekt auf die Lebensspanne vermitteln zu können.

Die beschriebene Verbindung von Quercetin-vermittelter Lebensverlängerung, PaMTH1 und einer Methylierung wird durch Daten aus Analysen mit *C. elegans* unterstützt. Transkriptom-Analysen von Quercetin-behandelten Würmern zeigen einen Anstieg der Transkript-Mengen von zwei unterschiedlichen Catechol-O-Methyltransferasen verglichen zu den Kontroll-Würmern (Pietsch *et al.*, 2012). Auch andere Polyphenole, wie die Tanninsäure, zeigen ähnliche Effekte auf die Transkript-Menge dieser O-Methyltransferasen in *C. elegans* (Pietsch *et al.*, 2012).

In *C. elegans* wurde gezeigt, dass methylierte Derivate von Quercetin und Epichatechin, einem anderen Flavonoid, einen ausgeprägteren Effekt auf die Lebensspanne ausüben als die unmethylierten Derivate (Surco-Laos *et al.*, 2011; Surco-Laos *et al.*, 2012). Büchter und Kollegen konnten auch für methylierte Derivate des Flavonoids Myrecitin einen deutlich größeren Effekt auf die Lebensspanne von *C. elegans* feststellen als es das unmethelierte Myrecitin hervorruft (Büchter *et al.*, 2015). Im Unterschied zu den Ergebnissen der vorliegenden Doktorarbeit wurde in den Studien an *C. elegans* ein Zusammenhang der Flavonoid-vermittelten Lebensverlängerung und der Methylierung durch O-Methyltransferasen nur vermutet, aber nicht experimentell angegangen. Die hier vorliegende Doktorarbeit stellte die erste experimentelle Verknüpfung von der Wirkung eines Flavonoids und der Methylierung durch eine spezielle O-Methyltransferase dar. Eine Methylierung von Quercetin ist, wie in der Einleitung ausführlicher beschrieben (siehe Kapitel 1.3.2), bekannt im

Zusammenhang mit der sowohl anti-oxidativen als auch pro-oxidativen Wirkung von Quercetin, aber auch anderen Polyphenolen. Diese oxidativen Wirkungen sind auf die Hydroxyl-Reste zurückzuführen und *in-vitro* Studien mit anderen Flavonoiden zeigten, dass Methylierungen dieser Reste die Effekte verhindern (Cao *et al.*, 1997; Duenas *et al.*, 2010; Lemanska *et al.*, 2004).

Passend dazu ergaben die Untersuchungen in dieser Arbeit Effekte, die entweder auf unmethyliertes oder methyliertes Quercetin zurückzuführen sind. Im *P. anserina*-Wildtyp wird nach der Aufnahme sehr wahrscheinlich nicht alles Quercetin methyliert. Unterstützt durch die Analysen der *PaMth1*-Mutanten und mit Isorhamnetin zeigte sich, dass ein Teil der im Wildtyp ermittelten Effekte unabhängig von dem Effekt auf die Lebensspanne ist und vom Anteil an unmethylierten Quercetin abhängt. Die erhöhte Atmung und die pro-oxidativen Effekte wurden nicht in der Überexpressionsmutante mit Quercetin oder dem Wildtyp mit Isorhamnetin gefunden und stehen somit nicht in Verbindung mit der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung. Eine Methylierung verhindert somit die zellschädigende pro-oxidative Wirkung von Quercetin, wie z. B. die Schädigung der PaSOD1, welche durch einen Aktivitätsverlust sichtbar wird.

Die erzielten Befunde lassen sich auf höhere Eukaryoten übertragen, was durch frühere Studien unterstützt wird. Studien an Nagern, Schweinen und Menschen zeigten, dass nach oraler Aufnahme von Quercetin hauptsächlich methylierte Derivate im Blutplasma und in verschiedenen Organen nachgewiesen werden können (Ader *et al.*, 2000; Cermak *et al.*, 2003; Hubbard *et al.*, 2003; Manach *et al.*, 1998; Manach *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 1994). Im menschlichen Blutplasma wurde z. B. nach oraler Verabreichung von Quercetin 21 % der zugeführten Menge in Form des methylierten Derivates Isorhamnetin gefunden (Day *et al.*, 2001). Dieser Anteil steigt bei Ratten nach Quercetin-Aufnahme deutlich an und liegt ca. bei 80 % der aufgenommenen Menge (Manach *et al.*, 1999; Morand *et al.*, 1998). Das Verhältnis von Quercetin zu Isorhamnetin zu Tamarexin entspricht ca. 1:5:1 (Morand *et al.*, 1998). Untersuchungen von Hamstern nach Supplementierung der Nahrung mit Quercetin ergaben, dass nur 2 % der zugeführten Menge als Quercetin im Urin ausgeschieden werden und ca. 97 % in Form von Isorhamnetin (Zhu *et al.*, 1994). Die Methylierung von Quercetin in Menschen und Nagern beruht auf einer Aktivität von Catechol-*O*-Methyltransferasen (Chen *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2010). Dies lässt zusammengenommen die Vermutung zu, dass auch in den höheren Eukaryoten eine Methylierung von Quercetin notwendig für den lebensverlängernden Effekt ist. In humanen Zelllinien wurde bereits eine Lebensverlängerung durch Quercetin nachgewiesen (Niklas *et al.*, 2012), jedoch wurde die Methylierung von Quercetin oder die Rolle der Methyltransferasen nicht untersucht. Methylierungen nach der oralen Aufnahme wurden auch für anderen Flavonoide beschrieben. Beispielsweise wurden *O*-methylierte Derivate von Luteolin in verschiedenen Organen von Ratten gefunden, nachdem sie Luteolin über die Nahrung verabreicht bekommen haben (Chen *et al.*, 2011).

Insgesamt zeigen die Daten der Untersuchungen mit Quercetin eine neue Rolle von *O*-Methyltransferasen in der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung. Darüber hinaus verdeutlichen die Daten, dass Quercetin abhängig vom Methylierungsstatus unterschiedliche Effekte auslösen kann (

Abbildung 55). Für die Forschung an Quercetin als Therapeutikum zur Intervention in den Alterungsprozess lieferte diese Arbeit neue Ansätze. Ein Ansatz ist z. B., die Methylierungskapazität der Zelle, durch gezielte Induktion von Genen für spezifische *O*-Methyltransferasen, zu optimieren.

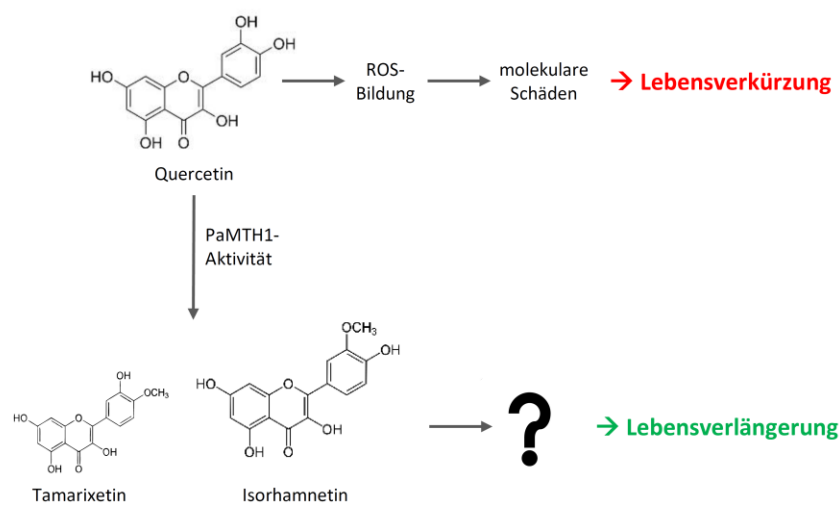


Abbildung 55: Notwendigkeit der *O*-Methyltransferase PaMTH1 für den lebensverlängernden Effekt von Quercetin. Quercetin wird im *P. anserina*-Wildtyp teilweise durch die *O*-Methyltransferase PaMTH1 methyliert, wobei zwei methylierte Derivate entstehen können. Aufgrund der Befunde in der Literatur entsteht wahrscheinlich hauptsächlich hauptsächlich das 3'-OH-methylierte Isorhamnetin und seltener das 4'-OH-methylierte Tamarixetin. Noch ist unklar, welche Effekte von den methylierten Derivaten hervorgerufen werden, die dann in einer Lebensverlängerung resultieren. Der Anteil an unmethylierte Quercetin sorgt für die Bildung von ROS. Die daraus resultierenden Schäden können eine Lebensverkürzung verursachen.

Die Daten dieser Arbeit haben in der Gesamtheit dazu beigetragen, die grundlegenden molekularen Wirkmechanismen der drei Polyphenole Gossypol, Curcumin und Quercetin weiter aufzuklären. In allen drei Fällen wurden neue, bis dahin unbekannte, Abhängigkeiten der Effekte auf das Überleben beschrieben. Durch eine erfolgreiche Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. D. Kögel konnte die ermittelte Abhängigkeit des Gossypol-induzierten Zelltods auch in Glioblastom-Zellen beobachtet werden. Zusätzlich liefert diese Arbeit Daten zur Kompensation von zellulären Dysfunktionen und Stressbedingungen durch die Anpassung der Mitochondrienfunktion oder die Induktion von Autophagie.

6 AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur Aufklärung der Wirkmechanismen der Polyphenole Gossypol, Curcumin und Quercetin. Darüber hinaus ergeben sich aus den Befunden neue interessante Ansatzpunkte und Perspektiven für weiterführende Untersuchungen:

1. Im Zusammenhang mit den neuen Hinweisen auf eine Rolle von CYPD bzw. der mPTP in der Gossypol-vermittelten Induktion von programmiertem Zelltod sind genauere Analysen sinnvoll. Beispielweise Untersuchungen mit Hinblick auf eine mögliche Interaktion von Gossypol und CYPD oder anderen Komponenten der mPTP. Hierbei sollte ein Augenmerk auf der OSCP-Untereinheit der F_0F_1 -ATP-Synthase liegen. Diese ist einerseits ein wahrscheinlicher Bestandteil der mPTP und andererseits ein mögliches Ziel von Gossypol, wie es die OCR-Messungen mit dem Inhibitor Oligomycin zeigten.
2. Neben den Analysen des Gossypol-Effektes in der *PaAtg1*-Deletionsmutante sollten Untersuchungen in weiteren Autophagie-Mutanten erfolgen. Diese können helfen, den Mechanismus der ATG1-unabhängigen Mitophagie in Gossypol-behandelten Kulturen aufzuklären. Zusätzlich könnte die Ermittlung der PaATG8-Menge einen Eindruck der Bildung von Autophagosomen liefern. Aufschlussreich ist auch die Analyse ATG-unabhängiger Mitophagie im Wildtyp unter verschiedenen Stress-Bedingungen. Diese Untersuchungen könnten die Vermutung bestätigen, dass an diesem Abbau sogenannte „mitochondrial derived vesicles“ (MDV; (Neuspiel *et al.*, 2008)) beteiligt sind. Weiterhin wären eine Bestätigung dieses Abbauweges der erste Nachweis zum Vorhandensein von MDV in Pilzen.
3. Auch die Untersuchung der genauen Rolle der *O*-Methyltransferase PaMTH1 in der Quercetin-vermittelten Lebensverlängerung stellt einen interessanten und wichtigen Punkt für weitere Analysen dar. In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, die Frage anzugehen, wie kommt die MTH1 in die Mitochondrien? Worin liegt das Signal für die Translokation? Weiterhin ist die Frage nach dem Grund der Langlebigkeit ungeklärt. Welche Effekte werden durch das methylierte Quercetin verursacht?

7 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren findet die Wirkung von Polyphenolen auf den Alterungsprozess oder zur Behandlung von Krankheiten immer mehr Beachtung. Das Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Wirkmechanismen der Polyphenole Gossypol, Curcumin und Quercetin, um Hinweise für neue oder verbesserte Therapieansätze zu erhalten. Die dazu durchgeführten Untersuchungen lieferten folgende Ergebnisse:

1. Der Ascomycet *P. anserina* eignet sich als Modellorganismus zur Untersuchung der Wirkmechanismen verschiedener Polyphenole, da die bereits aus der Literatur bekannten Effekte auf das Überleben höherer Organismen auch in *P. anserina* beobachtet wurden.
2. Die Mitochondrienfunktion spielt auf unterschiedliche Art eine Rolle in der Kompensation von Dysfunktionen oder Stressbedingungen in der Zelle und wirkt somit positiv auf die Regulation der Lebensspanne von *P. anserina*. In der *PaSod3*-Deletionsmutante wurde eine Verschiebung der mitochondrialen Atmung von einer Komplex I-abhängigen hin zu einer vermehrt Komplex II-abhängigen Atmung festgestellt. Die damit verbundene Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials dient neben der bereits bekannten hohen Superoxid-Menge als Signal zur Mitophagie-Induktion. Auch die Anpassung der Mitochondrienfunktion durch die erhöhte Bildung von mtrSCs, wie im Falle von Gossypol oder Quercetin, kann zur Kompensation von Dysfunktionen beitragen bzw. sie abschwächen.
3. Es gibt keinen grundlegenden gemeinsamen Wirkmechanismus der drei untersuchten Polyphenole. Zwar spielt Wasserstoffperoxid bei verschiedenen Stoffen eine Rolle, aber nicht bei allen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass Wasserstoffperoxid abhängig von der vorherrschenden Konzentration wirkt und daher auch keine Allgemeingültigkeit des Effektes vorherzusagen ist. In niedrigen Konzentrationen sorgt Wasserstoffperoxid z. B. für eine Induktion der Autophagie und damit einhergehende eine Lebensverlängerung. Im Gegensatz dazu wirken hohe Wasserstoffperoxid-Konzentrationen lebensverkürzend und lösen verschiedene Formen von Zelltod aus.
4. Die Curcumin-vermittelte Langlebigkeit wurde das erste Mal in Verbindung mit einer funktionellen Autophagie gebracht werden. Im Detail führt die Behandlung mit Curcumin durch eine PaSOD1-abhängige leichte Erhöhung der Wasserstoffperoxid-Menge zu einer

Induktion von nicht-selektiver Autophagie. Die induzierte Autophagie ist Ursache der Lebensverlängerung durch Curcumin.

5. Gossypol wirkt in Abhängigkeit der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-pore bzw. von ihrem Regulator Cyclophilin D. Hierbei verstärkt die deutlich erhöhte Wasserstoffperoxid-Menge wahrscheinlich die Induktion von programmiertem Zelltod. Gleichzeitig wird eine cytoprotektive Form von Autophagie und ein scheinbar ATG-unabhängiger Abbau von Mitochondrien induziert.

6. Quercetin wirkt in *P. anserina* abhängig vom Methylierungs-Status. Untersuchungen mit Mutanten der *O*-Methyltransferase PaMTH1 ergaben die Notwendigkeit der Anwesenheit von PaMTH1 für den lebensverlängernden Effekt von Quercetin. Analysen mit dem methylierten Derivat Isorhamnetin verdeutlichten diese Abhängigkeit und zeigten zudem, dass Quercetin sowohl in der methylierten als auch unmethylierten Form Effekte hervorruft. Jedoch sind nur die Effekte des unmethylierten Quercetin unabhängig von der Lebensverlängerung und eher schädlich für die Zelle.

8 LITERATUR

- Abou-Donia, M.B. und Dieckert, J.W. (1976)** Gossypol: Uncoupling of respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Life Science* 14, 1955-1963.
- Achan, J., Talisuna, A.O., Erhart, A., Yeka, A., Tibenderana, J.K., Baliraine, F.N., Rosenthal, P.J. und D'Alessandro, U. (2011)** Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J* 10, 144.
- Acin-Perez, R., Fernandez-Silva, P., Peleato, M.L., Perez-Martos, A. und Enriquez, J.A. (2008)** Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32, 529-539.
- Adam, C., Picard, M., Dequard-Chablat, M., Sellem, C.H., Hermann-Le Denmat, S. und Contamine, V. (2012)** Biological roles of the *Podospira anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. *PLoS One* 7, e38138.
- Ader, P., Wessmann, A. und Wolfram, S. (2000)** Bioavailability and metabolism of the flavonol quercetin in the pig. *Free Radic Biol Med* 28, 1056-1067.
- Aggarwal, B.B., Sundaram, C., Malani, N. und Ichikawa, H. (2007)** Curcumin: the Indian solid gold. *Adv Exp Med Biol* 595, 1-75.
- Aguirre, J., Rios-Momberg, M., Hewitt, D. und Hansberg, W. (2005)** Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol* 13, 111-118.
- Ahmed, S., Jelani, M., Alrayes, N., Mohamoud, H.S., Almramhi, M.M., Anshasi, W., Ahmed, N.A., Wang, J., Nasir, J. und Al-Aama, J.Y. (2015)** Exome analysis identified a novel missense mutation in the CLPP gene in a consanguineous Saudi family expanding the clinical spectrum of Perrault Syndrome type-3. *J Neurol Sci* 353, 149-154.
- Albert, B. und Sellem, C.H. (2002)** Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospira anserina* aging. *Curr Genet* 40, 365-373.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K. und Walter, P. (2014)** Molecular biology of the cell, 6 ed, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Ames, B.N., Atamna, H. und Killilea, D.W. (2005)** Mineral and vitamin deficiencies can accelerate the mitochondrial decay of aging. *Mol Aspects Med* 26, 363-378.
- Amiott, E.A., Lott, P., Soto, J., Kang, P.B., McCaffery, J.M., DiMauro, S., Abel, E.D., Flanigan, K.M., Lawson, V.H. und Shaw, J.M. (2008)** Mitochondrial fusion and function in Charcot-Marie-Tooth type 2A patient fibroblasts with mitofusin 2 mutations. *Exp Neurol* 211, 115-127.
- Antonietti, P., Gessler, F., DÜssmann, H., Reimertz, C., Mittelbronn, M., Prehn, J.H. und Kögel, D. (2016)** AT-101 simultaneously triggers apoptosis and a cytoprotective type of autophagy irrespective of expression levels and the subcellular localization of Bcl-xL and Bcl-2 in MCF7 cells. *Biochim Biophys Acta* 1863, 499-509.
- Apel, K. und Hirt, H. (2004)** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399.
- Aunan, E., Kibsgard, T.J., Diep, L.M. und Rohrl, S.M. (2015)** Intraoperative ligament laxity influences functional outcome 1 year after total knee arthroplasty. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 23, 1684-1692.
- Averbeck, N.B., Jensen, O.N., Mann, M., Schägger, H. und Osiewacz, H.D. (2000)** Identification and characterization of PaMTH1, a putative O-methyltransferase accumulating during senescence of *Podospira anserina* cultures. *Curr Genet* 37, 200-208.
- Bach-Faig, A., Berry, E.M., Lairon, D., Reguant, J., Trichopoulou, A., Dernini, S., Medina, F.X., Battino, M., Belahsen, R., Miranda, G., Serra-Majem, L. und Mediterranean Diet Foundation Expert, G. (2011)** Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr* 14, 2274-2284.
- Bae, S.C., Jung, W.J., Lee, E.J., Yu, R. und Sung, M.K. (2009)** Effects of antioxidant supplements intervention on the level of plasma inflammatory molecules and disease severity of rheumatoid arthritis patients. *J Am Coll Nutr* 28, 56-62.

- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J. und Molkentin, J.D. (2005)** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658-662.
- Bakala, H., Delaval, E., Hamelin, M., Bismuth, J., Borot-Laloi, C., Corman, B. und Friguët, B. (2003)** Changes in rat liver mitochondria with aging. Lon protease-like reactivity and N(epsilon)-carboxymethyllysine accumulation in the matrix. *Eur J Biochem* 270, 2295-2302.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. und Finkel, T. (2005)** Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.
- Balakrishnan, K., Wierda, W.G., Keating, M.J. und Gandhi, V. (2008)** Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 112, 1971-1980.
- Balci, A., Sahin, F.I. und Ekmekci, A. (1999)** Gossypol induced apoptosis in the human promyelocytic leukemia cell line HL 60. *Tohoku J Exp Med* 189, 51-57.
- Balunas, M.J. und Kinghorn, A.D. (2005)** Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78, 431-441.
- Barja, G. (1993)** Oxygen radicals, a failure or a success of evolution? *Free Radic Res Commun* 18, 63-70.
- Barros, M.H., Bandy, B., Tahara, E.B. und Kowaltowski, A.J. (2004)** Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 279, 49883-49888.
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M.A. und Bernardi, P. (2005)** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem* 280, 18558-18561.
- Baud, L. und Ardaillou, R. (1986)** Reactive oxygen species: production and role in the kidney. *Am J Physiol* 251, F765-776.
- Baumgartner, I., Pieczek, A., Manor, O., Blair, R., Kearney, M., Walsh, K. und Isner, J.M. (1998)** Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 97, 1114-1123.
- Baumgartner, I., Rauh, G., Pieczek, A., Wuensch, D., Magner, M., Kearney, M., Schainfeld, R. und Isner, J.M. (2000)** Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. *Ann Intern Med* 132, 880-884.
- Belazzi, T., Wagner, A., Wieser, R., Schanz, M., Adam, G., Hartig, A. und Ruis, H. (1991)** Negative regulation of transcription of the *Saccharomyces cerevisiae* catalase T (CTT1) gene by cAMP is mediated by a positive control element. *EMBO J* 10, 585-592.
- Belcour, L. (1981)** Mitochondrial DNA and senescence in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 4, 81-82.
- Belcour, L. und Begel, O. (1977)** Mitochondrial genes in *Podospora anserina*: recombination and linkage. *Mol Gen Genet* 153, 11-21.
- Belinha, I., Amorim, M.A., Rodrigues, P., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N. und Costa, V. (2007)** Quercetin increases oxidative stress resistance and longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 55, 2446-2451.
- Benz, C.C., Keniry, M.A., Ford, J.M., Townsend, A.J., Cox, F.W., Palayoor, S., Matlin, S.A., Hait, W.N. und Cowan, K.H. (1990)** Biochemical correlates of the antitumor and antimitochondrial properties of gossypol enantiomers. *Mol Pharmacol* 37, 840-847.
- Benzi, G., Pastoris, O., Marzatico, F., Villa, R.F., Dagani, F. und Curti, D. (1992)** The mitochondrial electron transfer alteration as a factor involved in the brain aging. *Neurobiol Aging* 13, 361-368.
- Beregi, E., Regius, O., Huttli, T. und Gobl, Z. (1988)** Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Z Gerontol* 21, 83-86.
- Bernardi, P. (2013)** The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol* 4, 95.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B. und Holden, J.M. (2014)** USDA Database for the flavonoid content of selected foods. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service.

- Bhat, T.A., Kumar, S., Chaudhary, A.K., Yadav, N. und Chandra, D. (2015)** Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discov Today* 20, 635-643.
- Bianchi, C., Fato, R., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. und Lenaz, G. (2003)** Structural and functional organization of Complex I in the mitochondrial respiratory chain. *Biofactors* 18, 3-9.
- Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. und Lenaz, G. (2004)** The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279, 36562-36569.
- Bjedov, I., Toivonen, J.M., Kerr, F., Slack, C., Jacobson, J., Foley, A. und Partridge, L. (2010)** Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab* 11, 35-46.
- Blackburn, E.H., Greider, C.W. und Szostak, J.W. (2006)** Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 12, 1133-1138.
- Boekema, E.J. und Braun, H.P. (2007)** Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282, 1-4.
- Böhm, H., Boeing, H., Hempel, J., Raab, B. und Kroke, A. (1998)** [Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases]. *Z Ernährungswiss* 37, 147-163.
- Bonawitz, N.D., Chatenay-Lapointe, M., Pan, Y. und Shadel, G.S. (2007)** Reduced TOR signaling extends chronological life span via increased respiration and upregulation of mitochondrial gene expression. *Cell Metab* 5, 265-277.
- Bonawitz, N.D., Clayton, D.A. und Shadel, G.S. (2006a)** Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell* 24, 813-825.
- Bonawitz, N.D., Rodeheffer, M.S. und Shadel, G.S. (2006b)** Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol Cell Biol* 26, 4818-4829.
- Bordet, T., Buisson, B., Michaud, M., Drouot, C., Galea, P., Delaage, P., Akentieva, N.P., Evers, A.S., Covey, D.F., Ostuni, M.A., Lacapere, J.J., Massaad, C., Schumacher, M., Steidl, E.M., Maux, D., Delaage, M., Henderson, C.E. und Pruss, R.M. (2007)** Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 322, 709-720.
- Borghouts, C., Scheckhuber, C.Q., Werner, A. und Osiewacz, H.D. (2002)** Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology* 3, 143-153.
- Bors, W., Michel, C. und Saran, M. (1994)** Flavonoid antioxidants: rate constants for reactions with oxygen radicals. *Methods Enzymol* 234, 420-429.
- Bota, D.A. und Davies, K.J. (2002)** Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat Cell Biol* 4, 674-680.
- Bouaita, A., Augustin, S., Lechauve, C., Cwerman-Thibault, H., Benit, P., Simonutti, M., Paques, M., Rustin, P., Sahel, J.A. und Corral-Debrinski, M. (2012)** Downregulation of apoptosis-inducing factor in Harlequin mice induces progressive and severe optic atrophy which is durably prevented by AAV2-AIF1 gene therapy. *Brain* 135, 35-52.
- Boveris, A. (1984)** Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105, 429-435.
- Boveris, A., Oshino, N. und Chance, B. (1972)** The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630.
- 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.
- Brahmachari, G. (2009)** Mother Nature – an inexhaustible source of drugs and lead molecules, in: Brahmachari, G. (Ed.), *Natural Products: Chemistry, Biochemistry and Pharmacology*, Alpha Science International, Oxford, UK / Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Delhi, 1-22.

- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. und Parker, N. (2004)** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37, 755-767.
- Brandt, T., Mourier, A., Tain, L.S., Partridge, L., Larsson, N.G. und Kühlbrandt, W. (2017)** Changes of mitochondrial ultrastructure and function during ageing in mice and *Drosophila*. *Elife* 6, :e24662.
- Bratic, I. und Trifunovic, A. (2010)** Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1797, 961-967.
- Bravo, L. (1998)** Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev* 56, 317-333.
- Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C. und Rice-Evans, C.A. (1998)** Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem J* 330, 1173-1178.
- Brust, D. (2011):** Die Bedeutung von Zelltod-Prozessen während der Alterung des filamentösen Ascomyzeten *Podospira anserina*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Brust, D., Daum, B., Breunig, C., Hamann, A., Kühlbrandt, W. und Osiewacz, H.D. (2010)** Cyclophilin D links programmed cell death and organismal aging in *Podospira anserina*. *Aging Cell* 9, 761-775.
- Büchter, C., Ackermann, D., Honnen, S., Arnold, N., Havermann, S., Koch, K. und Wätjen, W. (2015)** Methylated derivatives of myricetin enhance life span in *Caenorhabditis elegans* dependent on the transcription factor DAF-16. *Food Funct* 6, 3383-3392.
- Bush, J.A., Cheung, K.J., Jr. und Li, G. (2001)** Curcumin induces apoptosis in human melanoma cells through a Fas receptor/caspase-8 pathway independent of p53. *Exp Cell Res* 271, 305-314.
- Butler, M.S. (2005)** Natural products to drugs: natural product derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 22, 162-195.
- Butler, M.S. (2008)** Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Nat Prod Rep* 25, 475-516.
- Butler, M.S., Robertson, A.A. und Cooper, M.A. (2014)** Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat Prod Rep* 31, 1612-1661.
- Cacace, S., Schroder, G., Wehinger, E., Strack, D., Schmidt, J. und Schroder, J. (2003)** A flavonol O-methyltransferase from *Catharanthus roseus* performing two sequential methylations. *Phytochemistry* 62, 127-137.
- Calabrese, E.J. und Baldwin, L.A. (1998)** Hormesis as a biological hypothesis. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 1, 357-362.
- Calabrese, E.J., Dhawan, G., Kapoor, R., Iavicoli, I. und Calabrese, V. (2015)** What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity? *Biogerontology* 16, 693-707.
- Calvo, A.M., Wilson, R.A., Bok, J.W. und Keller, N.P. (2002)** Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 447-459.
- Calvo, S.E. und Mootha, V.K. (2010)** The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 11, 25-44.
- Campisi, J. (2003)** Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 38, 5-11.
- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Canizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S.I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P.I., Di Donato, S., Mandel, J.L., Coccozza, S., Koenig, M. und Pandolfo, M. (1996)** Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271, 1423-1427.
- Canada, A.T., Giannella, E., Nguyen, T.D. und Mason, R.P. (1990)** The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic Biol Med* 9, 441-449.

- Cao, G., Sofic, E. und Prior, R.L. (1997)** Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med* 22, 749-760.
- Cao, Y., Huang, S., Dai, B., Zhu, Z., Lu, H., Dong, L., Cao, Y., Wang, Y., Gao, P., Chai, Y. und Jiang, Y. (2009)** *Candida albicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal Genet Biol* 46, 183-189.
- Carelli, V., Rugolo, M., Sgarbi, G., Ghelli, A., Zanna, C., Baracca, A., Lenaz, G., Napoli, E., Martinuzzi, A. und Solaini, G. (2004)** Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1658, 172-179.
- Carraro, M. und Bernardi, P. (2016)** Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast. *Cell Calcium* 60, 102-107.
- Carreira, R.S., Lee, Y., Ghochani, M., Gustafsson, A.B. und Gottlieb, R.A. (2010)** Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. *Autophagy* 6, 462-472.
- Cartoni, R., Arnaud, E., Medard, J.J., Poirot, O., Courvoisier, D.S., Chrast, R. und Martinou, J.C. (2010)** Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* 133, 1460-1469.
- Cass, Q.B., Oliveira, R.V. und De Pietro, A.C. (2004)** Determination of gossypol enantiomer ratio in cotton plants by chiral higher-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 52, 5822-5827.
- Cermak, R., Landgraf, S. und Wolffram, S. (2003)** The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. *J Nutr* 133, 2802-2807.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T. und Pfanner, N. (2009)** Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.
- Chan, D.C. (2006)** Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252.
- Chance, B., Sies, H. und Boveris, A. (1979)** Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Chance, B. und Williams, G.R. (1956)** The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65-134.
- Chatterjee, D., Kudlinzki, D., Linhard, V., Saxena, K., Schieborr, U., Gande, S.L., Wurm, J.P., Wöhnert, J., Abele, R., Rogov, V.V., Dötsch, V., Osiewacz, H.D., Sreeramulu, S. und Schwalbe, H. (2015)** Structure and biophysical characterization of the S-adenosylmethionine-dependent O-methyltransferase PaMTH1, a putative enzyme accumulating during senescence of *Podospora anserina*. *J Biol Chem* 290, 16415-16430.
- Chen, M., Chen, Z., Wang, Y., Tan, Z., Zhu, C., Li, Y., Han, Z., Chen, L., Gao, R., Liu, L. und Chen, Q. (2016)** Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* 12, 689-702.
- Chen, Z., Chen, M., Pan, H., Sun, S., Li, L., Zeng, S. und Jiang, H. (2011)** Role of catechol-O-methyltransferase in the disposition of luteolin in rats. *Drug Metab Dispos* 39, 667-674.
- Chen, Z.P., Sun, J., Chen, H.X., Xiao, Y.Y., Liu, D., Chen, J., Cai, H. und Cai, B.C. (2010)** Comparative pharmacokinetics and bioavailability studies of quercetin, kaempferol and isorhamnetin after oral administration of *Ginkgo biloba* extracts, *Ginkgo biloba* extract phospholipid complexes and *Ginkgo biloba* extract solid dispersions in rats. *Fitoterapia* 81, 1045-1052.
- Chinopoulos, C., Konrád, C., Kiss, G., Metelkin, E., Töröcsik, B., Zhang, S.F. und Starkov, A.A. (2011)** Modulation of F₀F₁-ATP synthase activity by cyclophilin D regulates matrix adenine nucleotide levels. *FEBS J* 278, 1112-1125.
- Chongtham, A. und Agrawal, N. (2016)** Curcumin modulates cell death and is protective in Huntington's disease model. *Sci Rep* 6, 18736.
- Chowdhury, S.R., Djordjevic, J., Albensi, B.C. und Fernyhough, P. (2015)** Simultaneous evaluation of substrate-dependent oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential by TMRM and safranin in cortical mitochondria. *Biosci Rep* 36, e00286.

- Chung, S.Y. und Champagne, E.T. (2008)** Using phenolic compounds to reduce the allergenic properties of peanut extracts and peanut butter slurries. *J Allergy Clin Imm* 121, S249.
- Clardy, J. und Walsh, C. (2004)** Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829-837.
- Clark, L.C., Jr., Wolf, R., Granger, D. und Taylor, Z. (1953)** Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* 6, 189-193.
- Cocheme, H.M. und Murphy, M.P. (2008)** Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem* 283, 1786-1798.
- Colman, R.J., Beasley, T.M., Kemnitz, J.W., Johnson, S.C., Weindruch, R. und Anderson, R.M. (2014)** Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys. *Nat Commun* 5, 3557.
- Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Lott, M.T. und Wallace, D.C. (1992)** Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutat Res* 275, 169-180.
- Correa, F., Buelna-Chontal, M., Hernandez-Resendiz, S., Garcia-Nino, W.R., Roldan, F.J., Soto, V., Silva-Palacios, A., Amador, A., Pedraza-Chaverri, J., Tapia, E. und Zazueta, C. (2013)** Curcumin maintains cardiac and mitochondrial function in chronic kidney disease. *Free Radic Biol Med* 61, 119-129.
- Cortopassi, G.A. und Arnheim, N. (1990)** Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res* 18, 6927-6933.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J. und 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.
- Coutinho, E.M. (2002)** Gossypol: a contraceptive for men. *Contraception* 65, 259-263.
- Coyle, T., Levante, S., Shetler, M. und Winfield, J. (1994)** In vitro and in vivo cytotoxicity of gossypol against central nervous system tumor cell lines. *J Neurooncol* 19, 25-35.
- Crane, J.D., Devries, M.C., Safdar, A., Hamadeh, M.J. und Tarnopolsky, M.A. (2010)** The effect of aging on human skeletal muscle mitochondrial and intramyocellular lipid ultrastructure. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65, 119-128.
- Croft, K.D. (1998)** The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann N Y Acad Sci* 854, 435-442.
- Cudd, A. und Fridovich, I. (1982)** Electrostatic interactions in the reaction mechanism of bovine erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* 257, 11443-11447.
- Cuervo, A.M. (2004)** Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14, 70-77.
- Cuervo, A.M. und Dice, J.F. (2000)** Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 275, 31505-31513.
- Cuervo, A.M. und Macian, F. (2014)** Autophagy and the immune function in aging. *Curr Opin Immunol* 29, 97-104.
- Culotta, V.C., Yang, M. und 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. und 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.
- Dai, D.F., Santana, L.F., Vermulst, M., Tomazela, D.M., Emond, M.J., MacCoss, M.J., Gollahon, K., Martin, G.M., Loeb, L.A., Ladiges, W.C. und Rabinovitch, P.S. (2009)** Overexpression of catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. *Circulation* 119, 2789-2797.
- Daum, B., Walter, A., Horst, A., Osiewacz, H.D. und Kühlbrandt, W. (2013)** Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15301-15306.

- Day, A.J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M.R. und Williamson, G. (2001)** Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Radic Res* 35, 941-952.
- de Duve, C. (1983)** Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* 137, 391-397.
- Decker, E.A. (1997)** Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr Rev* 55, 396-398.
- Delay, C. (1963)** Observations inframicroscopiques sur le mycelium 'senescent' du *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci. Paris* 256, 4721-4724.
- Diefenbach, W.C. und Meneely, J.K., Jr. (1949)** Digitoxin; a critical review. *Yale J Biol Med* 21, 421-431.
- DiMauro, S. und Schon, E.A. (2003)** Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348, 2656-2668.
- DiMauro, S. und Schon, E.A. (2008)** Mitochondrial disorders in the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 31, 91-123.
- Dodge, A.D. (1971)** The mode of action of the bipyridylum herbicides, paraquat and diquat. *Endeavour* 30, 130-135.
- Dodou, K., Anderson, R.J., Small, D.A. und Groundwater, P.W. (2005)** Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opin Investig Drugs* 14, 1419-1434.
- Donati, A., Cavallini, G., Paradiso, C., Vittorini, S., Pollera, M., Gori, Z. und Bergamini, E. (2001)** Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56, B288-293.
- Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Pestana, C.R., Uyemura, S.A., Santos, A.C. und Curti, C. (2008)** Antioxidant activity of flavonoids in isolated mitochondria. *Phytother Res* 22, 1213-1218.
- Dorta, D.J., Pigoso, A.A., Mingatto, F.E., Rodrigues, T., Prado, I.M., Helena, A.F., Uyemura, S.A., Santos, A.C. und Curti, C. (2005)** The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact* 152, 67-78.
- Dreher, D. und Junod, A.F. (1995)** Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 162, 147-153.
- Dröse, S. und Brandt, U. (2008)** The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J Biol Chem* 283, 21649-21654.
- Du, L., Ge, F., Zhu, S. und Parajulee, M.N. (2004)** Effect of cotton cultivar on development and reproduction of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) and its predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae). *J Econ Entomol* 97, 1278-1283.
- Duchen, M.R. (2000)** Mitochondria and Ca²⁺ in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28, 339-348.
- Duenas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A. und Santos-Buelga, C. (2010)** Antioxidant evaluation of *O*-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *J Pharm Biomed Anal* 51, 443-449.
- Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. und Sainsard-Chanet, A. (2000)** A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4138-4143.
- Efeyan, A., Comb, W.C. und Sabatini, D.M. (2015)** Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* 517, 302-310.
- Eisenberg, T., Knauer, H., Schauer, A., Büttner, S., Ruckenstuhl, C., Carmona-Gutierrez, D., Ring, J., Schroeder, S., Magnes, C., Antonacci, L., Fussi, H., Deszcz, L., Hartl, R., Schraml, E., Criollo, A., Megalou, E., Weiskopf, D., Laun, P., Heeren, G., Breitenbach, M., Grubeck-Loebenstein, B., Herker, E., Fahrenkrog, B., Fröhlich, K.U., Sinner, F., Tavernarakis, N., Minois, N., Kroemer, G. und Madeo, F. (2009)** Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305-1314.
- El-Khoury, R., Dufour, E., Rak, M., Ramanantsoa, N., Grandchamp, N., Csaba, Z., Du villie, B., Benit, P., Gallego, J., Gressens, P., Sarkis, C., Jacobs, H.T. und Rustin, P. (2013)** Alternative oxidase expression in the

mouse enables bypassing cytochrome c oxidase blockade and limits mitochondrial ROS overproduction. *PLoS Genet* 9, e1003182.

El-Khoury, R., Kempainen, K.K., Dufour, E., Szibor, M., Jacobs, H.T. und Rustin, P. (2014) Engineering the alternative oxidase gene to better understand and counteract mitochondrial defects: state of the art and perspectives. *Br J Pharmacol* 171, 2243-2249.

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

Elmore, S.P., Qian, T., Grissom, S.F. und Lemasters, J.J. (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *FASEB J* 15, 2286-2287.

Emri, T., Molnar, Z., Pusztahelyi, T., Rosen, S. und Pocsi, I. (2004) Effect of vitamin E on autolysis and sporulation of *Aspergillus nidulans*. *Appl Biochem Biotechnol* 118, 337-348.

Emri, T., Szarvas, V., Orosz, E., Antal, K., Park, H., Han, K.H., Yu, J.H. und Pocsi, I. (2015) Core oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *BMC Genomics* 16, 478.

Ernster, L., Ikkos, D. und Luft, R. (1959) Enzymic activities of human skeletal muscle mitochondria: a tool in clinical metabolic research. *Nature* 184, 1851-1854.

Ernster, L. und Schatz, G. (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91, 227s-255s.

Esatbeyoglu, T., Huebbe, P., Ernst, I.M., Chin, D., Wagner, A.E. und Rimbach, G. (2012) Curcumin--from molecule to biological function. *Angew Chem Int Ed Engl* 51, 5308-5332.

Esclatine, A., Chaumorce, M. und Codogno, P. (2009) Macroautophagy signaling and regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* 335, 33-70.

Espagne, E., Lespinet, O., Malagnac, F., Da Silva, C., Jaillon, O., Porcel, B.M., Couloux, A., Aury, J.M., Segurens, B., Poulain, J., Anthouard, V., Grossetete, S., Khalili, H., Coppin, E., Dequard-Chablat, M., Picard, M., Contamine, V., Arnaise, S., Bourdais, A., Berteaux-Lecellier, V., Gautheret, D., de Vries, R.P., Battaglia, E., Coutinho, P.M., Danchin, E.G., Henrissat, B., Khoury, R.E., Sainsard-Chanet, A., Boivin, A., Pinan-Lucarre, B., Sellem, C.H., Debuchy, R., Wincker, P., Weissenbach, J. und Silar, P. (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol* 9, R77.

Esser, K. und Tudzynski, P. (1980) Senescence in fungi, CRC Press, Boca Raton.

Farr, S.B. und Kogoma, T. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol Rev* 55, 561-585.

Fayet, G., Jansson, M., Sternberg, D., Moslemi, A.R., Blondy, P., Lombes, A., Fardeau, M. und Oldfors, A. (2002) Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. *Neuromuscul Disord* 12, 484-493.

Fenton, H.J.H. (1984) Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J Chem Soc* 65, 899-910.

Fernandez-Ayala, D.J., Sanz, A., Vartiainen, S., Kempainen, K.K., Babusiak, M., Mustalahti, E., Costa, R., Tuomela, T., Zeviani, M., Chung, J., O'Dell, K.M., Rustin, P. und Jacobs, H.T. (2009) Expression of the *Ciona intestinalis* alternative oxidase (AOX) in *Drosophila* complements defects in mitochondrial oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 9, 449-460.

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

Finkel, D., Pedersen, N.L., Reynolds, C.A., Berg, S., de Faire, U. und Svartengren, M. (2003) Genetic and environmental influences on decline in biobehavioral markers of aging. *Behav Genet* 33, 107-123.

Finkel, T. und Holbrook, N.J. (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.

Finkel, T., Serrano, M. und Blasco, M.A. (2007) The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.

- Fischer, F., Filippis, C. und Osiewacz, H.D. (2015)** RCF1-dependent respiratory supercomplexes are integral for lifespan-maintenance in a fungal ageing model. *Sci Rep* 5, 12697.
- Fischer, F., Hamann, A. und Osiewacz, H.D. (2012)** Mitochondrial quality control: an integrated network of pathways. *Trends Biochem Sci* 37, 284-292.
- Fischer, F., Weil, A., Hamann, A. und Osiewacz, H.D. (2013)** Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal *ClpP* deletion strain. *Nat Commun* 4, 1397.
- Fleming, A. (1929)** On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* 10, 226-236.
- Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P.E., Samulski, R.J. und Wallace, D.C. (2005)** Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 12, 570-578.
- Flohe, L. und Otting, F. (1984)** Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105, 93-104.
- Fontana, L., Partridge, L. und Longo, V.D. (2010)** Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* 328, 321-326.
- Francis, B.R., White, K.H. und Thorsness, P.E. (2007)** Mutations in the Atp1p and Atp3p subunits of yeast ATP synthase differentially affect respiration and fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioenerg Biomembr* 39, 127-144.
- Freedman, T.B., Cao, X., Oliveira, R.V., Cass, Q.B. und Nafie, L.A. (2003)** Determination of the absolute configuration and solution conformation of gossypol by vibrational circular dichroism. *Chirality* 15, 196-200.
- Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M.D. und Dencher, N.A. (2010)** Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex. *Exp Gerontol* 45, 563-572.
- Gamerding, M., Hajieva, P., Kaya, A.M., Wolfrum, U., Hartl, F.U. und Behl, C. (2009)** Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J* 28, 889-901.
- Gao, F., Zhu, S.R., Sun, Y.C., Du, L., Parajulee, M., Kang, L. und Ge, F. (2008)** Interactive effects of elevated CO₂ and cotton cultivar on tri-trophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii*, and *Propylaea japonica*. *Environ Entomol* 37, 29-37.
- Gao, P., Bauvy, C., Souquere, S., Tonelli, G., Liu, L., Zhu, Y., Qiao, Z., Bakula, D., Proikas-Cezanne, T., Pierron, G., Codogno, P., Chen, Q. und Mehrpour, M. (2010)** The Bcl-2 homology domain 3 mimetic gossypol induces both Beclin 1-dependent and Beclin 1-independent cytoprotective autophagy in cancer cells. *J Biol Chem* 285, 25570-25581.
- Gaude, E. und Frezza, C. (2014)** Defects in mitochondrial metabolism and cancer. *Cancer Metab* 2, 10.
- Gautier, C.A., Kitada, T. und Shen, J. (2008)** Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 11364-11369.
- Genova, M.L. und Lenaz, G. (2013)** A critical appraisal of the role of respiratory supercomplexes in mitochondria. *Biol Chem* 394, 631-639.
- Georgiou, C.D. und Petropoulou, K.P. (2002)** The role of ascorbic acid role in the differentiation of sclerotia in *Sclerotinia minor*. *Mycopathologia* 154, 71-77.
- Getzoff, E.D., Cabelli, D.E., Fisher, C.L., Parge, H.E., Viezzoli, M.S., Banci, L. und Hallewell, R.A. (1992)** Faster superoxide dismutase mutants designed by enhancing electrostatic guidance. *Nature* 358, 347-351.
- Gilbert, N.E., O'Reilly, J.E., Chang, C.J., Lin, Y.C. und Brueggemeier, R.W. (1995)** Antiproliferative activity of gossypol and gossypolone on human breast cancer cells. *Life Sci* 57, 61-67.
- Giorgio, V., Bisetto, E., Soriano, M.E., Dabbeni-Sala, F., Basso, E., Petronilli, V., Forte, M.A., Bernardi, P. und Lippe, G. (2009)** Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem* 284, 33982-33988.
- Giorgio, V., von Stockum, S., Antoniel, M., Fabbro, A., Fogolari, F., Forte, M., Glick, G.D., Petronilli, V., Zoratti, M., Szabo, I., Lippe, G. und Bernardi, P. (2013)** Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 5887-5892.

- Gleason, J.E., Galaledeen, A., Peterson, R.L., Taylor, A.B., Holloway, S.P., Waninger-Saroni, J., Cormack, B.P., Cabelli, D.E., Hart, P.J. und 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.
- Gomes, L.C. und Scorrano, L. (2011)** Mitochondrial elongation during autophagy: a stereotypical response to survive in difficult times. *Autophagy* 7, 1251-1253.
- Gomez, L.A., Monette, J.S., Chavez, J.D., Maier, C.S. und Hagen, T.M. (2009)** Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart. *Arch Biochem Biophys* 490, 30-35.
- Gonzalez-Salazar, A., Molina-Jijon, E., Correa, F., Zarco-Marquez, G., Calderon-Oliver, M., Tapia, E., Zazueta, C. und Pedraza-Chaverri, J. (2011)** Curcumin protects from cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidant stress and mitochondrial dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 11, 357-364.
- Gorman, G.S., Elson, J.L., Newman, J., Payne, B., McFarland, R., Newton, J.L. und Turnbull, D.M. (2015)** Perceived fatigue is highly prevalent and debilitating in patients with mitochondrial disease. *Neuromuscul Disord* 25, 563-566.
- Graef, M. und Nunnari, J. (2011)** Mitochondria regulate autophagy by conserved signalling pathways. *EMBO J* 30, 2101-2114.
- Grandier-Vazeille, X., Bathany, K., Chaignepain, S., Camougrand, N., Manon, S. und Schmitter, J.M. (2001)** Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry* 40, 9758-9769.
- Grandjean, P. (2016)** Paracelsus revisited: The dose concept in a complex world. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 119, 126-132.
- Greco, M., Villani, G., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Papa, S. und Attardi, G. (2003)** Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. *FASEB J* 17, 1706-1708.
- Gredilla, R., Grief, J. und Osiewacz, H.D. (2006)** Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp Gerontol* 41, 439-447.
- Grimm, C. (2015):** Die Rolle der Superoxid-Dismutasen in Entwicklungs- und Alterungsprozessen des Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Groebe, K., Krause, F., Kunstmann, B., Unterluggauer, H., Reifschneider, N.H., Scheckhuber, C.Q., Sastri, C., Stegmann, W., Wozny, W., Schwall, G.P., Poznanovic, S., Dencher, N.A., Jansen-Dürr, P., Osiewacz, H.D. und Schratzenholz, A. (2007)** Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. *Exp Gerontol* 42, 887-898.
- Grünz, G., Haas, K., Soukup, S., Klingenspor, M., Kulling, S.E., Daniel, H. und Spanier, B. (2012)** Structural features and bioavailability of four flavonoids and their implications for lifespan-extending and antioxidant actions in *C. elegans*. *Mech Ageing Dev* 133, 1-10.
- Haber, F. und Weiss, J. (1932)** On the catalysis of hydroperoxide. *Naturwissenschaften* 20, 948 - 950.
- Hagen, T.M., Yowe, D.L., Bartholomew, J.C., Wehr, C.M., Do, K.L., Park, J.Y. und Ames, B.N. (1997)** Mitochondrial decay in hepatocytes from old rats: membrane potential declines, heterogeneity and oxidants increase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3064-3069.
- Hainbuch, S. (2016):** Untersuchungen zum Einfluss von Quercetin auf die Mitochondrienfunktion und die Alterung des Ascomyceten *Podospora anserina*. Bachelorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Halliwell, B. (2001)** Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging* 18, 685-716.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J.M. (1986)** Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501-514.
- Hamann, A., Brust, D. und Osiewacz, H.D. (2007)** Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*. *Mol Microbiol* 65, 948-958.

- Hanahan, D. und Weinberg, R.A. (2011)** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hansen, J., Corydon, T.J., Palmfeldt, J., Durr, A., Fontaine, B., Nielsen, M.N., Christensen, J.H., Gregersen, N. und Bross, P. (2008)** Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 153, 474-482.
- Harborne, J.B. (1986)** Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Prog Clin Biol Res* 213, 15-24.
- Harborne, J.B. (1999)** Recent advances in chemical ecology. *Nat Prod Rep* 16, 509-523.
- Harborne, J.B. und Williams, C.A. (2000)** Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V. und Klionsky, D.J. (1995)** Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol* 131, 591-602.
- Harman, D. (1956)** Aging: 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.
- Harper, M.E., Bevilacqua, L., Hagopian, K., Weindruch, R. und Ramsey, J.J. (2004)** Ageing, oxidative stress, and mitochondrial uncoupling. *Acta Physiol Scand* 182, 321-331.
- Harrison, D.E., Strong, R., Sharp, Z.D., Nelson, J.F., Astle, C.M., Flurkey, K., Nadon, N.L., Wilkinson, J.E., Frenkel, K., Carter, C.S., Pahor, M., Javors, M.A., Fernandez, E. und Miller, R.A. (2009)** Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature* 460, 392-395.
- Hars, E.S., Qi, H., Ryazanov, A.G., Jin, S., Cai, L., Hu, C. und Liu, L.F. (2007)** Autophagy regulates ageing in *C. elegans*. *Autophagy* 3, 93-95.
- Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M. und Torti, S.V. (2008)** Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cell Mol Life Sci* 65, 1631-1652.
- Hatefi, Y. (1985)** The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54, 1015-1069.
- Hayflick, L. (2007)** Biological aging is no longer an unsolved problem. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 1-13.
- He, R., Drury, G.E., Rotari, V.I., Gordon, A., Willer, M., Farzaneh, T., Woltering, E.J. und Gallois, P. (2008)** Metacaspase-8 modulates programmed cell death induced by ultraviolet light and H₂O₂ in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 283, 774-783.
- Heijnen, C.G., Haenen, G.R., Oostveen, R.M., Stalpers, E.M. und Bast, A. (2002)** Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res* 36, 575-581.
- Herbener, G.H. (1976)** A morphometric study of age-dependent changes in mitochondrial population of mouse liver and heart. *J Gerontol* 31, 8-12.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. und Katan, M.B. (1992)** Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the netherlands. *J Agric Food Chem* 40, 2379-2383.
- Holliday, R. (2006)** Aging is no longer an unsolved problem in biology. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 1-9.
- Holt, I.J., Cooper, J.M., Morgan-Hughes, J.A. und Harding, A.E. (1988)** Deletions of muscle mitochondrial DNA. *Lancet* 1, 1462.
- Houri, J.J., Ogier-Denis, E., De Stefanis, D., Bauvy, C., Baccino, F.M., Isidoro, C. und Codogno, P. (1995)** Differentiation-dependent autophagy controls the fate of newly synthesized N-linked glycoproteins in the colon adenocarcinoma HT-29 cell line. *Biochem J* 309 (Pt 2), 521-527.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B. und Sinclair, D.A. (2003)** Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 425, 191-196.
- Hubbard, G.P., Wolfram, S., Lovegrove, J.A. und Gibbins, J.M. (2003)** The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proc Nutr Soc* 62, 469-478.

- Hubbard, V.M., Valdor, R., Patel, B., Singh, R., Cuervo, A.M. und Macian, F. (2010)** Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *J Immunol* 185, 7349-7357.
- Hughes, A.L. und Gottschling, D.E. (2012)** An early age increase in vacuolar pH limits mitochondrial function and lifespan in yeast. *Nature* 492, 261-265.
- Huxtable, R.J. und Schwarz, S.K. (2001)** The isolation of morphine--first principles in science and ethics. *Mol Interv* 1, 189-191.
- Ibdah, M., Zhang, X.H., Schmidt, J. und Vogt, T. (2003)** A novel Mg⁽²⁺⁾-dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J Biol Chem* 278, 43961-43972.
- Isner, J.M., Baumgartner, I., Rauh, G., Schainfeld, R., Blair, R., Manor, O., Razvi, S. und Symes, J.F. (1998)** Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 28, 964-973.
- Isner, J.M., Walsh, K., Symes, J., Pieczek, A., Takeshita, S., Lowry, J., Rosenfield, K., Weir, L., Brogi, E. und Jurajj, D. (1996)** Arterial gene transfer for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Hum Gene Ther* 7, 959-988.
- Izzo, V., Bravo-San Pedro, J.M., Sica, V., Kroemer, G. und Galluzzi, L. (2016)** Mitochondrial permeability transition: New findings and persisting uncertainties. *Trends Cell Biol* 26, 655-667.
- Jacobson, J. und Duchen, M.R. (2002)** Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes-requirement for stored Ca²⁺ and sustained opening of the permeability transition pore. *J Cell Sci* 115, 1175-1188.
- Jaroszewski, J.W., Kaplan, O. und Cohen, J.S. (1990)** Action of gossypol and rhodamine 123 on wild type and multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cells: 31P nuclear magnetic resonance and toxicity studies. *Cancer Res* 50, 6936-6943.
- Jarvis, W.D., Turner, A.J., Povirk, L.F., Traylor, R.S. und Grant, S. (1994)** Induction of apoptotic DNA fragmentation and cell death in HL-60 human promyelocytic leukemia cells by pharmacological inhibitors of protein kinase C. *Cancer Res* 54, 1707-1714.
- Jendrach, M., Pohl, S., Vöth, M., Kowald, A., Hammerstein, P. und Bereiter-Hahn, J. (2005)** Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells. *Mech Ageing Dev* 126, 813-821.
- Jenkinson, E.M., Rehman, A.U., Walsh, T., Clayton-Smith, J., Lee, K., Morell, R.J., Drummond, M.C., Khan, S.N., Naeem, M.A., Rauf, B., Billington, N., Schultz, J.M., Urquhart, J.E., Lee, M.K., Berry, A., Hanley, N.A., Mehta, S., Cilliers, D., Clayton, P.E., Kingston, H., Smith, M.J., Warner, T.T., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Black, G.C., Trump, D., Davis, J.R., Ahmad, W., Leal, S.M., Riazuddin, S., King, M.C., Friedman, T.B. und Newman, W.G. (2013)** Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am J Hum Genet* 92, 605-613.
- Jeong, S.M., Kang, M.J., Choi, H.N., Kim, J.H. und Kim, J.I. (2012)** Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract* 6, 201-207.
- Jung, C., Higgins, C.M. und Xu, Z. (2000)** Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 286, 214-223.
- Kadenbach, B. (2012)** Introduction to mitochondrial oxidative phosphorylation. *Adv Exp Med Biol* 748, 1-11.
- Kakizaki, Y., Seymour, R.S. und Ito, K. (2010)** A novel functional element in the N-terminal region of *Arum concinatum* alternative oxidase is indispensable for catalytic activity of the enzyme in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta* 1797, 20-28.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. und Ohsumi, Y. (2000)** Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150, 1507-1513.
- Kampkötter, A., Timpel, C., Zurawski, R.F., Ruhl, S., Chovolou, Y., Proksch, P. und Wätjen, W. (2008)** Increase of stress resistance and lifespan of *Caenorhabditis elegans* by quercetin. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 149, 314-323.

- Kanki, T., Kang, D. und Klionsky, D.J. (2009)** Monitoring mitophagy in yeast: the Om45-GFP processing assay. *Autophagy* 5, 1186-1189.
- Karantza-Wadsworth, V. und White, E. (2007)** Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* 3, 610-613.
- Karuppagounder, S.S., Madathil, S.K., Pandey, M., Haobam, R., Rajamma, U. und Mohanakumar, K.P. (2013)** Quercetin up-regulates mitochondrial complex-I activity to protect against programmed cell death in rotenone model of Parkinson's disease in rats. *Neuroscience* 236, 136-148.
- Keyer, K., Gort, A.S. und Imlay, J.A. (1995)** Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 177, 6782-6790.
- Kim, H., Moon, J.Y., Ahn, K.S. und Cho, S.K. (2013)** Quercetin induces mitochondrial mediated apoptosis and protective autophagy in human glioblastoma U373MG cells. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 596496.
- Kirkwood, T.B. (2005)** Understanding the odd science of aging. *Cell* 120, 437-447.
- Kirkwood, T.B. (2011)** Systems biology of ageing and longevity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 64-70.
- Kirkwood, T.B. und Austad, S.N. (2000)** Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S. und Camougrand, N. (2004)** Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 39068-39074.
- Kjer, P. (1959)** Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol Suppl* 164, 1-147.
- Klionsky, D.J. (2005)** The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* 118, 7-18.
- Klionsky, D.J. (2008)** Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 4, 740-743.
- Klionsky, D.J., Baehrecke, E.H., Brumell, J.H., Chu, C.T., Codogno, P., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Elazar, Z., Eskelinen, E.L., Finkbeiner, S., Fuego-Margareto, J., Gewirtz, D., Jaattela, M., Kroemer, G., Levine, B., Melia, T.J., Mizushima, N., Rubinsztein, D.C., Simonsen, A., Thorburn, A., Thumm, M. und Tooze, S.A. (2011)** A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition). *Autophagy* 7, 1273-1294.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M. und Ohsumi, Y. (2003)** A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5, 539-545.
- Knab, B. und Osiewacz, H.D. (2010)** Methylation of polyphenols with vicinal hydroxyl groups: A protection pathway increasing organismal lifespan. *Cell Cycle* 9, 3387-3388.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliovaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T. und Aromaa, A. (2002)** Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr* 76, 560-568.
- Knuppertz, L. (2017)**: Autophagie und mitochondriale Qualitätskontrolle: Bedeutung für die Alterung des Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Knuppertz, L., Hamann, A., Pampaloni, F., Stelzer, E. und Osiewacz, H.D. (2014)** Identification of autophagy as a longevity-assurance mechanism in the aging model *Podospora anserina*. *Autophagy* 10, 822-834.
- Knuppertz, L. und Osiewacz, H.D. (2017)** Autophagy compensates impaired energy metabolism in CLXP-deficient *Podospora anserina* strains and extends healthspan. *Aging Cell* 16, 704-715.
- Knuppertz, L., Warnsmann, V., Hamann, A., Grimm, C. und Osiewacz, H.D. (2017)** Stress-dependent opposing roles for mitophagy in aging of the ascomycete *Podospora anserina*. *Autophagy* 13, 1037-1052.
- Knutson, M.D. und Leeuwenburgh, C. (2008)** Resveratrol and novel potent activators of SIRT1: effects on aging and age-related diseases. *Nutr Rev* 66, 591-596.
- Ko, C.H., Shen, S.C., Yang, L.Y., Lin, C.W. und Chen, Y.C. (2007)** Gossypol reduction of tumor growth through ROS-dependent mitochondria pathway in human colorectal carcinoma cells. *Int J Cancer* 121, 1670-1679.
- Kodydkova, J., Vavrova, L., Kocik, M. und Zak, A. (2014)** Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)* 60, 153-167.

- Koga, H., Kaushik, S. und Cuervo, A.M. (2011)** Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev* 10, 205-215.
- Koll, F., Sidoti, C., Rincheval, V. und Lecellier, G. (2001)** Mitochondrial membrane potential and ageing in *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev* 122, 205-217.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P. und Starkov, A.A. (1997)** High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416, 15-18.
- Kossel, A. (1981)** Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle, *Archiv für Physiologie*.
- Kowald, A., Hamann, A., Zintel, S., Ullrich, S., Klipp, E. und Osiewacz, H.D. (2012)** A systems biological analysis links ROS metabolism to mitochondrial protein quality control. *Mech Ageing Dev* 133, 331-337.
- Kramer, P., Jung, A.T., Hamann, A. und Osiewacz, H.D. (2016)** Cyclophilin D is involved in the regulation of autophagy and affects the lifespan of *P. anserina* in response to mitochondrial oxidative stress. *Front Genet* 7, 165.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A. und 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, F. und Seelert, H. (2008)** Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis. *Curr Protoc Protein Sci Chapter* 19, Unit 19 18.
- Krebs, H.A. (1970)** Rate control of the tricarboxylic acid cycle. *Adv Enzyme Regul* 8, 335-353.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. und Brenner, C. (2007)** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.
- Kubli, D.A., Cortez, M.Q., Moyzis, A.G., Najor, R.H., Lee, Y. und Gustafsson, A.B. (2015)** PINK1 Is Dispensable for Mitochondrial Recruitment of Parkin and Activation of Mitophagy in Cardiac Myocytes. *PLoS One* 10, e0130707.
- Kück, U., Osiewacz, H.D., Schmidt, U., Kappelhoff, B., Schulte, E., Stahl, U. und Esser, K. (1985)** The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 9, 373-382.
- Kumaran, S., Panneerselvam, K.S., Shila, S., Sivarajan, K. und Panneerselvam, C. (2005)** Age-associated deficit of mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle: role of carnitine and lipoic acid. *Mol Cell Biochem* 280, 83-89.
- Kundu, J.K. und Surh, Y.J. (2008)** Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol: mechanistic perspectives. *Cancer Lett* 269, 243-261.
- Kunstmann, B. (2009)**: Analyse differentiell-gebildeter mitochondrialer Proteine während des Alterns in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina* und Charakterisierung der O-Methyltransferase PaMTH1. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Kunstmann, B. und Osiewacz, H.D. (2008)** Over-expression of an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase leads to an extended lifespan of *Podospora anserina* without impairments in vital functions. *Aging Cell* 7, 651-662.
- Kunstmann, B. und Osiewacz, H.D. (2009)** The S-adenosylmethionine dependent O-methyltransferase PaMTH1: a longevity assurance factor protecting *Podospora anserina* against oxidative stress. *Aging (Albany NY)* 1, 328-334.
- Kurashima, K., Chae, M., Inoue, H., Hatakeyama, S. und Tanaka, S. (2013)** A *uvs-5* strain is deficient for a mitofusin gene homologue, *fzo1*, involved in maintenance of long life span in *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* 12, 233-243.
- Kuttan, R., Bhanumathy, P., Nirmala, K. und George, M.C. (1985)** Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Lett* 29, 197-202.

- Kwon, K.Y., Violett, B. und Yoo, O.J. (2011)** CCCP induces autophagy in an AMPK-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 416, 343-348.
- Lansky, E.P. und Newman, R.A. (2007)** *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *J Ethnopharmacol* 109, 177-206.
- Lapointe, J. und Hekimi, S. (2010)** When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67, 1-8.
- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J. und Hoult, J.R. (1989)** Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin. Effects on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 38, 2859-2865.
- Lee, J., Giordano, S. und Zhang, J. (2012)** Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 441, 523-540.
- Lee, K.S., Lee, B.S., Semnani, S., Avanesian, A., Um, C.Y., Jeon, H.J., Seong, K.M., Yu, K., Min, K.J. und Jafari, M. (2010)** Curcumin extends life span, improves health span, and modulates the expression of age-associated aging genes in *Drosophila melanogaster*. *Rejuvenation Res* 13, 561-570.
- Lemanska, K., van der Woude, H., Szymusiak, H., Boersma, M.G., Gliszczynska-Swiglo, A., Rietjens, I.M. und Tyrakowska, B. (2004)** The effect of catechol *O*-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and luteolin—a mechanistic insight. *Free Radic Res* 38, 639-647.
- Lenaz, G. (1998)** Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366, 53-67.
- Lenaz, G. (2001)** The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. *IUBMB Life* 52, 159-164.
- Lenaz, G., Bovina, C., Castelluccio, C., Fato, R., Formiggini, G., Genova, M.L., Marchetti, M., Pich, M.M., Pallotti, F., Parenti Castelli, G. und Biagini, G. (1997)** Mitochondrial complex I defects in aging. *Mol Cell Biochem* 174, 329-333.
- Levine, B. und Klionsky, D.J. (2004)** Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.
- Levine, B. und Kroemer, G. (2008)** Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- Levine, B. und Kroemer, G. (2009)** Autophagy in aging, disease and death: the true identity of a cell death impostor. *Cell Death Differ* 16, 1-2.
- Lian, J., Wu, X., He, F., Karnak, D., Tang, W., Meng, Y., Xiang, D., Ji, M., Lawrence, T.S. und Xu, L. (2011)** A natural BH3 mimetic induces autophagy in apoptosis-resistant prostate cancer via modulating Bcl-2-Beclin1 interaction at endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 18, 60-71.
- Liang, Q. und Zhou, B. (2007)** Copper and manganese induce yeast apoptosis via different pathways. *Mol Biol Cell* 18, 4741-4749.
- Liao, V.H., Yu, C.W., Chu, Y.J., Li, W.H., Hsieh, Y.C. und Wang, T.T. (2011)** Curcumin-mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 132, 480-487.
- Lill, R. (2009)** Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature* 460, 831-838.
- Lill, R., Hoffmann, B., Molik, S., Pierik, A.J., Rietzschel, N., Stehling, O., Uzarska, M.A., Webert, H., Wilbrecht, C. und Muhlenhoff, U. (2012)** The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823, 1491-1508.
- Lim, G.P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S.A. und Cole, G.M. (2001)** The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21, 8370-8377.
- Lin, M.T. und Beal, M.F. (2006)** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Lin, S.J., Defossez, P.A. und Guarente, L. (2000)** Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289, 2126-2128.

- Lin, S.J., Ford, E., Haigis, M., Liszt, G. und Guarente, L. (2004)** Calorie restriction extends yeast life span by lowering the level of NADH. *Genes Dev* 18, 12-16.
- Lin, T.S., Schinazi, R., Griffith, B.P., August, E.M., Eriksson, B.F., Zheng, D.K., Huang, L.A. und Prusoff, W.H. (1989)** Selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by the (-) but not the (+) enantiomer of gossypol. *Antimicrob Agents Chemother* 33, 2149-2151.
- Linseisen, J., Radtke, J. und Wolfram, G. (1997)** [Flavonoid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey]. *Z Ernährungswiss* 36, 403-412.
- Liu, B.S. (1957)** A tentative idea of the use of cooking cottonseed oil for fertility control. *Shanghai J Chin Med* 6, 43-47.
- Liu, G.Z. und Lyle, K.C. (1987)** Clinical trial of gossypol as a male contraceptive drug. Part II. Hypokalemia study. *Fertil Steril* 48, 462-465.
- Liu, G.Z., Lyle, K.C. und Cao, J. (1987)** Clinical trial of gossypol as a male contraceptive drug. Part I. Efficacy study. *Fertil Steril* 48, 459-461.
- Liu, Z.Q., Liu, G.Z., Hei, L.S., Zhang, R.A. und Yu, C.Z. (1981)** Clinical trial of gossypol as a male antifertility agent. See Ref 15, 160-163.
- Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Iotti, S., Clementi, V., Malucelli, E., Barboni, P., Longanesi, L., Schimpf, S., Wissinger, B., Baruzzi, A., Barbiroli, B. und Carelli, V. (2004)** Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* 56, 719-723.
- Longmore, J. (1986)** Cotton seed oil: Its colouring matter and mucilage, and description of a new method of recovering the loss occurring in the refining process. *J Chem Ind* 5, 200-206.
- López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. und Kroemer, G. (2013)** The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.
- López-Otín, C., Galluzzi, L., Freije, J.M.P., Madeo, F. und Kroemer, G. (2016)** Metabolic Control of Longevity. *Cell* 166, 802-821.
- Luce, K., Weil, A.C. und Osiewacz, H.D. (2010)** Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. *Adv Exp Med Biol* 694, 108-125.
- Madeo, F., Eisenberg, T., Büttner, S., Ruckenstuhl, C. und Kroemer, G. (2010)** Spermidine: a novel autophagy inducer and longevity elixir. *Autophagy* 6, 160-162.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. und Fröhlich, K.U. (1999)** Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 145, 757-767.
- Madeo, F., Zimmermann, A., Maiuri, M.C. und Kroemer, G. (2015)** Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest* 125, 85-93.
- Makrides, S.C. (1983)** Protein synthesis and degradation during aging and senescence. *Biol Rev Camb Philos Soc* 58, 343-422.
- Manach, C., Morand, C., Crespy, V., Demigne, C., Texier, O., Regeat, F. und Remesy, C. (1998)** Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. *FEBS Lett* 426, 331-336.
- Manach, C., Texier, O., Morand, C., Crespy, V., Regeat, F., Demigne, C. und Remesy, C. (1999)** Comparison of the bioavailability of quercetin and catechin in rats. *Free Radic Biol Med* 27, 1259-1266.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. und Rémésy, C. (2005)** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 81, 230S-242S.
- Manczak, M., Jung, Y., Park, B.S., Partovi, D. und Reddy, P.H. (2005)** Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem* 92, 494-504.

- Mandelli, F., Yamashita, F., Pereira, J.L. und 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.
- Mani, J., Vallo, S., Rakel, S., Antonietti, P., Gessler, F., Blaheta, R., Bartsch, G., Michaelis, M., Cinatl, J., Haferkamp, A. und Kögel, D. (2015)** Chemoresistance is associated with increased cytoprotective autophagy and diminished apoptosis in bladder cancer cells treated with the BH3 mimetic (-)-Gossypol (AT-101). *BMC Cancer* 15, 224.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A.I., Lenaz, G. und Genova, M.L. (2013)** Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid Redox Signal* 19, 1469-1480.
- Marcou, D. und Schecroun, J. (1959)** La senescence chez *Podospora* pourrait être due à des particules cytoplasmiques infectantes. *Compte rendue des l'Academie des sciences* 248, 280-283.
- Marcour, D. (1961)** Notion de longévité et nature cytoplasmatique du déterminant de sénescence chez quelques champignons. *Ann Sci Biol Bot Veg* 12, 653-764.
- Margulis, L. (1975)** Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol*, 21-38.
- Martinez-Morua, A., Soto-Urquieta, M.G., Franco-Robles, E., Zuniga-Trujillo, I., Campos-Cervantes, A., Perez-Vazquez, V. und Ramirez-Emiliano, J. (2013)** Curcumin decreases oxidative stress in mitochondria isolated from liver and kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *J Asian Nat Prod Res* 15, 905-915.
- Matecic, M., Smith, D.L., Pan, X., Maqani, N., Bekiranov, S., Boeke, J.D. und Smith, J.S. (2010)** A microarray-based genetic screen for yeast chronological aging factors. *PLoS Genet* 6, e1000921.
- McInnes, J. (2013)** Mitochondrial-associated metabolic disorders: foundations, pathologies and recent progress. *Nutr Metab (Lond)* 10, 63.
- McQuibban, G.A., Lee, J.R., Zheng, L., Juusola, M. und Freeman, M. (2006)** Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function. *Curr Biol* 16, 982-989.
- Medvedev, Z.A. (1990)** An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc* 65, 375-398.
- Meijer, A.J. und Codogno, P. (2004)** Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2445-2462.
- Meilhac, O., Zhou, M., Santanam, N. und Parthasarathy, S. (2000)** Lipid peroxides induce expression of catalase in cultured vascular cells. *J Lipid Res* 41, 1205-1213.
- Meiling-Wesse, K., Barth, H. und Thumm, M. (2002)** Ccz1p/Aut11p/Cvt16p is essential for autophagy and the cvt pathway. *FEBS Lett* 526, 71-76.
- Melendez, A., Tallozy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H. und Levine, B. (2003)** Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387-1391.
- 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. und Wallace, D.C. (1999)** Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 846-851.
- Melov, S., Ravenscroft, J., Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R. und Lithgow, G.J. (2000)** Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289, 1567-1569.
- Meng, G.D., Zhu, J.C., Chen, Z.W., Wong, L.T., Zhang, G.Y., Hu, Y.Z., Ding, J.H., Wang, X.H., Qian, S.Z., Wang, C. und et al. (1988)** Recovery of sperm production following the cessation of gossypol treatment: a two-centre study in China. *Int J Androl* 11, 1-11.
- Meng, Y., Tang, W., Dai, Y., Wu, X., Liu, M., Ji, Q., Ji, M., Pienta, K., Lawrence, T. und Xu, L. (2008)** Natural BH3 mimetic (-)-gossypol chemosensitizes human prostate cancer via Bcl-xL inhibition accompanied by increase of Puma and Noxa. *Mol Cancer Ther* 7, 2192-2202.

- Mesquita, A., Weinberger, M., Silva, A., Sampaio-Marques, B., Almeida, B., Leao, C., Costa, V., Rodrigues, F., Burhans, W.C. und Ludovico, P. (2010)** Caloric restriction or catalase inactivation extends yeast chronological lifespan by inducing H₂O₂ and superoxide dismutase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 15123-15128.
- Metodiewa, D., Jaiswal, A.K., Cenas, N., Dickançaité, E. und Segura-Aguilar, J. (1999)** Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med* 26, 107-116.
- Meyer, N. (2015):** Investigating the role of mitochondrial dysfunction and mitophagy in cell death induced with the BH3 mimetic (-)-Gossypol. Masterarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Meyer, N., Linder, B., Zielke, S., Warnsmann, V., Rakel, S., Osiewacz, H.D., Fulda, S., Mittelbronn, M., Behrends, C. und Kögel, D. (zur Publikation angenommen)** AT-101 induces early mitochondrial dysfunction and heme oxygenase-1 to trigger mitophagic cell death in glioma cells. *Autophagy*.
- Millimouno, F.M., Dong, J., Yang, L., Li, J. und Li, X. (2014)** Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. *Cancer Prev Res (Phila)* 7, 1081-1107.
- Mitchell, P. (1961)** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mitchell, P. und Moyle, J. (1968)** Proton translocation coupled to ATP hydrolysis in rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 4, 530-539.
- Mizushima, N. (2007)** Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21, 2861-2873.
- Mizushima, N. (2010)** The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22, 132-139.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M. und Klionsky, D.J. (2008)** Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- Molina-Jijon, E., Tapia, E., Zazueta, C., El Hafidi, M., Zatarain-Barron, Z.L., Hernandez-Pando, R., Medina-Campos, O.N., Zarco-Marquez, G., Torres, I. und Pedraza-Chaverri, J. (2011)** Curcumin prevents Cr(VI)-induced renal oxidant damage by a mitochondrial pathway. *Free Radic Biol Med* 51, 1543-1557.
- Monroy, A., Lithgow, G.J. und Alavez, S. (2013)** Curcumin and neurodegenerative diseases. *Biofactors* 39, 122-132.
- Morand, C., Crespy, V., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. und Remesy, C. (1998)** Plasma metabolites of quercetin and their antioxidant properties. *Am J Physiol* 275, R212-219.
- Morel, I., Lescoat, G., Cillard, P. und Cillard, J. (1994)** Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol* 234, 437-443.
- Morselli, E., Maiuri, M.C., Markaki, M., Megalou, E., Pasparaki, A., Palikaras, K., Criollo, A., Galluzzi, L., Malik, S.A., Vitale, I., Michaud, M., Madeo, F., Tavernarakis, N. und Kroemer, G. (2010)** Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis* 1, e10.
- Moskalev, E.A., Luckert, K., Vorobjev, I.A., Mastitsky, S.E., Gladkikh, A.A., Stephan, A., Schrenk, M., Kaplanov, K.D., Kalashnikova, O.B., Potz, O., Joos, T.O. und Hoheisel, J.D. (2012)** Concurrent epigenetic silencing of wnt/beta-catenin pathway inhibitor genes in B cell chronic lymphocytic leukaemia. *BMC Cancer* 12, 213.
- Müller, B. und Grossniklaus, U. (2010)** Model organisms--A historical perspective. *J Proteomics* 73, 2054-2063.
- Muller, F.L., Liu, Y. und Van Remmen, H. (2004)** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279, 49064-49073.
- Müller, W.E., Eckert, A., Kurz, C., Eckert, G.P. und Leuner, K. (2010)** Mitochondrial dysfunction: common final pathway in brain aging and Alzheimer's disease--therapeutic aspects. *Mol Neurobiol* 41, 159-171.

- Munkres, K.D. (1990)** Histochemical detection of superoxide radicals and hydrogen peroxide by Age-1 mutants of *Neurospora*. *Fungal Genet Newsl* 37, 24-25.
- Murphy, M.P. (2009)** How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T. und Tsujimoto, Y. (2005)** Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F. und Youle, R.J. (2008)** Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183, 795-803.
- Navarro, A. und Boveris, A. (2007)** The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C670-686.
- Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L. und Sakariah, K.K. (1999)** Antibacterial activity of turmeric oil: a byproduct from curcumin manufacture. *J Agric Food Chem* 47, 4297-4300.
- Neuspiel, M., Schauss, A.C., Braschi, E., Zunino, R., Rippstein, P., Rachubinski, R.A., Andrade-Navarro, M.A. und McBride, H.M. (2008)** Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Curr Biol* 18, 102-108.
- Nguyen, T.T., Stevens, M.V., Kohr, M., Steenbergen, C., Sack, M.N. und Murphy, E. (2011)** Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem* 286, 40184-40192.
- Niccoli, T. und Partridge, L. (2012)** Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* 22, R741-752.
- Nicholls, D.G., Bernson, V.S. und Heaton, G.M. (1978)** The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* 32, 89-93.
- Niklas, J., Nonnenmacher, Y., Rose, T., Sandig, V. und Heinze, E. (2012)** Quercetin treatment changes fluxes in the primary metabolism and increases culture longevity and recombinant alpha(1)-antitrypsin production in human AGE1.HN cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 94, 57-67.
- Nishio, K. und Ma, Q. (2016)** Effect of overproduction of mitochondrial uncoupling protein 2 on Cos7 cells: Induction of senescent-like morphology and oncotic cell death. *Curr Aging Sci* 9, 229-238.
- Nowikovsky, K., Reipert, S., Devenish, R.J. und Schweyen, R.J. (2007)** Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* 14, 1647-1656.
- Ocampo, A., Liu, J., Schroeder, E.A., Shadel, G.S. und Barrientos, A. (2012)** Mitochondrial respiratory thresholds regulate yeast chronological life span and its extension by caloric restriction. *Cell Metab* 16, 55-67.
- Ojaimi, J., Masters, C.L., Opeskin, K., McKelvie, P. und Byrne, E. (1999)** Mitochondrial respiratory chain activity in the human brain as a function of age. *Mech Ageing Dev* 111, 39-47.
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N. und Ohsumi, Y. (2009)** Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* 17, 87-97.
- Olanow, C.W. (1992)** An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32 Suppl, S2-9.
- Oppenheimer, A. (1937)** Narrowing of the intervertebral foramina as a cause of pseudorheumatic pain. *Ann Surg* 106, 428-440.
- Orr, W.C. und Sohal, R.S. (1994)** Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 263, 1128-1130.
- Osiewacz, H.D. (2002)** Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev* 123, 755-764.

- Osiewacz, H.D., Brust, D., Hamann, A., Kunstmann, B., Luce, K., Müller-Ohldach, M., Scheckhuber, C.Q., Servos, J. und Strobel, I. (2010)** Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* 1197, 54-66.
- Osiewacz, H.D. und Esser, K. (1984)** The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr Genet* 8, 299-305.
- Osiewacz, H.D., Hamann, A. und Zintel, S. (2013)** Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Methods Mol Biol* 965, 439-462.
- Palikaras, K., Lionaki, E. und Tavernarakis, N. (2015)** Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 521, 525-528.
- Palma, E., Tiepolo, T., Angelin, A., Sabatelli, P., Maraldi, N.M., Basso, E., Forte, M.A., Bernardi, P. und Bonaldo, P. (2009)** Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice. *Hum Mol Genet* 18, 2024-2031.
- Pandey, K.B. und Rizvi, S.I. (2009)** Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev* 2, 270-278.
- Parajuli, N. und MacMillan-Crow, L.A. (2013)** Role of reduced manganese superoxide dismutase in ischemia-reperfusion injury: a possible trigger for autophagy and mitochondrial biogenesis? *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F257-267.
- Park, C.B. und Larsson, N.G. (2011)** Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *J Cell Biol* 193, 809-818.
- Peralta, S., Torraco, A., Iommarini, L. und Diaz, F. (2015)** Mitochondrial Diseases Part III: Therapeutic interventions in mouse models of OXPHOS deficiencies. *Mitochondrion* 23, 71-80.
- Perdomini, M., Belbellaa, B., Monassier, L., Reutenauer, L., Messaddeq, N., Cartier, N., Crystal, R.G., Aubourg, P. und Puccio, H. (2014)** Prevention and reversal of severe mitochondrial cardiomyopathy by gene therapy in a mouse model of Friedreich's ataxia. *Nat Med* 20, 542-547.
- Perez, V.I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C.J., Vijg, J. und Richardson, A. (2009)** The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* 8, 73-75.
- Perron, N.R. und Brumaghim, J.L. (2009)** A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys* 53, 75-100.
- Phillips, J.P., Campbell, S.D., Michaud, D., Charbonneau, M. und Hilliker, A.J. (1989)** Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2761-2765.
- Pietsch, K., Saul, N., Menzel, R., Stürzenbaum, S.R. und Steinberg, C.E. (2009)** Quercetin mediated lifespan extension in *Caenorhabditis elegans* is modulated by age-1, daf-2, sek-1 and unc-43. *Biogerontology* 10, 565-578.
- Pietsch, K., Saul, N., Swain, S.C., Menzel, R., Steinberg, C.E. und Stürzenbaum, S.R. (2012)** Meta-analysis of global transcriptomics suggests that conserved genetic pathways are responsible for quercetin and tannic acid mediated longevity in *C. elegans*. *Front Genet* 3, 48.
- Piko, L., Hougham, A.J. und Bulpitt, K.J. (1988)** Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging. *Mech Ageing Dev* 43, 279-293.
- Pollack, J.K., Harris, S.D. und Marten, M.R. (2009)** Autophagy in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 46, 1-8.
- Powell, C.S. und Jackson, R.M. (2003)** Mitochondrial complex I, aconitase, and succinate dehydrogenase during hypoxia-reoxygenation: modulation of enzyme activities by MnSOD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L189-198.
- Powers, E.T., Morimoto, R.I., Dillin, A., Kelly, J.W. und Balch, W.E. (2009)** Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* 78, 959-991.

- Pozniakovsky, A.I., Knorre, D.A., Markova, O.V., Hyman, A.A., Skulachev, V.P. und Severin, F.F. (2005)** Role of mitochondria in the pheromone- and amiodarone-induced programmed death of yeast. *J Cell Biol* 168, 257-269.
- Preston, C.C., Oberlin, A.S., Holmuhamedov, E.L., Gupta, A., Sagar, S., Syed, R.H., Siddiqui, S.A., Raghavakaimal, S., Terzic, A. und Jahangir, A. (2008)** Aging-induced alterations in gene transcripts and functional activity of mitochondrial oxidative phosphorylation complexes in the heart. *Mech Ageing Dev* 129, 304-312.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J.P. und Martinou, J.C. (2005)** Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ* 12, 1613-1621.
- Pyo, J.O., Yoo, S.M. und Jung, Y.K. (2013)** The interplay between autophagy and aging. *Diabetes Metab J* 37, 333-339.
- Qian, S.Z. und Wang, Z.G. (1984)** Gossypol: a potential antifertility agent for males. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24, 329-360.
- Queen, B.L. und Tollefsbol, T.O. (2010)** Polyphenols and aging. *Curr Aging Sci* 3, 34-42.
- Quintana, A., Zanella, S., Koch, H., Kruse, S.E., Lee, D., Ramirez, J.M. und Palmiter, R.D. (2012)** Fatal breathing dysfunction in a mouse model of Leigh syndrome. *J Clin Invest* 122, 2359-2368.
- Radloff, R.J., Deck, L.M., Royer, R.E. und Vander Jagt, D.L. (1986)** Antiviral activities of gossypol and its derivatives against herpes simplex virus type II. *Pharmacol Res Commun* 18, 1063-1073.
- Rampello, N.G., Stenger, M., Westermann, B. und Osiewacz, H.D. (2018)** Impact of F₁F_o-ATP-synthase dimer assembly factors on mitochondrial function and organismic aging. *Microb Cell*.
- Reczek, C.R. und Chandel, N.S. (2015)** ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 33, 8-13.
- Reddy, P.H. und Reddy, T.P. (2011)** Mitochondria as a therapeutic target for aging and neurodegenerative diseases. *Curr Alzheimer Res* 8, 393-409.
- Reyes, J. und Benos, D.J. (1988)** Specificity of gossypol uncoupling: a comparative study of liver and spermatogenic cells. *Am J Physiol* 254, C571-576.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. und Paganga, G. (1996)** Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Richards, T.A. und Archibald, J.M. (2011)** Cell evolution: gene transfer agents and the origin of mitochondria. *Curr Biol* 21, R112-114.
- Richardson, J.S. (1993)** Free radicals in the genesis of Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 695, 73-76.
- Richter, C. (1995)** Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 27, 647-653.
- Riera, C.E. und Dillin, A. (2015)** Tipping the metabolic scales towards increased longevity in mammals. *Nat Cell Biol* 17, 196-203.
- Rizet, G. (1953)** [Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospora anserina*]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 237, 838-840.
- Robaszekiewicz, A., Balcerczyk, A. und Bartosz, G. (2007)** Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int* 31, 1245-1250.
- Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R.T. und Lemasters, J.J. (2006)** Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* 2, 39-46.
- Rodriguez-Urra, A.B., Jimenez, C., Nieto, M.I., Rodriguez, J., Hayashi, H. und Ugalde, U. (2012)** Signaling the induction of sporulation involves the interaction of two secondary metabolites in *Aspergillus nidulans*. *ACS Chem Biol* 7, 599-606.
- Rogers, S. und Pfuderer, P. (1968)** Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature* 219, 749-751.

- Rubinsztein, D.C., Marino, G. und Kroemer, G. (2011)** Autophagy and aging. *Cell* 146, 682-695.
- Ruiz, L.M., Salazar, C., Jensen, E., Ruiz, P.A., Tiznado, W., Quintanilla, R.A., Barreto, M. und Elorza, A.A. (2015)** Quercetin affects erythropoiesis and heart mitochondrial function in mice. *Oxid Med Cell Longev* 2015, 836301.
- Sablina, A.A., Budanov, A.V., Ilyinskaya, G.V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E. und Chumakov, P.M. (2005)** The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 11, 1306-1313.
- Sagar, G.R. (1987)** Uses and usefulness of paraquat. *Hum Toxicol* 6, 7-11.
- Sak, K. (2014)** Site-specific anticancer effects of dietary flavonoid quercetin. *Nutr Cancer* 66, 177-193.
- Salvioli, S., Sikora, E., Cooper, E.L. und Franceschi, C. (2007)** Curcumin in cell death processes: a challenge for CAM of age-related pathologies. *Evid Based Complement Alternat Med* 4, 181-190.
- Saraste, M. (1999)** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488-1493.
- Sastre, J., Pallardo, F.V., Pla, R., Pellin, A., Juan, G., O'Connor, J.E., Estrela, J.M., Miquel, J. und Vina, J. (1996)** Aging of the liver: age-associated mitochondrial damage in intact hepatocytes. *Hepatology* 24, 1199-1205.
- Satoskar, R.R., Shah, S.J. und Shenoy, S.G. (1986)** Evaluation of anti-inflammatory property of curcumin (diferuloyl methane) in patients with postoperative inflammation. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 24, 651-654.
- Saul, N., Pietsch, K., Menzel, R. und Steinberg, C.E. (2008)** Quercetin-mediated longevity in *Caenorhabditis elegans*: is DAF-16 involved? *Mech Ageing Dev* 129, 611-613.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. und Jimenez, L. (2005)** Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 45, 287-306.
- Scandalios, J.G. (2005)** Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz J Med Biol Res* 38, 995-1014.
- Schägger, H., Cramer, W.A. und 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. und Pfeiffer, K. (2000)** Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777-1783.
- Schägger, H. und 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. und 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.
- Scheckhuber, C.Q., Wanger, R.A., Mignat, C.A. und Osiewacz, H.D. (2011)** Unopposed mitochondrial fission leads to severe lifespan shortening. *Cell Cycle* 10, 3105-3110.
- Scherz-Shouval, R. und Elazar, Z. (2007)** ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 17, 422-427.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. und Elazar, Z. (2007)** Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 26, 1749-1760.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A. und Korsmeyer, S.J. (2005)** Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12005-12010.
- Schmidt, O., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2010)** Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 655-667.
- Schriner, S.E., Linford, N.J., Martin, G.M., Treuting, P., Ogburn, C.E., Emond, M., Coskun, P.E., Ladiges, W., Wolf, N., Van Remmen, H., Wallace, D.C. und Rabinovitch, P.S. (2005)** Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-1911.

- Schulte, E., Kück, U. und Esser, K. (1988)** Extrachromosomal mutants from *Podospora anserina*: Permanent vegetative growth in spite of multiple recombination events in the mitochondrial genome. *Mal Gen Genet* 211, 342-349.
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M. und Ristow, M. (2007)** Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6, 280-293.
- Scott, S.V., Hefner-Gravink, A., Morano, K.A., Noda, T., Ohsumi, Y. und Klionsky, D.J. (1996)** Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12304-12308.
- Scotter, M.J. (2011)** Methods for the determination of European Union-permitted added natural colours in foods: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28, 527-596.
- Selkirk, S.M. (2004)** Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J* 80, 560-570.
- Semchyshyn, H.M. und Valishkevych, B.V. (2016)** Hormetic effect of H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae*: Involvement of TOR and glutathione reductase. *Dose Response* 14, 1559325816636130.
- Semsei, I. (2000)** On the nature of aging. *Mech Ageing Dev* 117, 93-108.
- Sharma, O.P. (1976)** Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochem Pharmacol* 25, 1811-1812.
- Shen, L.R., Parnell, L.D., Ordovas, J.M. und Lai, C.Q. (2013b)** Curcumin and aging. *Biofactors* 39, 133-140.
- Shen, L.R., Xiao, F., Yuan, P., Chen, Y., Gao, Q.K., Parnell, L.D., Meydani, M., Ordovas, J.M., Li, D. und Lai, C.Q. (2013a)** Curcumin-supplemented diets increase superoxide dismutase activity and mean lifespan in *Drosophila*. *Age (Dordr)* 35, 1133-1142.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. und Ames, B.N. (1994)** Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10771-10778.
- Shirasawa, T., Endoh, R., Zeng, Y.X., Sakamoto, K. und Mori, H. (1995)** Protein L-isoaspartyl methyltransferase: developmentally regulated gene expression and protein localization in the central nervous system of aged rat. *Neurosci Lett* 188, 37-40.
- Short, K.R., Bigelow, M.L., Kahl, J., Singh, R., Coenen-Schimke, J., Raghavakaimal, S. und Nair, K.S. (2005)** Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5618-5623.
- Shureiqi, I. und Baron, J.A. (2011)** Curcumin chemoprevention: the long road to clinical translation. *Cancer Prev Res (Phila)* 4, 296-298.
- Sidhu, G.S., Singh, A.K., Thaloor, D., Banaudha, K.K., Patnaik, G.K., Srimal, R.C. und Maheshwari, R.K. (1998)** Enhancement of wound healing by curcumin in animals. *Wound Repair Regen* 6, 167-177.
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A. und Mosieniak, G. (2014)** Cellular senescence in ageing, age-related disease and longevity. *Curr Vasc Pharmacol* 12, 698-706.
- Sikora, E., Bielak-Zmijewska, A., Mosieniak, G. und Piwocka, K. (2010)** The promise of slow down ageing may come from curcumin. *Curr Pharm Des* 16, 884-892.
- Simonsen, A., Cumming, R.C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D.R. und Finley, K.D. (2008)** Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy* 4, 176-184.
- Singh, R., Akhtar, N. und Haqqi, T.M. (2010)** Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate: inflammation and arthritis. [corrected]. *Life Sci* 86, 907-918.
- Smith, R.A., Hartley, R.C., Cocheme, H.M. und Murphy, M.P. (2012)** Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 33, 341-352.
- Sneider, W. (2000)** The discovery of aspirin: a reappraisal. *BMJ* 321, 1591-1594.

- Soh, J.W., Marowsky, N., Nichols, T.J., Rahman, A.M., Miah, T., Sarao, P., Khasawneh, R., Unnikrishnan, A., Heydari, A.R., Silver, R.B. und Arking, R. (2013)** Curcumin is an early-acting stage-specific inducer of extended functional longevity in *Drosophila*. *Exp Gerontol* 48, 229-239.
- Soubannier, V., McLelland, G.L., Zunino, R., Braschi, E., Rippstein, P., Fon, E.A. und McBride, H.M. (2012a)** A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr Biol* 22, 135-141.
- Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B.A., Shoubridge, E.A. und McBride, H.M. (2012b)** Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS One* 7, e52830.
- Southam, C.M. und Ehrlich, J. (1943)** Effects of extracts of western redcedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology* 33, 517-524.
- Srimal, R.C. und Dhawan, B.N. (1973)** Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent. *J Pharm Pharmacol* 25, 447-452.
- Stahl, U., Lemke, P.A., Tudzynski, P., Kück, U. und Esser, K. (1978)** Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 162, 341-343.
- Stebbing, A.R. (1982)** Hormesis--the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22, 213-234.
- Stipanovic, R.D., Puckhaber, L.S. und Bell, A.A. (2006)** Ratios of (+)- and (-)-gossypol in leaves, stems, and roots of selected accessions of *Gossypium hirsutum* var. marie galante (Watt) Hutchinson. *J Agric Food Chem* 54, 1633-1637.
- Stocco, D.M., Cascarano, J. und Wilson, M.A. (1977)** Quantitation of mitochondrial DNA, RNA, and protein in starved and starved-refed rat liver. *J Cell Physiol* 90, 295-306.
- Stocco, D.M. und Hutson, J.C. (1978)** Quantitation of mitochondrial DNA and protein in the liver of Fischer 344 rats during aging. *J Gerontol* 33, 802-809.
- Stumpferl, S.W., Stephan, O. und 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.
- Suckow, B.K. und Suckow, M.A. (2006)** Lifespan extension by the antioxidant curcumin in *Drosophila melanogaster*. *Int J Biomed Sci* 2, 402-405.
- Suhai, T., Heidrich, N.G., Dencher, N.A. und Seelert, H. (2009)** Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels. *Electrophoresis* 30, 3622-3625.
- Suliman, H.B. und Piantadosi, C.A. (2016)** Mitochondrial quality control as a therapeutic target. *Pharmacol Rev* 68, 20-48.
- Surco-Laos, F., Cabello, J., Gómez-Orte, E., González-Manzano, S., Gonzalez-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C. und Dueñas, M. (2011)** Effects of *O*-methylated metabolites of quercetin on oxidative stress, thermotolerance, lifespan and bioavailability on *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct* 2, 445-456.
- Surco-Laos, F., Dueñas, M., González-Manzano, S., Cabello, J., Santos-Buelga, C. und González-Paramás, A.M. (2012)** Influence of catechins and their methylated metabolites on lifespan and resistance to oxidative and thermal stress of *Caenorhabditis elegans* and epicatechin uptake. *Food Res Int* 46.
- Suthamarak, W., Somerlot, B.H., Opheim, E., Sedensky, M. und Morgan, P.G. (2013)** Novel interactions between mitochondrial superoxide dismutases and the electron transport chain. *Aging Cell* 12, 1132-1140.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T. und Ohsumi, Y. (2001)** The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20, 5971-5981.
- Symersky, J., Osowski, D., Walters, D.E. und Mueller, D.M. (2012)** Oligomycin frames a common drug-binding site in the ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13961-13965.
- Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J. und Rizzuto, R. (2004)** Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16, 59-68.

- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. und Ohsumi, Y. (1992)** Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301-311.
- Talens, R.P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H.E., Slagboom, P.E., Boomsma, D.I. und Heijmans, B.T. (2012)** Epigenetic variation during the adult lifespan: cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell* 11, 694-703.
- Tang, A.H. und Rando, T.A. (2014)** Induction of autophagy supports the bioenergetic demands of quiescent muscle stem cell activation. *EMBO J* 33, 2782-2797.
- Tauchi, H. und Sato, T. (1968)** Age changes in size and number of mitochondria of human hepatic cells. *J Gerontol* 23, 454-461.
- Taylor, S.E. und al-Hashimi, I. (1996)** Pilocarpine, an old drug; a new formulation. *Tex Dent J* 113, 9-13.
- Thomas, M., von Hagen, V., Moustafa, Y., Montmasson, M.P. und Monet, J.D. (1991)** Effects of gossypol on the cell cycle phases in T-47D human breast cancer cells. *Anticancer Res* 11, 1469-1475.
- Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M. und Wolf, D.H. (1994)** Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 349, 275-280.
- Timiras, P.S. (1975)** Aging of homeostatic control systems. Introductory remarks. *Fed Proc* 34, 81-82.
- Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H. und Takino, Y. (1985)** Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33, 1725-1728.
- Toth, M.L., Sigmond, T., Borsos, E., Barna, J., Erdelyi, P., Takacs-Vellai, K., Orosz, L., Kovacs, A.L., Csikos, G., Sass, M. und Vellai, T. (2008)** Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* 4, 330-338.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J. und Hiai, H. (1995)** Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358, 1-3.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. und Larsson, N.G. (2004)** Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Trujillo, J., Granados-Castro, L.F., Zazueta, C., Anderica-Romero, A.C., Chirino, Y.I. und Pedraza-Chaverri, J. (2014)** Mitochondria as a target in the therapeutic properties of curcumin. *Arch Pharm (Weinheim)* 347, 873-884.
- Tsang, V.C., Peralta, J.M. und Simons, A.R. (1983)** Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 92, 377-391.
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zavialov, A., Lam, E. und Bozhkov, P.V. (2011)** Metacaspases. *Cell Death Differ* 18, 1279-1288.
- Tso, W.W. (1984)** Gossypol inhibits Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *Cancer Lett* 24, 257-261.
- Tsukada, M. und Ohsumi, Y. (1993)** Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333, 169-174.
- Tudzynski, P. und Esser, K. (1977)** Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 153, 111-113.
- Tunbridge, E.M., Weickert, C.S., Kleinman, J.E., Herman, M.M., Chen, J., Kolachana, B.S., Harrison, P.J. und Weinberger, D.R. (2007)** Catechol-o-methyltransferase enzyme activity and protein expression in human prefrontal cortex across the postnatal lifespan. *Cereb Cortex* 17, 1206-1212.
- Turrens, J.F. (1997)** Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8.
- Turrens, J.F. (2003)** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Turrens, J.F. und Boveris, A. (1980)** Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.

- Tuszynski, G.P. und Cossu, G. (1984)** Differential cytotoxic effect of gossypol on human melanoma, colon carcinoma, and other tissue culture cell lines. *Cancer Res* 44, 768-771.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., Alroy, J., Wu, M., Py, B.F., Yuan, J., Deeney, J.T., Corkey, B.E. und Shirihai, O.S. (2008)** Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27, 433-446.
- Unlu, E.S. und Koc, A. (2007)** Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Ann N Y Acad Sci* 1100, 505-509.
- Unterhalt, B. (1980)** [Natural substances with N-O-binding in pharmacy]. *Pharm Unserer Zeit* 9, 114-125.
- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V. und Dixit, V.M. (2000)** Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* 6, 961-967.
- Vadehre, D.V., Kalla, N.R., Saxena, M., Hashia, R., Kaur, P. und Gupta, L.K. (1985)** Antimicrobial activity of gossypol acetic acid. *IRCS Medical Science* 13, 10-11.
- Vafai, S.B. und Mootha, V.K. (2012)** Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374-383.
- Van Bergen, N.J., Crowston, J.G., Kearns, L.S., Staffieri, S.E., Hewitt, A.W., Cohn, A.C., Mackey, D.A. und Trounce, I.A. (2011)** Mitochondrial oxidative phosphorylation compensation may preserve vision in patients with OPA1-linked autosomal dominant optic atrophy. *PLoS One* 6, e21347.
- van Deursen, J.M. (2014)** The role of senescent cells in ageing. *Nature* 509, 439-446.
- Vanneste, J. und van den Bosch de Aguilar, P. (1981)** Mitochondrial alterations in the spinal ganglion neurons in ageing rats. *Acta Neuropathol* 54, 83-87.
- Veal, E. und Day, A. (2011)** Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15, 147-151.
- Vijg, J. und Campisi, J. (2008)** Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature* 454, 1065-1071.
- Viswanath, V., Urooj, A. und Malleshi, N.G. (2009)** Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of finger millet polyphenols (*Eleusine coracana*). *Food Chemistry* 114, 340-346.
- Voss, V., Senft, C., Lang, V., Ronellenfitsch, M.W., Steinbach, J.P., Seifert, V. und Kögel, D. (2010)** The pan-Bcl-2 inhibitor (-)-gossypol triggers autophagic cell death in malignant glioma. *Mol Cancer Res* 8, 1002-1016.
- Votruba, M., Thiselton, D. und Bhattacharya, S.S. (2003)** Optic disc morphology of patients with OPA1 autosomal dominant optic atrophy. *Br J Ophthalmol* 87, 48-53.
- Wallace, D.C. (2001)** A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp* 235, 247-263; discussion 263-246.
- Wallace, D.C. (2005)** A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39, 359-407.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., 2nd und Nikoskelainen, E.K. (1988)** Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427-1430.
- Wallin, I.E. (1923)** Symbioticism and prototaxis, two fundamental biological principles. *Symbioticism and prototaxis, two fundamental biological principles* 26, 65-73.
- Wang, K., Liu, R., Li, J., Mao, J., Lei, Y., Wu, J., Zeng, J., Zhang, T., Wu, H., Chen, L., Huang, C. und Wei, Y. (2011)** Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1alpha-mediated signaling. *Autophagy* 7, 966-978.
- Wang, X., Wang, J., Wong, S.C., Chow, L.S., Nicholls, J.M., Wong, Y.C., Liu, Y., Kwong, D.L., Sham, J.S. und Tsa, S.W. (2000)** Cytotoxic effect of gossypol on colon carcinoma cells. *Life Sci* 67, 2663-2671.
- Wang, Y. und Hekimi, S. (2015)** Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: Untangling the knot. *Science* 350, 1204-1207.

- Warburg, O., Wind, F. und Negelein, E. (1927)** The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* 8, 519-530.
- Warnsmann, V., Hainbuch, S. und Osiewacz, H.D. (eingereicht)** Quercetin-induced lifespan extension in *Podospora anserina* requires methylation of the flavonoid by the *O*-methyltransferase PaMTH1.
- Warnsmann, V., Hamann, A. und Osiewacz, H.D. (2016)** Im Alter zählt jeder Zentimeter: Mitochondrien und biologisches Altern. *BIOspektrum* 06.16, 571-574.
- Warnsmann, V., Meyer, N., Hamann, A., Kögel, D. und Osiewacz, H.D. (2018)** A novel role of the mitochondrial permeability transition pore in (-)-gossypol-induced mitochondrial dysfunction. *Mech Ageing Dev* 170, 45-58.
- Warnsmann, V. und Osiewacz, H.D. (2016)** Curcumin treatment affects mitochondrial respiration, induces autophagy and increases lifespan of the fungal aging model *Podospora anserina*. *Endocytobiosis Cell Res* 27, 20-26.
- Wätjen, W., Michels, G., Steffan, B., Niering, P., Chovolou, Y., Kampkotter, A., Tran-Thi, Q.H., Proksch, P. und Kahl, R. (2005)** Low concentrations of flavonoids are protective in rat H4IIE cells whereas high concentrations cause DNA damage and apoptosis. *J Nutr* 135, 525-531.
- Wayne, L.G. und Diaz, G.A. (1986)** A double staining method for differentiating between two classes of mycobacterial catalase in polyacrylamide electrophoresis gels. *Anal Biochem* 157, 89-92.
- Weil, A., Luce, K., Dröse, S., Wittig, I., Brandt, U. und Osiewacz, H.D. (2011)** Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* 10, 4280-4290.
- Weinberg, S.E. und Chandel, N.S. (2015)** Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* 11, 9-15.
- Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S. und Guthrie, D. (1986)** The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. *J Nutr* 116, 641-654.
- Weismann, A. (1882)** Essays upon heredity and kindred biological problems, 2 ed, Oxford, Clarendon Press.
- Whittemore, E.R., Loo, D.T., Watt, J.A. und Cotman, C.W. (1995)** A detailed analysis of hydrogen peroxide-induced cell death in primary neuronal culture. *Neuroscience* 67, 921-932.
- Wiemer, M. (2015):** Die Wirkung von reaktiven Sauerstoffspezies auf das Alternsmodell *Podospora anserina*. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- Wiemer, M., Grimm, C. und Osiewacz, H.D. (2016)** Molecular control of fungal senescence and longevity, in: Esser, K. (Ed.), *The Mycota*, Springer Verlag, Heidelberg, New York, Tokio, 155-181.
- Wiemer, M. und Osiewacz, H.D. (2014)** Effect of paraquat-induced oxidative stress on gene expression and aging of the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Microbial Cell* 1, 225-240.
- Williams, M.D., Van Remmen, H., Conrad, C.C., Huang, T.T., Epstein, C.J. und Richardson, A. (1998)** Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial function in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273, 28510-28515.
- Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P. und Vandenabeele, P. (2012)** Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 22, 43-61.
- Wittig, I., Braun, H.P. und Schägger, H. (2006)** Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418-428.
- Wittig, I. und Schägger, H. (2005)** Advantages and limitations of clear-native PAGE. *Proteomics* 5, 4338-4346.
- Wittig, I. und Schägger, H. (2008)** Features and applications of blue-native and clear-native electrophoresis. *Proteomics* 8, 3974-3990.
- Wolter, K.G., Wang, S.J., Henson, B.S., Wang, S., Griffith, K.A., Kumar, B., Chen, J., Carey, T.E., Bradford, C.R. und D'Silva, N.J. (2006)** (-)-gossypol inhibits growth and promotes apoptosis of human head and neck squamous cell carcinoma in vivo. *Neoplasia* 8, 163-172.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. und Sinclair, D. (2004)** Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans. *Nature* 430, 686-689.

- Woodbury, W., Spencer, A.K. und Stahman, M.A. (1971)** An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44, 301-305.
- Wu, J.J., Quijano, C., Chen, E., Liu, H., Cao, L., Fergusson, M.M., Rovira, II, Gutkind, S., Daniels, M.P., Komatsu, M. und Finkel, T. (2009)** Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* 1, 425-437.
- Wu, Q., He, J., Fang, J. und Hong, M. (2010)** Antitumor effect of betulinic acid on human acute leukemia K562 cells in vitro. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 30, 453-457.
- Xie, M. und Roy, R. (2012)** Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae. *Cell Metab* 16, 322-335.
- Xu, R., Tian, E., Tang, H., Liu, C. und Wang, Q. (2014)** Proteomic analysis of gossypol induces necrosis in multiple myeloma cells. *Biomed Res Int* 2014, 839232.
- Yang, F., Lim, G.P., Begum, A.N., Ubeda, O.J., Simmons, M.R., Ambegaokar, S.S., Chen, P.P., Kaye, R., Glabe, C.G., Frautschy, S.A. und Cole, G.M. (2005)** Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. *J Biol Chem* 280, 5892-5901.
- Yang, Y., Karakhanova, S., Werner, J. und Bazhin, A.V. (2013)** Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. *Curr Med Chem* 20, 3677-3692.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Tsai, H.L. und Huang, S.L. (2003)** Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1215-1222.
- Yen, T.C., Chen, Y.S., King, K.L., Yeh, S.H. und Wei, Y.H. (1989)** Liver mitochondrial respiratory functions decline with age. *Biochem Biophys Res Commun* 165, 944-1003.
- Yoon, J.S., Chae, M.K., Lee, S.Y. und Lee, E.J. (2012)** Anti-inflammatory effect of quercetin in a whole orbital tissue culture of Graves' orbitopathy. *Br J Ophthalmol* 96, 1117-1121.
- Youle, R.J. und Narendra, D.P. (2011)** Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9-14.
- Young, L.C., Bone, K.M., Wang, P., Wu, F., Adam, B.A., Hegazy, S., Gelebart, P., Holovati, J., Li, L., Andrew, S.E. und Lai, R. (2011)** Fusion tyrosine kinase NPM-ALK Deregulates MSH2 and suppresses DNA mismatch repair function novel insights into a potent oncoprotein. *Am J Pathol* 179, 411-421.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Burke, A., Sellar, P.W., Clarke, M.P., Gnanaraj, L., Ah-Kine, D., Hudson, G., Czermin, B., Taylor, R.W., Horvath, R. und Chinnery, P.F. (2010)** The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Ophthalmology* 117, 1538-1546, 1546 e1531.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., Valentino, M.L., Rugolo, M. und Carelli, V. (2008)** OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352-367.
- Zarse, K., Schulz, T.J., Birringer, M. und Ristow, M. (2007)** Impaired respiration is positively correlated with decreased life span in *Caenorhabditis elegans* models of Friedreich Ataxia. *FASEB J* 21, 1271-1275.
- Zbarsky, V., Datla, K.P., Parkar, S., Rai, D.K., Aruoma, O.I. und Dexter, D.T. (2005)** Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Free Radic Res* 39, 1119-1125.
- Zhang, C., Browne, A., Child, D. und Tanzi, R.E. (2010)** Curcumin decreases amyloid-beta peptide levels by attenuating the maturation of amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem* 285, 28472-28480.
- Zhang, M., Liu, H., Guo, R., Ling, Y., Wu, X., Li, B., Roller, P.P., Wang, S. und Yang, D. (2003)** Molecular mechanism of gossypol-induced cell growth inhibition and cell death of HT-29 human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 66, 93-103.
- Zhao, L., Zou, X., Feng, Z., Luo, C., Liu, J., Li, H., Chang, L., Wang, H., Li, Y., Long, J., Gao, F. und Liu, J. (2014)** Evidence for association of mitochondrial metabolism alteration with lipid accumulation in aging rats. *Exp Gerontol* 56, 3-12.

Zhu, B.T., Ezell, E.L. und Liehr, J.G. (1994) Catechol-*O*-methyltransferase-catalyzed rapid *O*-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J Biol Chem* 269, 292-299.

Zhu, B.T., Wu, K.Y., Wang, P., Cai, M.X. und Conney, A.H. (2010) *O*-methylation of catechol estrogens by human placental catechol-*O*-methyltransferase: interindividual differences in sensitivity to heat inactivation and to inhibition by dietary polyphenols. *Drug Metab Dispos* 38, 1892-1899.

Zhu, W., Wu, Y., Meng, Y.F., Wang, J.Y., Xu, M., Tao, J.J. und Lu, J. (2015) Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Des Devel Ther* 9, 5337-5344.

Zimmer, C. (2009) Origins. On the origin of eukaryotes. *Science* 325, 666-668.

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

Zintel, S., Schwitalla, D., Luce, K., Hamann, A. und 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.

Zunino, S.J. und Storms, D.H. (2006) Resveratrol-induced apoptosis is enhanced in acute lymphoblastic leukemia cells by modulation of the mitochondrial permeability transition pore. *Cancer Lett* 240, 123-134.

9 ANHANG

9.1 Ergänzende Tabellen

Tabelle S 1: *p*-Werte der Lebensspannen mit Gossypol ermittelt mit SPSS.

| Stamm | Zusatz | Long rank | Breslow | Tarane-Ware |
|----------------|-----------------|------------|------------|-------------|
| WT | 20 µM Gossypol | 0,00134435 | 0,00704081 | 0,00316173 |
| | 200 µM Gossypol | 0,00000561 | 0,00002596 | 0,00001196 |
| <i>ΔPaAtg1</i> | 20 µM Gossypol | 0,00407830 | 0,00881919 | 0,00604413 |
| <i>ΔPaMca1</i> | 20 µM Gossypol | 0,60733883 | 0,90885641 | 0,86618191 |
| <i>ΔPaCypD</i> | 20 µM Gossypol | 0,00994618 | 0,09036763 | 0,03610816 |

Tabelle S 2: *p*-Werte der Lebensspannen mit Curcumin ermittelt mit SPSS.

| Stamm | Zusatz | Long rank | Breslow | Tarane-Ware |
|--------------------|----------------|------------|------------|-------------|
| WT | 50 µM Curcum | 0,00000006 | 0,00000064 | 0,00000017 |
| | 50 µM Curcumin | 0,00185037 | 0,00616730 | 0,00342922 |
| | + 200 µM NAC | | | |
| <i>ΔPaSod1/2/3</i> | 50 µM Curcumin | 0,68267958 | 0,62740662 | 0,64207436 |
| <i>ΔPaSod1</i> | 50 µM Curcumin | 0,31503070 | 0,29981480 | 0,24563007 |
| <i>ΔPaAtg1</i> | 50 µM Curcumin | 0,91082599 | 0,59433188 | 0,78111208 |

Tabelle S 3: *p*-Werte der Lebensspannen mit Quercetin und Isorhamnetin ermittelt mit SPSS.

| Stamm | Zusatz | Long rank | Breslow | Tarane-Ware |
|-------------------|---------------------|------------|------------|-------------|
| WT | 300 µM Quercetin | 0,00023604 | 0,00085478 | 0,00048936 |
| | 300 µM Isorhamnetin | 0,00004669 | 0,00015899 | 0,00008490 |
| <i>ΔPaMth1</i> | 300 µM Quercetin | 0,10954313 | 0,13877871 | 0,10646722 |
| | 300 µM Isorhamnetin | 0,00007735 | 0,00045407 | 0,00019017 |
| <i>PaMth1_OEx</i> | 300 µM Quercetin | 0,00005235 | 0,00012513 | 0,00007232 |

9.2 Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------------------|--|-----------------------------|--|
| µg | Mikrogramm | kDa | Kilodalton |
| µl | Mikroliter | l | Liter |
| µM | Mikromolar | M2 | Medium 2 |
| ADP | Adenosindiphosphat | max. | Maximal |
| AG | Arbeitsgruppe | MFRTA | „Mitochondrial free radical theory of aging“ |
| AmAc | Ammoniumacetat | mg | Milligramm |
| AOX | Alternative Oxidase | min | Minute(n) |
| APS | Ammoniumpersulfat | ml | Milliliter |
| ATP | Adenosinriphosphat | mM | Millimolar |
| BCIP | 5-Brom-4-chlor-3 indoxylphosphat | MOPS | Morpholinopropansulfonsäure |
| ble | Phleomycin | mPTP | mitochondriale Permeabilitäts-Transitions-pore |
| BMM | Biomalz-Mais-Medium | mtDNA | Mitochondriale DNA |
| Bp | Basenpaar | MTH | Methyltransferase |
| BSA | „Bovine serum albumin“ | mtMP | Mitochondriales Membranpotential |
| bspw. | beispielsweise | n | Probenanzahl |
| bzw. | beziehungsweise | NAC | N-Acetyl-L-Cystein |
| CI-V | Komplex I-V der Atmungskette | NADH | Nicotinamidadenindinukleotid |
| ca. | circa | NBT | Nitoblau-Tetrazoliumchlorid |
| CAT | Katalasen | O ₂ | Sauerstoff |
| CCCP | Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon | O ₂ ⁻ | Superoxidanion, kurz: Superoxid |
| CM | „Complete medium“ | OCR | „oxygen consumption rate“ |
| cm | Zentimeter | OMM | „Outer mitochondrial membrane“ |
| COX | Cytochrom C Oxidase | Omy | Oligomycin |
| Cur | Curcumin | OXPPOS | Oxidative Phospholierung |
| Cu/ZnSOD | Kupfer/Zink Superoxid-Dismutase | Pa | <i>Podospora anserina</i> |
| CypD | Cylophilin D | PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| d | Tag | PBS | „Phosphate buffered saline“ |
| DAB | Diaminobenzidin | pH | „Potentia Hydrogenii“ |
| DIC | Differentialinterferenzkontrast | PM | Pyruvat/Malat |
| DMF | Dimethylformamid | pmol | Pikomol |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| DNA | Desoxiribunukleinsäure | p-Wert | „Probability value“ |
| DTT | Dithiothreitol | Quer | Quercetin |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure | ROS | Reaktive Sauerstoffspezies |
| engl. | englisch | Rot | Rotenon |
| EGTA | Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure | RT | Raumtemperatur |
| et al. | „Et alii/et aliae/et alia“ | S | Succinat |
| EtOH | Ethanol | SDS | „Sodium dodecyl sulfate“ |
| FAD | Flavinadeninnukleotid (oxidiert) | sec | Sekunde(n) |
| FADH ₂ | Flavinadeninnukleotid (reduziert) | SHAM | Salizylhydroxaminsäure |
| FCCP | Carbonylcyanid-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon | SOD | Superoxiddismutase |
| FRTA | „Free radical theory of aging“ | Tab. | Tabelle |
| g | Gramm | TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| GFP | Grün fluoreszierendes Protein | TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Gossy | (-)-Gossypol (AT-101) | TMRM | Tetramethylrhodamin-Methylester |
| GPx | Glutathion-Peroxidase | TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| GSH | Glutathion | u. a. | Unter anderem |
| GSSG | Glutathion-Disulfad | unbeh. | unbehandelt |
| h | Stunde(n) | ü. N. | über Nacht |
| H ₂ O | Wasser | Upm | Umdrehungen pro Minute |
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid | UV | Ultraviolett |
| Hyg | Hygromycin | V | Volt |
| IMM | Innere mitochondriale Membran | v/v | „Volume/volume“ |
| i. d. R. | In der Regel | w/v | „Weight/volume“ |
| KCN | Kaliumcyanid | z. B. | Zum Beispiel |

9.3 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Übersicht der Merkmale des Alterns. | 2 |
| Abbildung 2: Einfluss der Qualitätskontrolle und molekularer Schäden auf das zelluläre Gleichgewicht. | 3 |
| Abbildung 3: Mitochondrien die Kraftwerke der Zellen. | 5 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung der enzymatischen Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies. | 8 |
| Abbildung 5: Altersabhängige Veränderung der Mitochondrien-Dynamik,-Morphologie und-Ultrastruktur. | 11 |
| Abbildung 6: Strukturformeln der wohl bekanntesten Arzneimittel abgeleitet von Naturstoffen. | 16 |
| Abbildung 7: Bekannte Wirkungen von Polyphenolen. | 18 |
| Abbildung 8: Strukturformel von Gossypol. | 19 |
| Abbildung 9: Strukturformel von Curcumin. | 21 |
| Abbildung 10: Strukturformel von Quercetin. | 22 |
| Abbildung 11: Anti- bzw. pro-oxidative Wirkung von Quercetin. | 25 |
| Abbildung 12: Simultane mtMP- und OCR-Messung mit isolierten Wildtyp-Mitochondrien. | 46 |
| Abbildung 13: Die <i>PaSod3</i> -Deletion führt zu einer Beeinträchtigung der Mitochondrienfunktion. | 56 |
| Abbildung 14: Dosis-abhängige Reduktion der <i>P. anserina</i> -Wuchsrate. | 59 |
| Abbildung 15: Dosis-abhängiger Effekt von Gossypol auf die Lebensspanne des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 60 |
| Abbildung 16: Induktion von apoptotischem Zelltod durch Gossypol. | 62 |
| Abbildung 17: Effekt von Gossypol auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch von <i>P. anserina</i> | 63 |
| Abbildung 18: Effekt von Gossypol auf den Aufbau der mitochondrialen Atmungskette. | 65 |
| Abbildung 19: Effekt von Gossypol auf die Mitochondrien-Morphologie des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 66 |
| Abbildung 20: Erhöhung des Wasserstoffperoxid-Ausstoßes durch Gossypol. | 67 |
| Abbildung 21: Einfluss von Gossypol auf Superoxid-abbauende Enzyme des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 68 |
| Abbildung 22: Einfluss von Gossypol auf H ₂ O ₂ -abbauende Enzyme des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 69 |
| Abbildung 23: PaCYPD-abhängige Induktion der nicht-selektiven Autophagie. | 71 |
| Abbildung 24: Abnahme der Menge mitochondrialer Proteine nach 24-stündiger Gossypol-Behandlung. | 72 |
| Abbildung 25: <i>PaAtg1</i> -unabhängige Mitophagie-Induktion durch Gossypol. | 73 |
| Abbildung 26: Lebensverkürzung und mitochondriale Dysfunktion sind abhängig von <i>PaCypD</i> | 74 |
| Abbildung 27: Dosis-abhängige Reduktion der Wuchsrate des <i>P. anserina</i> -Wildtyps durch Curcumin. | 76 |
| Abbildung 28: Einfluss von 0,19 % EtOH auf die Lebensspanne und Mitochondrienfunktion des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 77 |
| Abbildung 29: Curcumin induziert eine Lebensverlängerung in <i>P. anserina</i> | 78 |
| Abbildung 30: Veränderung des mitochondrialen Proteoms durch Curcumin. | 79 |
| Abbildung 31: Curcumin erhöht den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und den ATP-Gehalt. | 80 |
| Abbildung 32: Einfluss auf die Wasserstoffperoxid-Menge. | 82 |
| Abbildung 33: Induktion von nicht-selektiver Autophagie durch Curcumin. | 83 |
| Abbildung 34: Mitochondrien-Menge bleibt trotz gesteigerter Mitophagie-Rate unverändert. | 84 |
| Abbildung 35: Curcumin induziert Autophagie-abhängige Lebensverlängerung. | 85 |
| Abbildung 36: Curcumin-induzierte Lebensverlängerung ist PaSOD1-abhängig. | 86 |

| | |
|---|-----|
| Abbildung 37: Wasserstoffperoxid ist notwendig für die Curcumin-induzierte Langlebigkeit. | 87 |
| Abbildung 38: Einfluss von 0,15 % DMSO auf die Lebensspanne und Atmung des <i>P. anserina</i> -Wildtyps. | 89 |
| Abbildung 39: Lebensspannenverlängerung des <i>P. anserina</i> -Wildtyps durch Quercetin. | 90 |
| Abbildung 40: Quercetin erhöht die mitochondriale Atmung und Menge der Atmungskettenkomplexe. | 91 |
| Abbildung 41: Veränderungen der ROS-Menge durch Quercetin-Behandlung. | 92 |
| Abbildung 42: Veränderung der ROS-Menge beruht auf einer veränderten Superoxid-Detoxifizierung. | 93 |
| Abbildung 43: Quercetin reduziert die Peroxidase-Aktivität. | 93 |
| Abbildung 44: Quercetin erhöht die PaMTH1-Menge des Wildtyps. | 94 |
| Abbildung 45: Quercetin-induzierte Lebensverlängerung hängt von PaMTH1-Menge ab. | 95 |
| Abbildung 46: Die PaMTH1-Menge ist in <i>PaMth1_OEx</i> höher als im Wildtyp mit Quercetin. | 96 |
| Abbildung 47: Effekte auf Atmung und ROS-Menge sind abhängig von der Quercetin-Methylierung. | 98 |
| Abbildung 48: ROS-Detoxifizierung wird Methyltransferase-abhängig beeinflusst. | 99 |
| Abbildung 49: Isorhamnetin verlängert die Lebensspanne des Wildtyps und von $\Delta PaMth1$ | 100 |
| Abbildung 50: Keine Erhöhung der PaMTH1-Menge durch Isorhamnetin. | 101 |
| Abbildung 51: Isorhamnetin beeinflusst die mitochondriale Atmung nicht. | 102 |
| Abbildung 52: ROS-Stoffwechsel bleibt unverändert durch die Isorhamnetin-Behandlung. | 103 |
| Abbildung 53: Veränderungen der mitochondrialen Atmung und die resultierenden Effekte in der <i>PaSod3</i> -Deletionsmutante. | 109 |
| Abbildung 54: Hormetische Wirkung von Wasserstoffperoxid und die Auswirkungen auf die Lebensspanne. | 114 |
| Abbildung 55: Notwendigkeit der <i>O</i> -Methyltransferase PaMTH1 für den lebensverlängernden Effekt von Quercetin. | 123 |

9.4 Tabellenverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Tabelle 1: Quercetingehalt ausgewählter Lebensmittel und Getränke..... | 23 |
| Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte..... | 29 |
| Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien und Stoffe..... | 30 |
| Tabelle 4: Verwendete Puffer und Lösungen..... | 32 |
| Tabelle 5: Verwendete Anzuchtmedien..... | 35 |
| Tabelle 6: Verwendete Kits..... | 36 |
| Tabelle 7: Verwendete Stämme..... | 36 |
| Tabelle 8: Verwendete Antikörper..... | 36 |
| Tabelle 9: Verwendete Größenstandards..... | 37 |
| Tabelle 10: Verwendete Computerprogramme..... | 37 |
| Tabelle 11: Sonstige Materialien..... | 38 |
| Tabelle 12: Inkubationsbedingungen der verschiedenen Zusätze..... | 38 |
| Tabelle 13: Pipettierschema für zwei 12%ige SDS-Polyacrylamidgele..... | 47 |
| Tabelle 14: Pipettierschema für zwei native 10%ige Polyacrylamidgele..... | 48 |
| Tabelle 15: Pipettierschema für ein 3,5-14%iges blau-natives Polyacrylamidgel..... | 50 |
| Tabelle 16: Zusammenfassung der phänotypischen und zellulären Veränderungen durch die Behandlung des <i>P. anserina</i> -Wildtyps mit Gossypol, Curcumin oder Quercetin..... | 112 |

10 PUBLIKATIONEN, KONFERENZEN, POSTERBEITRÄGE & KURSE

Publikationen

Original Artikel

Warnsmann V., Hainbuch S. und Osiewacz H.D. (eingereicht)
Quercetin-induced organismic lifespan extension requires methylation of the flavonoid.

Meyer N., Linder B., Zielke S., **Warnsmann V.**, Rahel S., Osiewacz H.D., Fulda S., Mittelbronn M., Behrends C. und Kögel D. (zur Publikation angenommen)
AT-101 induces early mitochondrial dysfunction and heme oxygenase-1 to trigger mitophagic cell death in glioma cells. Autophagy

Warnsmann V., Meyer N., Hamann A., Kögel D., Osiewacz H.D. (2018)
A novel role of the mitochondrial permeability transition pore in (-)-gossypol-induced mitochondrial dysfunction. Mech Ageing Dev 170, 45-58

Knuppertz L., **Warnsmann V.**, Hamann A., Grimm C. und Osiewacz H.D. (2017)
Stress-dependent opposing roles for mitophagy in aging of the ascomycete *Podospora anserina*. Autophagy 13, 1037-1052

Warnsmann V. und Osiewacz H.D. (2016)
Curcumin treatment affects mitochondrial respiration, induces autophagy and increases lifespan of the fungal aging model *Podospora anserina*. Endocytobiosis and Cell Res 27, 20-26

Nordmann D., Lickfeld M., **Warnsmann V.**, Wiechert J., Jendretzki A. und Schmitz H.P. (2014)
The small GTP-binding proteins *AgRho2* and *AgRho5* regulate tip-branching, maintenance of the growth axis and actin-ring-integrity in the filamentous fungus *Ashbya gossypii*. PLoS One 9 (8):e106236

Übersichtsartikel

Henkel V., **Warnsmann V.** und Osiewacz H.D. (2017)
Autophagic responses compensate mitochondrial impairments. AGING 9, 1947-1948.

Warnsmann V., Hamann A. und Osiewacz H.D. (2016)
„Im Alter zählt jeder Zentimeter“ - Die Rolle der Mitochondrien beim Altern von Pilzen - *BIOspektrum* 06.16, 571-574

Konferenzen und Posterbeiträge

„5th International Symposium on Nutrition, Oxygen Biology and Medicine“ (2013)

Campus des Cordeliers, Paris, France

„11th Molecular Biology of Fungi Conference“ (2015)

Technische Universität Berlin, Deutschland

Poster: „*Podospora anserina* as tool to study the impact of natural compounds on mitochondrial function“

„1st Frankfurt Conference on Ubiquitin and Autophagy“ (2016)

Universitätsklinikum Frankfurt am Main, Deutschland

Poster: „Studying the impact of natural compounds on mitochondrial function and autophagy“

Kurse

96th IOC- International O2k-Workshop on High-Resolution Respirometry and Fluorometry (2014)

Hotel Koebersee, Schroecken, Österreich