

**Untersuchungen zur Bedeutung des mitochondrialen CLXP-
Komplexes für den Energie-Metabolismus von *Podospora
anserina***

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

Von

Daniela Heinz

aus Duisburg

Frankfurt am Main 2021

(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel

1. Gutachter: Prof. Dr. H. D. Osiewacz
2. Gutachter: Prof. Dr. C. Büchel

Datum der Disputation: 20.12.2021

„We're all stories in the end. Just make it a good one.“

Steven Moffat (Doctor Who; 2010)

Konventionen zur Schreibweise von Genen, Proteinen und Stämmen:

- Gene: Gene werden kursiv geschrieben (z.B. *ClpP* oder *Snf1*). Wenn ein Gen einer bestimmten Art beschrieben werden soll, so wird der Arname als Abkürzung vor das Gen gestellt (z.B. *PaClpP* oder *PaSnf1*)
- Proteine: Proteine werden in Großbuchstaben geschrieben (z.B. CLPP oder SNF1). Wenn ein Protein einer bestimmten Art beschrieben werden soll, so wird der Arname als Abkürzung vor das Protein gestellt (z.B. PaCLPP oder PaSNF1)
- Fusionsgene und -proteine: Wenn zwei Gene, bzw. Proteinen fusioniert wurden, so wird dies mit zwei Doppelpunkten zwischen den Bezeichnungen gekennzeichnet, wobei der N-terminale Abschnitt zuerst genannt wird (z.B. *PaSod1::Gfp*, bzw. PaSOD1::GFP).
- Deletionsstämme: Deletionsstämme werden nach dem deletierten Gen benannt (z.B. *PaSnf1*-Deletionsstamm). In der Kurzform wird dem Gennamen der griechische Buchstabe „Δ“ vorangestellt (z.B. $\Delta PaSnf1$)
- Mehrfachmutanten: Mehrfachmutanten, wie Doppel- oder Trippelmutanten werden mit einem Schrägstrich zwischen den einzelnen Mutationen gekennzeichnet (z.B. $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ oder $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/Sod1::Gfp$)
- Antikörper: Antikörper werden nach dem Protein benannt, gegen welches sie gerichtet sind. Zusätzlich wird der Bezeichnung ein „anti-“ vorangestellt (z.B. anti-GFP).

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Altern	7
1.1.1 Biologisches Altern	7
1.1.2 Die Rolle der Mitochondrien während der Alterung und Entwicklung	9
1.2 Regulation der Energiehomöostase	12
1.2.1 AMPK- mTOR Signalweg	13
1.2.2 Autophagie	16
1.2.3 Mitochondriale Qualitätskontrolle	20
1.3 <i>Podospora anserina</i> als Modellorganismus zur Entwicklung und Alterung	25
1.4 Problemstellung	27
2. Material und Methoden	29
2.1 Material	29
2.1.1 Geräte	29
2.1.2 Chemikalien und Stoffe	30
2.1.3 Lösungen und Puffer	33
2.1.4 Anzuchtmedien	37
2.1.5 Stämme	39
2.1.6 Kits	40
2.1.7 Vektoren	40
2.1.8 Oligonukleotide	41
2.1.9 Hybridisierungssonden	42
2.1.10 Enzyme	42
2.1.11 Größenstandards	43
2.1.12 Antikörper	43
2.1.13 Computerprogramme	43
2.1.14 Sonstige Materialien	44
2.2 Methoden	45
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -spezifische Methoden	45
2.2.2 <i>Podospora anserina</i> -spezifische Methoden	47
2.2.3 DNA-spezifische Methoden	53
2.2.4 Protein-spezifische Methoden	60
2.2.5 Statistische Auswertung	64
3. Ergebnisse	65
3.1 Identifizierung potentieller PaCLPXP-Substrate	65

3.2 Beeinflussung der Autophagie in <i>Podospora anserina</i> durch Manipulation der Acetyl-Coenzym A-Menge.....	69
3.2.1 Zugabe von Leucin zur Manipulation der Autophagie	70
3.2.2 Zugabe von Butyrat zur Manipulation der Autophagie	73
3.3 Metabolom-Analyse des <i>PaClpP</i> -Deletionsstammes im Vergleich zum <i>P. anserina</i> Wildtyp-Stamm	76
3.4 Die Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) in der <i>PaClpP</i> -Deletionsmutante	80
3.4.1 Erstellung einer <i>PaSnf1</i> -Deletionsmutante	81
3.4.2 Charakterisierung der <i>PaSnf1</i> -Deletionsmutante	83
3.4.3 Erstellung und Charakterisierung einer $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante.....	86
3.4.4 Auswirkung von Hitzestress auf $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$	89
3.4.5 Beeinträchtigung der Autophagie in den <i>PaSnf1</i> -Deletionsmutanten	91
3.4.6 Beeinflussung der Mitochondrien-Morphologie durch PaSNF1	97
3.4.7 Unterschiede der $\Delta PaClpP$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme in der Mitochondrien-Funktion	100
4. Diskussion	107
4.1 Identifizierung von Substraten und mögliche biologische Rolle der mitochondrialen Protease PaCLPP.....	107
4.2 Relevanz der Autophagie für die Langlebigkeit der <i>PaClpP</i> -Deletionsmutante.....	114
4.3 Bedeutung von PaSNF1 für die <i>PaClpP</i> -Deletionsmutante	116
4.3.1 Erstellung einer <i>PaSnf1</i> -Deletionsmutante und die Auswirkungen von PaSNF1 auf das Wachstum und die Entwicklung von <i>P. anserina</i>	116
4.3.2 Gleichzeitige Deletion von <i>PaClpP</i> und <i>PaSnf1</i> führt zu einer extremen Lebensspannen-Verlängerung.....	118
4.3.3 PaSNF1 reguliert die mitochondriale Dynamik in <i>P. anserina</i>	120
4.3.4 Das Fehlen von PaCLPP und/oder von PaSNF1 führt zu einer beeinträchtigten mitochondrialen Funktion.....	121
4.4 Das Fehlen von PaCLPP und PaSNF1 sorgt zusammen mit RMP1-1 durch eine synergistische Wirkung für eine extreme Lebensspannen-Verlängerung	123
5. Ausblick	125
6. Zusammenfassung	126
7. Literaturverzeichnis	128
8. Anhang	145
9. Abkürzungsverzeichnis	157
10. Abbildungsverzeichnis.....	160
11. Tabellenverzeichnis	162

1. Einleitung

1.1 Altern

1.1.1 Biologisches Altern

„Die Zeit befiehlt dem Alter, die Schönheit zu zerstören“

Pompeo Girolamo Batoni, Titel eines Ölgemäldes 1746

Mit seinem Gemälde versuchte Batoni, den ästhetischen Aspekt des Alterns seiner Zeit darzustellen und macht deutlich, dass keiner davor gefeit ist. Seit jeher versuchen die Menschen dem Geheimnis des Alterns auf die Spur zu kommen und dies nicht nur in kultureller Hinsicht, sondern vor allem auch dem zu Grunde liegenden Prozess. Was wird unter dem Begriff „Altern“ verstanden? Biologisch betrachtet versteht man darunter einen zeitlich festgelegten Prozess, welcher zum Verlust der gesunden Zellfunktionen und letztendlich zum Tod des Individuums, bzw. der Zelle führt (Kirkwood und Austad, 2000). Dieser Prozess ist hoch komplex und bis heute noch nicht gänzlich verstanden.

In einem frühen Stadium des Lebens wird das Altern auch als Reifung, bzw. Entwicklung im positiven Sinne interpretiert. In einem späteren Stadium wird dieser Prozess allerdings eher als negatives Voranschreiten des Zerfalls definiert und wird oft mit der Seneszenz in Verbindung gebracht (Campisi, 2013). Die Seneszenz ist ein irreversibles Stadium und beschreibt den Stillstand des Zellzyklus, welcher durch übermäßigen intrazellulären oder extrazellulären Stress, bzw. Schäden verursacht wird (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Doch kann die Seneszenz nicht nur schädlich für den Organismus sein, so kann während der Wundheilung beim Menschen eine Induktion von Seneszenz in den betroffenen Zellen beobachtet werden, die bei der Heilung hilft (Jun und Lau, 2010; Demaria *et al.*, 2014). Die Einleitung der Seneszenz kann auch als Anti-Krebs-Mechanismus agieren, indem sie die Replikation der Zellen begrenzt (Zhu *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2005; Collado *et al.*, 2005).

Der Alterungsprozess setzt sich aus verschiedenen Prozessen zusammen und kann auf genetische Defekte, Umwelteinflüsse, Krankheit und angeborene Aspekte zurückgeführt werden (Harman, 2001). Zur Bewertung des biologischen Alterns werden verschiedene Mittel genutzt. In einem viel beachteten Übersichtsartikel von López-Otín *et al.* (2013) beispielsweise werden zur Erfassung ebendieses Prozesses bis zu neun Kennzeichen berücksichtigt. Darunter fallen die genomische Instabilität, die Verkürzung der Telomere, der Verlust, bzw. die Störung der Proteostase, epigenetische Veränderungen durch die Umwelt, die mitochondriale Dysfunktion, die zelluläre Seneszenz, eine veränderte Kommunikation zwischen den Zellen, der Verlust der Stammzellen, und eine deregulierte Nährstoffwahrnehmung der Zellen (López-Otín *et al.*, 2013). Nicht alle, doch die

meisten dieser Kennzeichen sind universal und können nicht nur bei Säugetieren angewandt, sondern auch auf andere Organismen übertragen werden. Meist ist jedoch nicht nur einer dieser Punkte für den Tod eines Individuums verantwortlich, sondern eine Akkumulation verschiedener Gründe (Kirkwood und Austad, 2000). Die betreffenden Aspekte werden in drei übergeordneten Gruppen eingeteilt (López-Otín *et al.*, 2013). Die primären Kennzeichen zeichnen sich durch die genomische Instabilität (Lombard *et al.*, 2005; Mostoslavsky *et al.*, 2006), die Verkürzung der Telomere (Kim Sh *et al.*, 2002), den Verlust der Proteostase (Taylor und Dillin, 2011; Schneider *et al.*, 2015) und durch epigenetische Veränderungen aus (Gonzalo, 2010; Przybilla *et al.*, 2014). Die zweite Gruppe, die antagonistischen Kennzeichen, beinhaltet die deregulierte Nährstoffwahrnehmung (Kaeberlein *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2010; Stallone *et al.*, 2019), die mitochondriale Dysfunktion (Lin und Beal, 2006; Kadoguchi *et al.*, 2020) und die zelluläre Seneszenz (Campisi, 2013). Die dritte und letzte Gruppe umfasst die integrativen Kennzeichen wie der Verlust der Stammzellen (Harrison *et al.*, 1978; Van Zant und Liang, 2003) und die Änderung der intrazellulären Kommunikation (Trosko *et al.*, 1998; D'hondt *et al.*, 2009). Die Gruppen bauen jeweils aufeinander auf. So verursachen zum Beispiel die Merkmale der ersten Gruppe das Auftreten der Kennzeichen aus der zweiten Gruppe und diese wiederum das Auftreten der Komponenten der dritten Gruppe (Trosko *et al.*, 1998; López-Otín *et al.*, 2013)(Abb. 1.1).

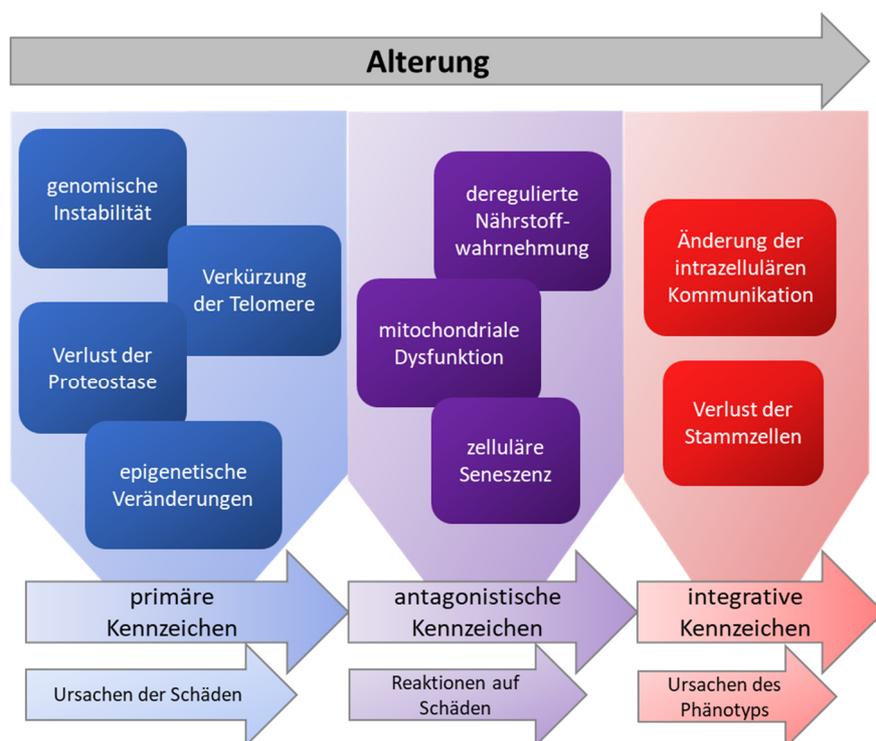


Abbildung 1.1: Kennzeichen der Alterung.

Biologisches Altern setzt sich aus verschiedenen Prozessen zusammen. Die Veränderungen im Organismus wurden als Kennzeichen der Alterung in verschiedenen Gruppen unterteilt. Die primären Kennzeichen (blau) sind ursächlich für die Akkumulation der zellulären Schäden. Die zweite Gruppe beschreibt die antagonistischen Kennzeichen (violett), welche als Reaktion, bzw. als Folge der Schäden aus den primären Kennzeichen entstehen. Die letzte Gruppe umfasst die integrativen Kennzeichen (rot), diese Aspekte beschreiben den eigentlichen Phänotyp der Alterung und sind die Folge aus den Schädigungen der ersten beiden Gruppen. Modifiziert nach López-Otín *et al.* (2013).

All diese Kennzeichen der Alterung laufen auf eine Veränderung des Stoffwechsels, des Metabolismus hinaus. Um dem entgegenzusteuern entwickelten sich verschiedene Reparatur- und Kontroll-Systeme für die unterschiedlichen Schädigungen. Beispielsweise können verschiedene DNA-Reparatur-Systeme beobachtet werden (Corry *et al.*, 1977; Rupp, 1996). Unter anderem besitzen die meisten Polymerasen bereits eine so genannte „proof-reading“-Aktivität, sodass die Polymerase während der Replikation der DNA fehlerhafte Basenpaarungen direkt erkennen und beheben kann (Ide *et al.*, 1995; Dietrich *et al.*, 2002). Darüber hinaus existieren noch weitere Enzyme, die dafür sorgen, dass Schäden der DNA erkannt und behoben werden (Rupp, 1996). Auch für die anderen Kennzeichen der Alterung wurden verschiedene Mechanismen entwickelt, um ihnen entgegenzusteuern. Als letzte Instanz scheint hierbei die Apoptose eingeleitet zu werden, der programmierte Zelltod (Warner, 1999; Herker *et al.*, 2004). Apoptose wird immer dann eingeleitet, wenn das Gleichgewicht zwischen Schäden und Reparatur-, bzw. Kontrollmechanismen verschoben ist und die Schäden zu stark werden. Eine besonders wichtige Rolle bei der Apoptose-Induktion scheinen die Mitochondrien einzunehmen (Susin *et al.*, 1998; Susin *et al.*, 1999). Verschiedene Studien unterstützen diesen starken Zusammenhang der Mitochondrien mit der Alterung. 1956 stellte Harman das erste Mal die sogenannte „Freie Radikal-Theorie“ der Alterung auf (Harman, 1956). Hiernach sorgen die vom Sauerstoff abgeleiteten Radikale für Beeinträchtigungen auf zellulärer Ebene (Harman, 1956). Harman (1972) verfeinerte diese Theorie später zur „mitochondrialen freien Radikal-Theorie“ (MFRT), wonach überwiegend die ROS aus den Mitochondrien einen starken Einfluss auf die Alterungsprozesse ausüben.

1.1.2 Die Rolle der Mitochondrien während der Alterung und Entwicklung

Mitochondrien sind semiautonome Organellen, die von einer Doppelmembran umgeben sind. Sie kommen in den meisten Eukaryoten vor. Es sind dynamische Zellkompartimente, welche ständig Fusions- und Fissions-Prozessen unterliegen (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994b). Während der Alterung nehmen in der Regel die Fissions-Prozesse zu und es liegen vermehrt fragmentierte Mitochondrien vor (Seo *et al.*, 2010).

In den Mitochondrien laufen viele verschiedene Stoffwechselwege ab, wie zum Beispiel die Aminosäuresynthese, die β -Oxidation oder der Citratzyklus (auch als Tricarbonsäure-Zyklus, TCA-Zyklus bekannt), welcher unter Anderem Reduktionsäquivalente in Form von $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 hervorbringt (Ernster und Schatz, 1981; Wanders *et al.*, 2010; Tillander *et al.*, 2014; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017). Auch für die Synthese von Eisen-Schwefelclustern und die Kalzium-Homöostase sind die Mitochondrien wichtig (Duchen, 2000; Lill *et al.*, 2012; Vakifahmetoglu-Norberg *et al.*, 2017). Die wohl bekannteste Funktion der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Mehr als 80 % des von der Zelle benötigten ATP wird über die sogenannte

Elektronentransportkette (oder auch Atmungskette) gewonnen (Papa *et al.*, 2012). Die Komponenten der Elektronentransportkette befinden sich in der inneren Mitochondrienmembran (IMM, „inner mitochondrial membrane“) und bestehen in Säugetieren aus der NADH-Dehydrogenase (Komplex I), der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), dem Coenzym Q und dem Cytochrom c (Ernster und Schatz, 1981; Barrientos, 2002) (Abb. 1.2). Die Herstellung von ATP wird letztendlich über die ATP-Synthase bewerkstelligt. Hierzu benötigt sie einen elektrochemischen Protonengradient, welcher zuvor von den Komplexen I, III und IV durch den schrittweisen Elektronentransport auf Sauerstoff (über die Komplexe I-IV) aufgebaut wird (Ernster und Schatz, 1981; Barrientos, 2002) (siehe Abb. 1.2). Die Elektronentransportkette der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* weicht von diesem Aufbau ein wenig ab, statt eines Komplex I besitzt sie zwei NADH-Quinone Oxidoreduktasen (NDI1) (de Vries und Grivell, 1988; De Vries *et al.*, 1992; Seo *et al.*, 1999).

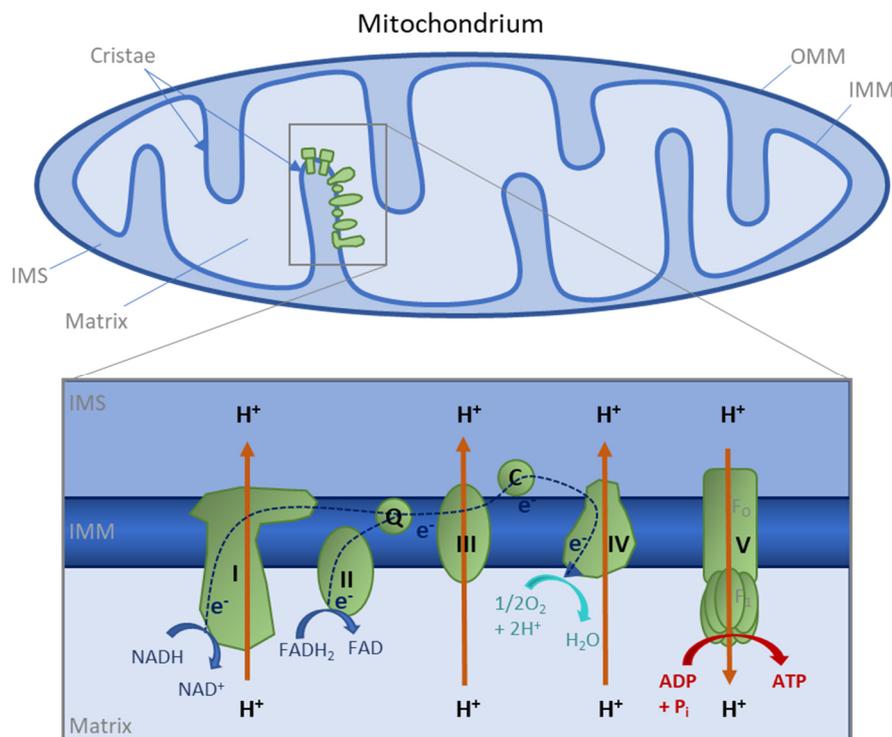


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette und deren Lokalisation im Mitochondrium.

Mitochondrien sind Organellen einer Zelle, die mit einer Doppelmembran umgeben sind. Sie sind von der äußeren Mitochondrienmembran (OMM) umgeben. Die innere Mitochondrienmembran (IMM) bildet durch Einstülpungen in die mitochondriale Matrix die sogenannten Cristae aus. Der Raum zwischen den beiden Membranen wird als Intermembranraum (IMS) bezeichnet. Die Elektronentransportkette (ETC) befindet sich in der IMM der Cristae und besteht aus Atmungsketten-Komplexen I-V, dem Coenzym Q (Q) und dem Cytochrom c (C). An Komplex I werden durch die Reduktionsäquivalente NADH, an Komplex II durch FADH₂, Elektronen (e⁻) in die ETC eingebracht und über Coenzym Q, Cytochrom c und den Komplexen III und IV auf Sauerstoff (O₂) übertragen. Mit Hilfe der dadurch freigesetzten Energie werden an den Komplexen I, III und IV Protonen (H⁺) aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert. An der ATP-Synthase (Komplex V) bestehend aus den F₀- und F₁-Untereinheiten, kann der entstandene elektrochemische Gradient genutzt werden, um aus ADP und P_i schließlich ATP zu generieren. Abbildung modifiziert nach Lee und Yoon (2018).

Die Mitochondrien spielen bei der Alterung eine zentrale Rolle. Sie sind nicht nur für die Bereitstellung von Energie in Form von ATP wichtig, sondern auch der Ort, an denen ein großer Teil der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entstehen.

Ein großer Teil der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) entstehen während der mitochondrialen Atmung als Nebenprodukte. Zu den bekanntesten und für die Zelle wichtigsten ROS zählen das Superoxid-Anion ($\cdot\text{O}_2^-$), das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$), Stickstoffoxid ($\text{NO}\cdot$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Das Superoxid-Anion und das Hydroxylradikal werden aufgrund eines ungepaarten Elektron auch zu den freien Radikalen gezählt und sind hoch reaktiv. Ersteres entsteht überwiegend am Komplex I und Komplex III der Elektronentransportkette (Dröse *et al.*, 2009; Murphy, 2009). Während der Alterung nimmt die ROS-Belastung durch vermehrte Fehler während der mitochondrialen Atmung zu (Weir und Robaire, 2007; Scialò *et al.*, 2016; Jacinto *et al.*, 2018). Dies führt letztendlich zu vermehrten Schäden durch oxidativen Stress und zur Einleitung der Apoptose (Simon *et al.*, 2000; Bragado *et al.*, 2007).

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung der ROS zu einer Verlängerung der Lebensspanne führen kann (Bonawitz *et al.*, 2006; Zuin *et al.*, 2008; Van Raamsdonk und Hekimi, 2010; Yi *et al.*, 2018). Allerdings sind für ROS nicht nur negative Aspekte gezeigt worden. So konnte zum Beispiel beobachtet werden, dass leichter oxidativer Stress in verschiedenen Organismen zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Ristow und Schmeisser, 2014; Schaar *et al.*, 2015; Scialò *et al.*, 2016; Dilberger *et al.*, 2019). Dieser positive Effekt von geringen Mengen einer schädlichen Substanz wird als Hormesis bezeichnet. Bei ROS-Stress in den Mitochondrien wird diese Art der Hormesis auch als Mitohormesis bezeichnet, da der mitochondriale Stress für den positiven Effekt verantwortlich ist. Tatsächlich konnte in *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden, dass nur mitochondriale ROS einen positiven Effekt auf die Lebensspanne ausübt, während die Akkumulation von zytoplasmatischem ROS zu einer Lebensspannenverkürzung führt (Schaar *et al.*, 2015; Van Raamsdonk, 2015). Außerdem ist in der frühen Entwicklung ROS-Stress bedeutend für den Aufbau einer Stressresistenz und zur Festlegung der Lebensspanne eines Organismus (Bazopoulou *et al.*, 2019). Einige ROS fungieren auch als Signalmoleküle und übernehmen wichtige Aufgaben unter anderem bei Entwicklungsprozessen (Buetler *et al.*, 2004; Reczek und Chandel, 2015). Hierbei ist Wasserstoffperoxid eines der bekanntesten ROS, welches als ein wichtiges Signalmolekül agiert (Groeger *et al.*, 2009; Veal und Day, 2011).

Um den Organismus vor zu starkem ROS-Stress und damit vor Schäden zu schützen, besitzen die Zellen verschiedene Mechanismen zur Abwehr oder zum Abbau von ROS. Ein ROS-Abwehrmechanismus stellt die nicht-enzymatische Abwehr durch Antioxidantien wie Vitamin C (Padayatty *et al.*, 2003), α -Tocopherol (Gutiérrez *et al.*, 2003), Glutathion (Homma und Fujii, 2015; Rehman *et al.*, 2021) oder Carotinoide (Palace *et al.*, 1999; Ahmad *et al.*, 2010) dar. Ein weiterer und für die Zellen bedeutenderer Mechanismus ist die enzymatische Abwehr (Ahmad *et al.*, 2010). Dies erfolgt unter anderem durch Superoxid Dismutasen (SOD). Je nach Lokalisation existieren

verschiedene SODs, die im aktiven Zentrum entweder Kupfer und Zink, Mangan oder Eisen besitzen (Weisiger und Fridovich, 1973; Culotta, 2000; Zelko *et al.*, 2002). Die zytosolische SOD (SOD1) besitzt beispielsweise Kupfer/Zink-Cluster, während die mitochondriale SOD Mangan-Cluster besitzt (Weisiger und Fridovich, 1973; Culotta, 2000; Zelko *et al.*, 2002). Die SODs können Superoxide zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff abbauen (Weisiger und Fridovich, 1973; Ahmad *et al.*, 2010). Das Wasserstoffperoxid wiederum kann dann von Katalasen oder durch verschiedene Peroxidasen und Peroxiredoxine weiter abgebaut werden (Ahmad *et al.*, 2010). Wasserstoffperoxid kann allerdings auch durch die Fenton-Reaktion mit Eisen oder Kupfer zu einem Hydroxylradikal reagieren (Koppenol, 1993; Winterbourn, 1995). Für dieses Radikal besitzen die Zellen keinen Abwehrmechanismus, so dass das Hydroxylradikal zu den wohl gefährlichsten ROS zählt (Keyer *et al.*, 1995; Das *et al.*, 1997; Fu und Dean, 1997).

Die positiven und negativen Eigenschaften von ROS machen deutlich, dass die Zellen die mitochondriale Funktion sehr genau regulieren müssen. Eine zu starke mitochondriale Funktion könnte vermehrt zu Fehlern, also zu einer vermehrten ROS-Produktion und demnach zu mehr Schäden führen. Eine zu geringe mitochondriale Funktion hingegen führt zu einem ATP-Mangel der Zelle und dies wiederum könnte zu Beeinträchtigungen der Entwicklung und zellulären Funktionen führen. Daher wird der zelluläre Energiemetabolismus präzise reguliert, sodass sich die Zellen schnell an sich ändernde Umwelt-, bzw. Energieverhältnisse anpassen können.

1.2 Regulation der Energiehomöostase

Metabolische Systeme (wie Organellen, Zellen, Gewebe, oder generell ein gesamter Organismus) befinden sich meist in einem stationären Zustand, in dem die Reaktionsrate und die Konzentrationen der Metabolite konstant vorliegen, oder innerhalb einer eng definierten Grenze variieren (Brand, 1997). Dieses Gleichgewicht wird entweder durch die Menge, Kinetik oder Aktivität der entsprechenden Enzyme, oder aber über die Menge und die Auswirkungen der Metaboliten selbst reguliert. So können die Metabolite direkt die Reaktionsgeschwindigkeit von Enzymen beeinflussen, die sie als Substrate verwenden, oder als Produkte hervorbringen (Brand, 1997). Die Regulation des Metabolismus ist ein komplexer Prozess, der sich aus vielen verschiedenen Faktoren zusammensetzt und nicht nur über die Metabolite selbst reguliert wird. So kann der Energie-Metabolismus sowohl über die Neusynthese von Proteinen, also über die Transkription und Translation, als auch über Abbauprozesse wie beispielsweise über die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse, die Autophagie oder über den Aminosäure- oder Lipid-Katabolismus reguliert werden. Wobei die Ubiquitinierung nicht nur ein Signal des Abbaus sein kann, sondern je nach Anzahl und Position der Ubiquitin-Moleküle auch andere Funktionen ausübt. Die Poly-Ubiquitinierung, also das Anhängen von Ubiquitin-Ketten, ist meist das Erkennungssignal für den Abbau des markierten Substrates über das Proteasom (Thrower *et*

al., 2000), während die Mono-Ubiquitinierung je nach Substrat verschiedene Aufgaben erfüllt. So kann sie zum Beispiel die DNA-Reparatur, die Gen-Expression oder die Histon-Funktion regulieren (Sadowski *et al.*, 2012). Doch der wohl wichtigste Signalweg zur Regulation der Energie-Homöostase ist der AMPK-mTOR-Signalweg, da dieser Prozess direkt den ATP-, bzw. AMP-Gehalt der Zelle wahrnehmen und darauf reagieren kann.

1.2.1 AMPK- mTOR Signalweg

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein heterotrimerer Proteinkomplex, bestehend aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen Untereinheiten, den β - und γ -Untereinheiten (Abb. 1.3). Im Menschen existieren zwei α -Untereinheiten ($\alpha 1$ und $\alpha 2$) (Stapleton *et al.*, 1996), zwei β -Untereinheiten ($\beta 1$ und $\beta 2$) (Thornton *et al.*, 1998) und insgesamt drei γ -Untereinheiten ($\gamma 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$) (Cheung *et al.*, 2000). Je nach Lokalisation und Funktion, ist jeder AMPK-Komplex aus jeweils einer dieser Untereinheiten aufgebaut. Insgesamt sind somit 12 verschiedene AMPK-Zusammensetzungen möglich (Ross *et al.*, 2016b). In der Hefe besteht der AMPK-Komplex, hier auch als SNF1-Komplex („sucrose non-fermenting 1“) bekannt, aus einer katalytischen α -Untereinheit (SNF1) (Nayak *et al.*, 2006), aus einer von drei möglichen regulatorischen β -Untereinheit (SIP1, SIP2 oder GAL83) (Schmidt und McCartney, 2000; McCartney *et al.*, 2005) und aus der regulatorischen γ -Untereinheit (SNF4) (Celenza *et al.*, 1989).

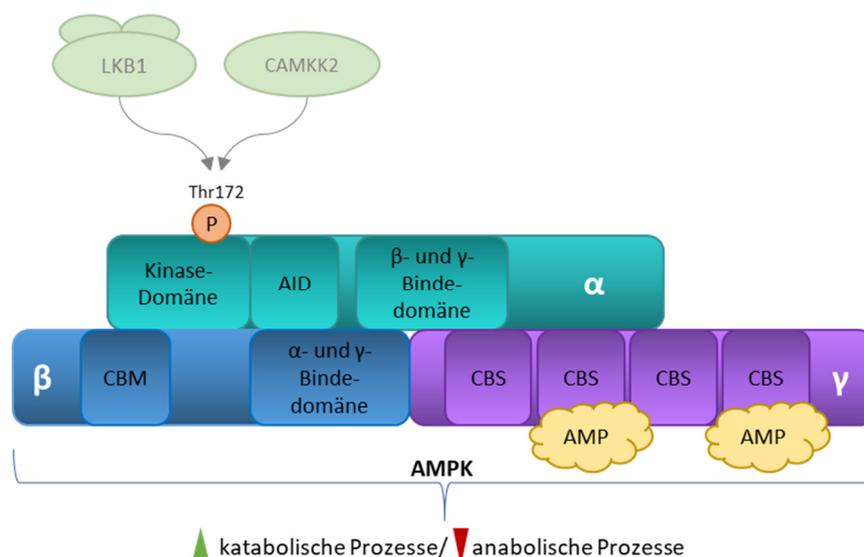


Abbildung 1.3: Aufbau der AMP-aktivierten Proteinkinase.

Die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) ist ein heterotrimerer Proteinkomplex und besteht aus einer katalytischen α -Untereinheit und zwei regulatorischen Untereinheiten, den β - und γ -Untereinheiten. Neben einer Kinase-Domäne, besitzt die α -Untereinheit noch eine AID- („auto-inhibitory domain“) und eine β - und γ -Binde-domäne. Die β -Untereinheit enthält neben der α - und γ -Binde-domäne zusätzlich eine CBM-Domäne („carbohydrate-binding module“). Die AMPK kann den AMP-Gehalt der Zelle durch die Bindung von AMP an den CBS-Domänen („cystathionine- β -synthase“-Domänen) der γ -Untereinheit wahrnehmen. Bei AMP-Bindung vollzieht der Komplex eine Konformationsänderung, was die Affinität der übergeordneten Kinasen steigert und die aktivierende Phosphorylierung der α -Untereinheit schützt. Der Tumor-Suppressor LKB1 („liver kinase B1“)

und die Kalzium-sensitive Kinase CAMKK2 aktivieren die AMPK durch die Phosphorylierung des Threonin-Restes 172 der α -Untereinheit. Hierbei aktiviert LKB1 die AMPK bei steigendem AMP- und fallendem ATP-Gehalt, während CAMKK2 die AMPK bei einer veränderten Kalzium-Homöostase aktivieren kann. Modifiziert nach Herzig und Shaw (2018).

Da die AMPK in Säugern sehr gut beschrieben ist und die Funktion weitestgehend konserviert zu sein scheint, wird im Folgenden, wenn es nicht anders erläutert wird, auf die AMPK und den mTOR-Komplex der Säugetiere eingegangen. Die AMPK gilt als der Haupt-Energiesensor der Zelle. Hierbei kann dieser Kinase-Komplex den AMP-Gehalt in der Zelle wahrnehmen und darauf reagieren. Die γ -Untereinheit der AMPK besitzt vier Tandem-Cystathionin- β -Synthase (CBS)-Domänen an denen die Adenosin-Nukleotide binden können (Xiao *et al.*, 2007) (siehe Abb. 1.3). Die Adenosinmonophosphat (AMP)-Bindung an die CBS-Domäne der γ -Untereinheit der AMPK erhöht deren Aktivität, da sie die aktivierende Phosphorylierung am konservierten Threonin-Rest 172 (Thr172) der α -Untereinheit fördert (Ross *et al.*, 2016a). Zudem bewirkt die Bindung von AMP, aber auch von Adenosindiphosphat (ADP) eine Konformationsänderung der Kinase, welche die aktivierende Phosphorylierung schützt, sodass diese Stelle für eine Dephosphorylierung unerreichbar ist (Davies *et al.*, 1995; Hawley *et al.*, 1995; Sanders *et al.*, 2007; Ross *et al.*, 2016a). Auch ATP ist in der Lage, an der γ -Untereinheit zu binden und hebt somit die schützende Eigenschaft der AMP-Bindung auf (Hardie *et al.*, 2011). Damit ist die AMPK in der Lage auf sich ändernde AMP/ATP-Verhältnisse zu reagieren.

Der Komplex unterliegt einer Aktivierungsschleife durch die katalytische α -Untereinheit (Yan *et al.*, 2018). Diese Aktivierungsschleife wird durch übergeordnete Kinasen aktiviert. Die bedeutsamste dieser Kinasen ist der Tumor-Suppressor LKB1 („liver kinase B1“) (Woods *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005). Bei einem steigendem AMP-Gehalt und gleichzeitig sinkendem ATP-Gehalt, aktiviert LKB1 die katalytische α -Untereinheit der AMPK. Diese wiederum phosphoryliert spezifische Enzyme zur Reduzierung des ATP-Verbrauch sowie zur Induzierung der ATP-Generierung (Herzig und Shaw, 2018). Bei einem Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration wird die AMPK allerdings unabhängig von LKB1 von der Kalzium-sensitiven Kinase CAMKK2 (oder auch CAMKK β) aktiviert (Hawley *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2005). Auch bei zellulärem Stress, wie zum Beispiel bei Aminosäuren-Mangel (Ghislat *et al.*, 2012) oder bei Hypoxie, also bei Sauerstoffmangel in den Geweben, aktiviert CAMKK2 die AMPK (Mungai *et al.*, 2011). In Mäusen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass CAMKK2 unter bestimmten Stressbedingungen die Aktivierung durch LKB1 teilweise übernehmen kann (Fogarty *et al.*, 2010).

Als Gegenspieler der AMPK agiert die Serin/Threonin-Kinase mTOR („mammalian target of rapamycin“). Es existieren zwei biochemisch und funktionell unterschiedliche mTOR-Komplexe, mTORC1 und mTORC2 (siehe Abb. 1.4) (Loewith *et al.*, 2002). Während der mTORC1-Komplex für die Regulation der Autophagie, des Wachstums und der Zellteilung, der Protein-Biosynthese und des Metabolismus wichtig ist, ist mTORC2 durch die Kontrolle der AKT-Kinase, SGK1 („serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1“) und von PKC- α („protein kinase C- α “) an der Regulation des

Metabolismus (überwiegend am Lipid- und Glukose-Metabolismus), der Apoptose und der Organisation des Cytoskeletts beteiligt (Laplante und Sabatini, 2012). Beide Komplexe besitzen mTOR als katalytische Untereinheit. mTORC1 besitzt zudem noch fünf andere Komponenten: RAPTOR („regulatory-associated protein of mTOR“), mLST8 („mammalian lethal with Sec13 protein 8“/GβL), PRAS40 („proline-rich AKT substrate 40 kDa“), DEPTOR („DEP-domain-containing mTOR-interacting protein“) und dem Tit1/Tel2-Komplex (Tel2: „telomere maintenance 2“; Tit1: „Tel2 interacting protein 1“) (Laplante und Sabatini, 2012).

mTORC2 besteht neben mTOR, DEPTOR, mLST8 und dem Tit1/Tel2-Komplex noch aus den folgenden vier Komponenten: RICTOR („rapamycin-insensitive companion of mTOR“), mSIN1 („mammalian stress-activated PK-interacting protein-1“), PROTOR-1/2 und gegebenenfalls aus HSP70 („heat shock protein 70-α“) (Martin *et al.*, 2008; Laplante und Sabatini, 2012).

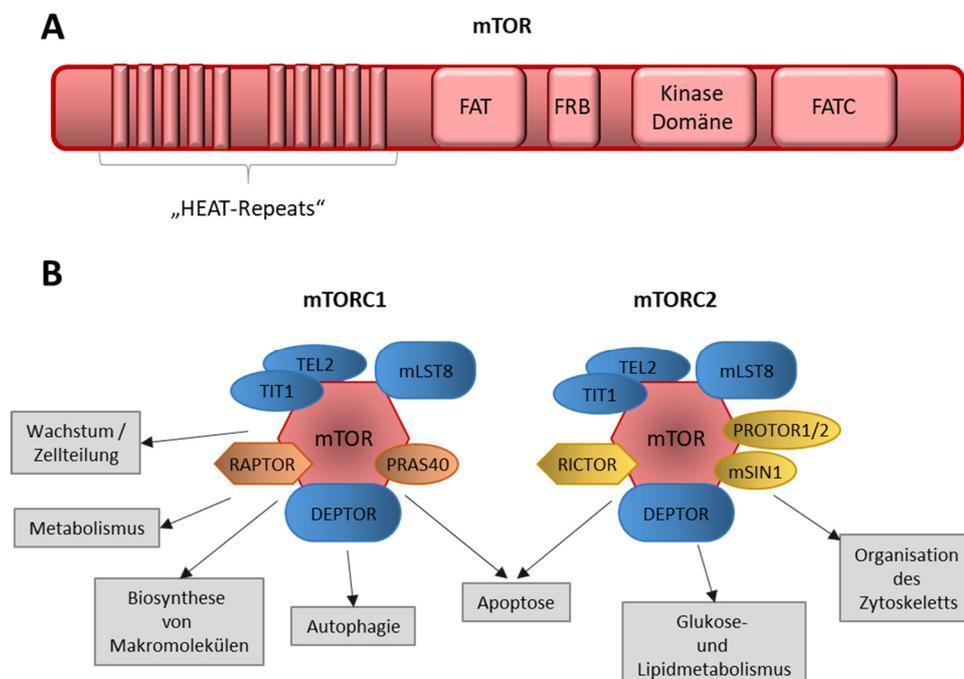


Abbildung 1.4: Aufbau und Funktionen von mTORC1 und mTORC2 bei Säugetieren.

(A) mTOR („mammalian target of rapamycin“) besitzt neben den sogenannten „HEAT-Repeats“, einem Protein-Tandem-Wiederholungsstrukturmotiv, das zur Interaktion mit regulatorischen Proteinen wichtig ist und so für die Bildung der mTOR-Komplexe (mTORC1 und mTORC2), zwei FAT-Domänen („transactivation domain-associated protein domain“), eine am C-Terminus (FATC) und eine zwischen den „HEAT-Repeats“ und der FRB-Domäne („rapamycin binding domain“). Zwischen der FRB-Domäne und der FATC-Domäne befindet sich die Kinase-Domäne von mTOR. **(B)** Es existieren zwei mTOR-Komplexe mit unterschiedlichen Aufgaben, mTORC1 und mTORC2. Beide Komplexe besitzen mTOR als Hauptkomponente. Des Weiteren teilen sie sich die Untereinheiten TIT1 („Tel2 interacting protein 1“), mLST8 („mammalian lethal with Sec13 protein 8“), TEL2 („telomere maintenance 2“) und DEPTOR („DEP-domain-containing mTOR-interacting protein“). mTORC1 besitzt zudem noch die Rapamycin-sensitive RAPTOR-Komponente („regulatory-associated protein of mTOR“) und PRAS40 („proline-rich AKT substrate 40 kDa“), während mTORC2 noch aus RICTOR („rapamycin-insensitive companion of mTOR“), mSIN1 („mammalian stress-activated PK-interacting protein-1“) und PROTOR1/2 besteht. Beide Komplexe erfüllen verschiedene Funktionen in der Zelle (graue Kästchen). Beide sind wichtig für die Regulation des Metabolismus und der Apoptose. Darüber hinaus ist mTORC1 ein wichtiger Regulator für das Wachstum, bzw. die Zellteilung, der Biosynthese von Makromolekülen und der Autophagie. mTORC2 hingegen reguliert Prozesse wie den Glukose- und Lipidmetabolismus und die Organisation des Zytoskeletts. Modifiziert nach Laplante und Sabatini (2012) und Perez-Alvarez *et al.* (2018).

mTOR ist eines der Ziele von AMPK und kann direkt von diesem Komplex phosphoryliert werden (Cheng *et al.*, 2004). Weitere Studien zeigten, dass die AMPK mTOR auch indirekt durch die Phosphorylierung der übergeordneten Kinasen inhibieren kann (Inoki *et al.*, 2003). Für die Energie-Homöostase ist die Beziehung zwischen AMPK und mTORC1 von Bedeutung, da hierdurch unter anderem die Proteinsynthese, die Lipid-Biosynthese, die Autophagie und das Zellwachstum reguliert wird (Deldicque *et al.*, 2005; Laplante und Sabatini, 2009; Inoki *et al.*, 2012; Laplante und Sabatini, 2012). Unter Nahrungs-reichen Konditionen stimuliert mTOR anabolische Prozesse (ATP-verbrauchende Prozesse) und inhibiert beispielsweise Prozesse wie die Autophagie (Kim *et al.*, 2011; Howell *et al.*, 2013). So kommt es, dass AMPK und mTOR in einem „Yin-Yang“-ähnlichen Mechanismus katabolische (ATP-generierende) und anabolische Signalwege regulieren (Herzig und Shaw, 2018). Somit sind beide Komplexe für die Anpassung an sich ändernde Energie- und Umwelt-Verhältnisse von großer Bedeutung.

Besonders sticht dabei die Bedeutung der beiden Komplexe für die Autophagie hervor. Während mTOR die Autophagie bei Nahrungs-reichen Bedingungen inhibiert, sorgt AMPK bei ATP-Mangel durch die Inhibierung von mTOR und die Phosphorylierung von ULK1 (auch bekannt als ATG1) für eine Induktion der Autophagie (Kim *et al.*, 2011). Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei einer gesteigerten mTOR-Aktivität die Phosphorylierung von ULK1 durch die AMPK gestört ist (Kim *et al.*, 2011).

1.2.2 Autophagie

Ein bedeutsamer Prozess zur Aufrechterhaltung der zellulären Funktionen ist die Autophagie. Als Autophagie wird ein intrazelluläres Abbau-System bezeichnet, welches zytoplasmatische Komponenten zum Lysosom (bei Säugetieren) oder zur Vakuole (bei Pflanzen und Pilzen) befördert, wo sie abgebaut bzw. wiederverwendet werden (Levine und Klionsky, 2004). Der Begriff „Autophagie“ lässt sich von den griechischen Wörtern „autos“ (=selbst) und „phago“ (=essen) ableiten und bedeutet demnach so viel wie „Selbstverzehrung“ (Levine und Klionsky, 2004). Der eigentliche Prozess der Autophagie besteht aus verschiedenen Schritten, die aufeinander aufgebaut sind. Hierbei werden verschiedene Arten der Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Chaperon-vermittelte Autophagie und Makroautophagie (siehe Abb. 1.5). Zusätzlich wird bei der Autophagie zwischen selektiver und nicht-selektiver, der generellen Autophagie unterschieden. Während bei der selektiven Autophagie zielgerichtet nur bestimmte Proteine oder Organellen abgebaut werden (Stolz *et al.*, 2014), ist bei der generellen, nicht selektiven Autophagie der Prozess ungerichtet und meist zufällig. Dabei werden Proteine mit unterschiedlichen Halbwertszeiten gleichermaßen abgebaut (Seglen *et al.*, 1990).

Unter Mikroautophagie wird der direkte, meist nicht-selektive Abbau von zytosolischem Material durch die Invagination und Spaltung der vakuolären, bzw. lysosomalen Membran verstanden (Uttenweiler und Mayer, 2008; Li *et al.*, 2012) (siehe Abb. 1.5). Unter Berücksichtigung von Studien der vergangenen Jahre wurde die Mikroautophagie in drei Typen eingeteilt (siehe Abb. 1.5). Bei Typ I tritt die lysosomale bzw. vakuoläre Membran vor und diese Ausstülpungen schließen unspezifische Teile des Zytoplasmas ein (de Waal *et al.*, 1986; Oku und Sakai, 2018). Bei Typ II kommt es zur „lysosomalen bzw. vakuolären Invagination“, also zur Einstülpung der Membran, während es bei Typ III zur Invagination der endosomalen Membran kommt und so Teile des Zytoplasmas abgeschnürt werden. Typ III, also die „endosomale Invagination“ ist ein selektiver, Mikroautophagie-ähnlicher Prozess, bei welchem zytosolische Proteine von den Vesikeln des späten Endosomen bzw. von multivesikuläre Körper („multivesicular bodies“; MVBs) aufgenommen und anschließend mit diesen Vesikeln oder MVBs zur Vakuole bzw. zum Lysosom transportiert werden (Sahu *et al.*, 2011). Bei dieser Art von Mikroautophagie spielt HSC70-4 („heat shock cognat protein of 70 kDa“ ein Chaperon der Familie des „70-kDa Hitzestress Protein“ (HSP70)) eine essentielle Rolle für die Krümmungen der Membranen (Uytterhoeven *et al.*, 2015). Trotz dieser Beteiligung eines Chaperons zählt diese Art der Autophagie nicht zu der „klassischen“ Chaperon-vermittelten Autophagie.

Die Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) ist verantwortlich für den Abbau von ca. 30 % der zytosolischen Proteine unter einem längeren Nährstoffmangel in Säugetieren (Dice, 2007). Auffällig ist, dass die meisten Proteine, die über CMA abgebaut werden, eine bestimmte Peptidsequenz (eine KFERQ-ähnliche Sequenz) besitzen (Dice und Chiang, 1989; Dice, 1990; Kirchner *et al.*, 2019). Möglicherweise kann diese Erkennungssequenz auch bei einigen Proteinen als Abbausignal posttranslational angefügt werden (Gracy *et al.*, 1998). Diese Art der Peptidabfolge wird von dem zytosolischem HSC70-Chaperon erkannt (Kirchner *et al.*, 2019). HSC70 stimuliert die Translokation von Proteinen durch Membranen (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Agarraberes und Dice, 2001b). Zusammen mit anderen Co-Chaperonen dieser Proteinfamilie transportiert HSC70 das Substrat zum Lysosom (bzw. zur Vakuole) (Agarraberes und Dice, 2001a) (siehe Abb. 1.5). Der Chaperon-Komplex bindet an LAMP-2A („Lysosomal associated membrane protein 2a“), ein Rezeptor, der in der lysosomalen Membran lokalisiert ist (siehe Abb. 1.5). Dort bewerkstelligt LAMP-2A den Transport der Substrate in das lysosomale Lumen (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rout *et al.*, 2014; Issa *et al.*, 2018). Diese Assoziation des Chaperon-Komplexes und LAMP-2A ist erforderlich für die Translokation des Substrates in das Lumen des Lysosoms (Bandyopadhyay *et al.*, 2008; Rout *et al.*, 2014; Issa *et al.*, 2018).

Der Begriff „Autophagie“ wird meist nur für die Makroautophagie verwendet, sofern es nicht explizit anders erläutert wird (Mizushima, 2007). Die Makroautophagie ist der am besten charakterisierte Autophagie-Prozess und beinhaltet die Bildung von Doppelmembran-Vesikeln, den sogenannten Autophagosomen, in denen die abzubauenen Proteine und Organellen eingeschlossen

und zum Lysosom bzw. zur Vakuole transportiert werden (Yang und Klionsky, 2010) (siehe Abb. 1.5). Die Makroautophagie kann selektiv, also gerichtet, oder nicht-selektiv sein. Bei der selektiven Autophagie werden über spezifische Adapter- und Cargo-Rezeptor-Proteine bestimmte Organellen und Proteine abgebaut (Johansen und Lamark, 2011). Die selektive Autophagie wurde je nach Ziel des Abbauprozesses in verschiedene Klassen unterteilt. So werden beispielsweise bei der Mitophagie Mitochondrien (Lemasters, 2005), bei der Pexophagie Peroxisomen (Veenhuis *et al.*, 1983; Tuttle *et al.*, 1993) oder bei der Xenophagie einige Pathogene wie Viren oder Bakterien und andere zellfremde Bestandteile abgebaut (Bauckman *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2019b). Die verschiedenen Klassen der Autophagie sind in Abbildung 1.5 zusammengefasst.

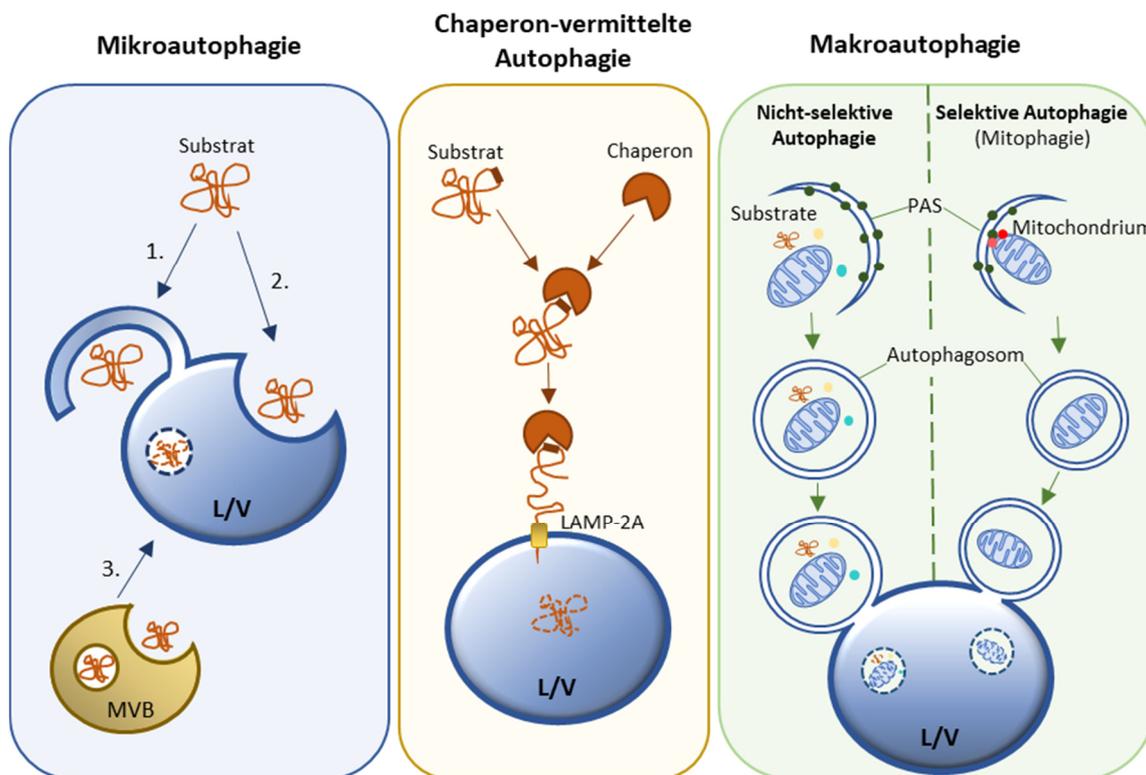


Abbildung 1.5: Arten der Autophagie.

Es gibt drei übergeordnete Arten der Autophagie: Mikroautophagie (blaues Kästchen), Chaperon-vermittelte Autophagie (gelbes Kästchen) und die Makroautophagie (grünes Kästchen). Bei der Mikroautophagie gibt es drei verschiedene Wege, wie das Substrat in das Lysosom bzw. in die Vakuole (L/V) gelangt. 1. Durch das Vortreten der Vakuolen- bzw. Lysosomenmembran und dadurch die Einverleibung des Substrates. 2. Durch Invagination der Vakuolen- bzw. Lysosomenmembran. 3. Über sogenannte multivesikuläre Körper (MVB) oder auch über späte Endosomen wird das Substrat zur Vakuole bzw. zum Lysosom transportiert und anschließend abgebaut. Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie werden die Substrate, welche eine bestimmte Erkennungssequenz besitzen, mit Hilfe von Chaperonen zur Vakuole bzw. zum Lysosom transportiert und anschließend über LAMP-2A in das Lumen transloziert und degradiert. Bei der Makroautophagie wird zwischen der generellen (nicht-selektiven) und der selektiven Autophagie unterschieden (hier am Beispiel der Mitophagie dargestellt). Bei der nicht-selektiven Autophagie bildet sich eine prä-autophagosomale Struktur (PAS) um unspezifische Teile des Zytoplasmas, während bei der selektiven Autophagie bestimmte Substrate, wie z. B. Mitochondrien über Adapterproteine zum PAS transportiert werden. Die Adapterproteine (rote Punkte) interagieren mit ATG8 (LC3 in Säugetieren; grüne Punkte am PAS) und sorgen so dafür, dass sich die Membranen um dieses spezifische Substrat bilden. Das entstandene Vesikel mit einer Doppelmembran (Autophagosom) transportiert die zu degradierenden Substrate zur Vakuole bzw. zum Lysosom. Abschließend verschmilzt die äußere Autophagosomen-Membran mit der Vakuolen- bzw. Lysosomen-Membran und das Autophagosom wird aufgenommen und mitsamt der Substrate abgebaut.

An der Autophagie beteiligt sind unter anderem die sogenannten „Autophagie-assoziierten Gene, bzw. Proteine“ (*Atg*, bzw. ATG; „autophagy-related genes/proteins“). In der Hefe sind aktuell bis zu 40 ATGs identifiziert worden (Feng *et al.*, 2015). Einige Orthologe der Hefe-ATGs konnten auch in höheren Eukaryoten beschrieben werden (Feng *et al.*, 2015). Von diesen Proteinen werden ungefähr 18 Proteine zu der sogenannten „Kern-Autophagie-Maschinerie“ („core autophagy machinery“) gezählt, was bedeutet, dass diese Proteine für alle autophagischen Prozesse benötigt werden (Feng *et al.*, 2014). Untergruppen dieser Proteine setzen sich zu Komplexen zusammen, welche für die Autophagosomen-Bildung erforderlich sind.

Einer dieser Komplexe ist der ATG1-Komplex in der Hefe (oder ULK1-Komplex in Säugetieren) bestehend aus ATG1, ATG11, ATG13, ATG17, ATG29 und ATG31 (Mao *et al.*, 2013; Köfinger *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2016) bzw. aus ULK1, ATG13, FIP200 und ATG101 in Säugetieren (Ganley *et al.*, 2009; Mercer *et al.*, 2009). Dieser Komplex ist wichtig für die Autophagie-Induktion und die Induktion der Autophagosomen-Bildung. Zudem vermittelt dieser Komplex, insbesondere die Aktivität von ATG1 die richtige Lokalisation und Anordnung der anderen Proteine an der prä-autophagosomalen Struktur (PAS) (Cheong *et al.*, 2008).

Ein weiterer wichtiger Subkomplex der Autophagie in der Hefe stellt der ATG2-ATG18-Komplex dar (Suzuki *et al.*, 2007). Dieser Komplex interagiert mit ATG9 und sorgt so für den Membran- bzw. den Lipid-Transport, der für das Wachstum des Autophagosomen nach der Bindung des ATG1-Komplexes am PAS wichtig ist (Gómez-Sánchez *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2019a; Noda, 2021). In Säugetieren sind an diesem System ATG2, ATG9A/B und WIPI1/2 beteiligt (Chao *et al.*, 2018).

Des Weiteren ist die Interaktion einiger ATGs wichtig für die Expansion und Fertigstellung des Autophagosoms. Gleich zwei Ubiquitin-ähnliche Proteine sind daran beteiligt, zum einem ATG12 und zum anderen ATG8 (Geng und Klionsky, 2008). ATG8 wird mithilfe von ATG4 und dem ATG12-Komplex (ATG12, ATG5 und ATG16) auf Phosphatidylethanolamin (PE) übertragen (Hanada *et al.*, 2007). Diese Modifikation sorgt dafür, dass das ansonsten lösliche ATG8 (in Säugetieren LC3), Membran-gebunden ist (ATG8-PE; in Säugetieren LC3-II). Der ATG12-Komplex vermittelt somit die Verteilung von ATG8 sowohl in die innere als auch in die äußere Autophagosomen-Membran (Hanada *et al.*, 2007). Die Verteilung von ATG8 ist essentiell für das Wachstum des Autophagosoms.

Das fertige Autophagosom wird schließlich zur Vakuole bzw. zum Lysosom transportiert. Die äußere Autophagosomen-Membran verschmilzt mit der Vakuolen- bzw. Lysosomen-Membran und das Autophagosomen wird aufgenommen. In der Hefe wird diese Verschmelzung von dem ATG17-ATG37-ATG29-Komplex und ATG11 durch die Rekrutierung des vakuolären SNARE („soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“)-Proteins VAM7 zum Autophagosom reguliert (Liu *et al.*, 2016). VAM7 ist jedoch nicht das einzige SNARE-Protein, welches für diese

Autophagosomen-Vakuolen-Verschmelzung wichtig ist. Beispielsweise ist auch das SNARE-Protein YKT6 am Autophagosom und die SNARE-Proteine VAM3 und VITL1 an der Vakuolen-Membran für diesen Prozess von Bedeutung (Bas *et al.*, 2018). Die übriggebliebenen Vesikel in der Vakuole (bzw. im Lysosom) mit einer Einzelmembran („autophagische Körper“) werden nun von verschiedenen Enzymen abgebaut. Die durch den Abbauprozess entstehenden Moleküle werden abschließend über Permeasen in der Vakuolenmembran (beispielsweise über ATG22) ins Zytosol entlassen und können so wieder dem Metabolismus und anderen Signalwegen zugeführt werden (Yang *et al.*, 2006). Dieser für die Hefe beschriebener Prozess ist hoch konserviert und kann auch auf Säugetier-Zellen übertragen werden.

1.2.3 Mitochondriale Qualitätskontrolle

Mitochondrien sind für die Energie-Homöostase von essentieller Bedeutung. Daher ist es wichtig, die mitochondriale Funktion aufrecht zu erhalten. Da Mitochondrien einer der Hauptentstehungsorte der ROS sind, sind diese Organellen besonders anfällig für oxidative Schäden. Zudem ist es für den Organismus wichtig, die mitochondriale Funktion aufrecht zu erhalten, da sie einer der Hauptenergielieferanten in Form von ATP sind. Es gibt viele verschiedene Mechanismen der mitochondrialen Qualitätskontrolle. Auch die im Abschnitt zuvor beschriebene Mitophagie zählt zu dieser Qualitätskontrolle, wobei geschädigte Mitochondrien abgebaut werden. Des Weiteren zu nennen sind beispielsweise Wege zur ROS-Entgiftung oder Prozesse der DNA-Reparatur, welche Schäden der mitochondrialen DNA (mtDNA) erkennen und beheben können (Kazak *et al.*, 2012).

Mitochondrien besitzen ihr eigenes Genom. Die zirkuläre mitochondriale DNA (mtDNA) von Säugetieren trägt die Sequenz für insgesamt 13 Proteine, welche unter anderem essentiell für die oxidative Phosphorylierung (Elektronentransportkette) sind (Gustafsson *et al.*, 2016). Nach der Endosymbionten-Theorie ist die Anwesenheit der mtDNA damit zu erklären, dass während der Evolution eukaryotische Zellen durch eine Endosymbiose mit Bakterien entstanden sind und dass die Organellen aus dieser Endosymbiose übrig geblieben sind (Martin *et al.*, 2015), also durch die Einverleibung dieses Bakteriums. Neuere Theorien besagen, dass die Ursprungswirtszelle dieses Prozesses ein Archaeobakterium war (Martin *et al.*, 2015).

Einige Schäden der Mitochondrien können durch die ständige Fusion und Fission dieser Organellen behoben werden (Twig *et al.*, 2008b). Bei zu großen Schäden werden Teile des Netzwerkes über Mitophagie abgebaut (Twig *et al.*, 2008a), während andere, kleinere Beeinträchtigungen wiederum durch die Fusion mit einem intakten Mitochondrium behoben werden können (Twig *et al.*, 2008b). Das Ubiquitin-Proteasom-System, kann mitochondriale Proteine an der äußeren Membran ubiquitinieren und degradieren, oder aber, bei zu großen Schäden, die Mitophagie induzieren (Taylor und Rutter, 2011). Für den Abbau fehlgefalteter oder anderweitig geschädigter Proteine innerhalb der Mitochondrien sind eine Reihe mitochondrialer Proteasen zuständig (Quirós *et al.*, 2015).

1.2.3.1 Proteasen der mitochondrialen Qualitätskontrolle

Mitochondriale Proteasen, auch bekannt als Mitoproteasen, sind ein wichtiger Bestandteil der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle („mitochondrial protein quality control“, MPQC). In Säugetieren sind bis zu 45 Mitoproteasen identifiziert worden (Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Diese Proteasen können in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden, den intrinsischen Mitoproteasen, die fest in den Mitochondrien lokalisiert sind und den transienten Proteasen, die zwischen dem Zytosol und den Mitochondrien wechseln können (Quirós *et al.*, 2015; Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Beim Menschen gehören 23 Mitoproteasen der ersten Gruppe an. Sie können sich in der Matrix, der inneren Mitochondrienmembran, dem Intermembranraum oder der äußeren Mitochondrienmembran befinden und sind an der Regulation der meisten mitochondrialen Prozesse beteiligt (Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Aufgrund des möglichen gemeinsamen Ursprungs der Mitochondrien, liegt es nahe, dass die meisten dieser Proteine und deren Funktionen in verschiedenen Organismen konserviert sind. Tatsächlich sind die meisten der fest in den Mitochondrien vorkommenden Proteasen hochkonserviert (Koppen und Langer, 2007).

Fünf dieser intrinsischen Proteasen sind sogenannte Pseudomitoproteasen, welche keine eigene katalytische Aktivität besitzen, allerdings als Untereinheiten proteolytischer Komplexe funktionieren (Quirós *et al.*, 2015). Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten die übriggebliebenen 18 Mitoproteasen zu klassifizieren. Eine Möglichkeit ist, die Proteasen nach ihrer Lokalisation in den Mitochondrien zu gruppieren. Eine Weitere ist, die Proteasen nach ihrer Funktion in Klassen zu unterteilen. Jadiya und Tomar (2020) beispielsweise unterteilten diese Proteasen in drei katalytische Klassen: den „Metalloproteasen“, den „Cysteinproteasen“ und den „Serinproteasen“. Deshwal *et al.* (2020) hingegen entschieden sich, die verbliebenen Proteasen in vier funktionelle Gruppen einzuteilen: „Prozessierende Peptidasen“, „ATP-abhängige Peptidasen“, „Oligopeptidasen“ und „andere mitochondriale Peptidasen“. Aufgrund der großen Menge an Informationen, würde eine umfangreiche Darstellung aller Mitoproteasen zu weit führen. Im Rahmen dieses Kapitels werden daher nur einige der intrinsischen Mitoproteasen beschrieben, welche an der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle beteiligt sind.

Im Intermembranraum (IMS; „Intermembrane space“) sind einige Metallo- und Serinproteasen lokalisiert (Quirós *et al.*, 2015; Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Darunter befinden sich die Serinprotease HTRA2 („high-temperature requirement peptidase 2“) und die Metalloprotease ATP23. HTRA2 spielt unter anderem eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Cristae-Struktur (Botham *et al.*, 2019). Außerdem ist HTRA2 in der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle involviert und ist somit mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase (Kang *et al.*, 2013). Die hochkonservierte Metalloprotease ATP23 ist für

die Prozessierung und richtige Zusammensetzung der ATP-Synthase-Untereinheit 6 (ATP6) verantwortlich (Zeng *et al.*, 2007) und wird generell mit der Qualitätskontrolle der ATP-Synthase in Verbindung gebracht. Zudem sorgt ATP23 für die Assoziation von reifem ATP6 mit ATP9-Oligomeren (Osman *et al.*, 2007).

Auch in der inneren Mitochondrienmembran (IMM; „inner mitochondrial membrane“) befinden sich verschiedene Serin- und Metalloproteasen (Quirós *et al.*, 2015; Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Darunter zählen auch zwei konservierte ATP-abhängige Proteasen, die iAAA- und die mAAA-Protease (AAA = „ATPase associated with diverse cellular activities“). Diese Proteasen sind in der IMM verankert, wobei das aktive Zentrum der iAAA-Protease in den IMS ragt und das aktive Zentrum der mAAA-Protease zur mitochondrialen Matrix ausgerichtet ist (Arlt *et al.*, 1996; Leonhard *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998). Beide Proteasen sind überwiegend an dem Abbau geschädigter Proteine in der IMM beteiligt, zum Beispiel Komponenten der Elektronentransportkette, und sorgen so für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion (Leonhard *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998). Für i-AAA-Proteasen (z. B. YME1L im Menschen) konnte zudem gezeigt werden, dass sie den Protein-Import in die Mitochondrien und den Lipid-Transport zwischen den mitochondrialen Membranen kontrollieren (Quirós *et al.*, 2015; Deshwal *et al.*, 2020).

In der mitochondrialen Matrix sorgen Proteasen zusammen mit einer Reihe von Chaperonen für die Degradation, Faltung und korrekte Funktion von Proteinen. Zwei dort vorkommende Proteasen der „AAA+“-Superfamilie, die LON-Protease und die CLPXP-Protease („caseinolytic peptidase XP“) sind die für die Proteinqualitätskontrolle wohl wichtigsten Proteasen (Szczepanowska und Trifunovic, 2021). Doch nicht nur in der Proteinqualitätskontrolle sind diese Proteine involviert, jüngste Untersuchungen haben einige Prozesse aufgedeckt, welche von LON und CLPXP reguliert werden. Unter anderem auch die mitochondriale Genexpression oder die Aufrechterhaltung der Elektronentransportkette (Szczepanowska und Trifunovic, 2021).

Die meisten Proteasen sind jedoch nicht nur für den Abbau von Proteinen zuständig, sondern besitzen mehrere Funktionen. Viele Proteasen sind wichtig für die Reifung von Proteinen, die Assemblierung von Proteinkomplexen oder für Signaltransduktionen. So sind die verschiedenen Mitoproteasen unter anderem in die mitochondriale Genexpression, die mitochondriale Dynamik, dem Metabolismus oder die ATP-Generierung involviert (Quirós *et al.*, 2015; Deshwal *et al.*, 2020; Jadiya und Tomar, 2020). Auch bei der LON-Protease konnten mehrere Funktionen nachgewiesen werden, so auch eine Beteiligung an der Regulation des Lipid-Metabolismus (Granot *et al.*, 2007), des Glukose-Metabolismus (Nimmo *et al.*, 2019) und der Aufrechterhaltung der Elektronentransportkette (Besse *et al.*, 2020). Dem CLPXP-Komplex, dem anderen Protease-Komplex in der mitochondrialen Matrix, konnten ähnliche Aufgaben zugeschrieben werden, welche sich teilweise mit den Funktionen der LON-Protease überschneiden. Somit ist die biologische Bedeutung der meisten Proteasen weit

umfangreicher als zunächst angenommen. Obwohl diese regulatorischen Funktionen auch meist auf die proteolytische Aktivität zurückzuführen sind.

1.2.3.2 Der CLPXP-Komplex

Die mitochondriale CLPXP-Protease ist in der Matrix lokalisiert, gehört zu den AAA⁺-Proteasen und besteht aus zwei Komponenten, einem proteolytischem Kernzylinder (CLPP; „caseinolytic peptidase P“) und dem ATPase-Chaperon CLPX (Joshi *et al.*, 2004), wobei CLPP entweder mit einem, oder mit zwei dieser CLPX-Chaperonen gleichzeitig interagieren kann (Liu *et al.*, 2014) (Siehe Abb. 1.6). CLPP besteht aus zwei heptamerischen Ringen, welche jeweils aus sieben Untereinheiten der Serinprotease aufgebaut sind (Wang *et al.*, 1997). CLPX gehört der HSP100 Familie an und bildet eine hexamerische Ringstruktur, die mit dem CLPP-Kernzylinder interagiert (Grimaud *et al.*, 1998).

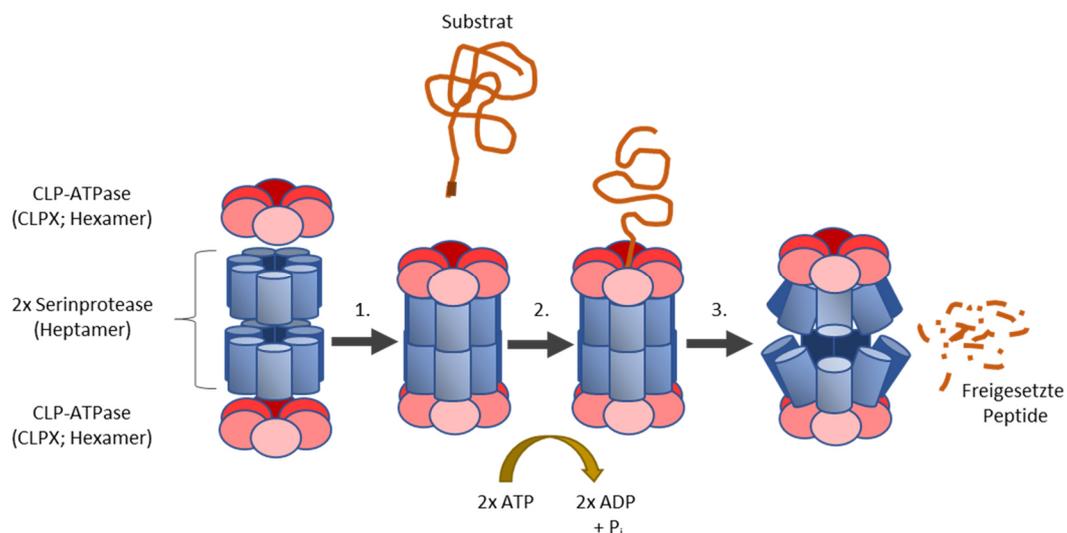


Abbildung 1.6: Aufbau und Funktionsweise von CLPXP.

Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise von CLPXP. Der CLPXP-Komplex besteht aus zwei heptamerischen Serinproteasen, die den proteolytischen CLPP-Kernzylinder bilden. Dieser Zylinder kann mit einer oder zwei hexamerischen CLP-ATPasen interagieren, in diesem Fall mit CLPX, und bildet so den CLPXP-Komplex. Der erste Schritt der Proteolyse ist die Substrat-Erkennung und -Bindung (1.), gefolgt von der Entfaltung und Translokation des Substrates, diese beiden Prozesse finden je unter ATP-Verbrauch statt (2.). Schließlich wird das Substrat in 5-8 Aminosäuren große Peptide gespalten und durch eine Konformationsänderung des Kernzylinders freigesetzt (3.).

Neben CLPX können auch noch andere Chaperone mit CLPP interagieren. In *Escherichia coli* konnte gezeigt werden, dass neben CLPX auch CLPA mit CLPP interagieren kann und dort die regulatorische Komponente bildet. In anderen Organismen wurde gezeigt, dass CLPC als evolutionäres Äquivalent von CLPA mit CLPP interagieren kann (Katayama *et al.*, 1988; Shanklin *et al.*, 1995). Die Chaperone dienen als Regulatoren, welche die Substrate erkennen, entfalten und dem proteolytischen Kernzylinder zuführen. Die Substrate können durch die beiden axialen Poren des Zylinders von CLPP zugeführt

werden (Saunders *et al.*, 2020). Bei der Spaltung der Substrate entstehen Peptidfragmente von 5-8 Aminosäuren (Aubin-Tam *et al.*, 2011). Die anschließende Freisetzung dieser Peptide erfolgt über eine Konformationsänderung des gesamten proteolytischen Kernzylinders (Sprangers *et al.*, 2005; Kimber *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2014).

Aktuell wurden in mehreren Organismen bereits eine Reihe von biologischen Funktionen den CLP-Proteasen zugeschrieben. So konnten die CLP-Proteasen neben der allgemeinen Protein-Qualitätskontrolle auch mit verschiedenen Stressantworten in Verbindung gebracht werden (Hansen *et al.*, 2005; Zellmeier *et al.*, 2006; Molière und Turgay, 2009; Truscott *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2018). Unter anderem wurde in *Staphylococcus aureus* ein Zusammenhang zwischen der CLP-Protease und der Hitzeschock-Regulation, der Antwort auf oxidativen Stress und der DNA-Reparatur gezeigt (Michel *et al.*, 2006). Die wohl am besten untersuchte Stressantwort, bei der CLPXP sowohl in Bakterien, als auch in *C. elegans* oder in Säugetieren involviert ist, ist die Antwort auf ungefaltete, bzw. falsch gefaltete mitochondriale Proteine („mitochondrial unfolded protein response“; UPR^{mt}) (Haynes *et al.*, 2007; Truscott *et al.*, 2011; Al-Furoukh *et al.*, 2015). Dieser Prozess ist wichtig für Signalgebung zwischen Mitochondrien und dem Kern. Die Mehrheit der mitochondrialen Proteine sind kerncodiert, werden im Zytosol synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien importiert (Stuart *et al.*, 1996). Daher ist eine intakte Kommunikation zwischen den Organellen sehr wichtig. Eine Störung der Proteinhomeostase in den Mitochondrien wird von CLPXP wahrgenommen, dadurch werden vermehrt Proteine von dieser Protease degradiert und die Peptide werden ins Zytosol transloziert. Dies hat anschließend eine Hochregulation der Proteinbiogenese und Qualitätskontrollfaktoren, wie beispielsweise weiteren Proteasen, zur Folge (Truscott *et al.*, 2011).

Neben verschiedene Stressantworten konnte in *E. coli* auch ein Zusammenspiel von CLPXP und der Zellteilungs-Maschinerie beobachtet und damit eine weitere biologische Rolle dieser mitochondrialen Protease aufgedeckt werden (Camberg *et al.*, 2011). Auch im Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* wurde beschrieben, dass CLPXP wichtig für die zeitabhängige Zellteilung ist und somit die sogenannte zirkadiane Uhr in diesem Organismus reguliert (Cohen *et al.*, 2018).

Eine weitere Funktion von CLPXP ist die Regulation der mitochondrialen Translation. Es wurde in verschiedenen Organismen gezeigt, dass einige ribosomale Untereinheiten der mitochondrialen Ribosomen zu den Substraten von CLPXP zählen (Flynn *et al.*, 2003; Szczepanowska *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020b). In Säugetieren ist CLPXP für die Reifung und korrekte Zusammensetzung der mitochondrialen Ribosomen wichtig (Seiferling *et al.*, 2016; Szczepanowska *et al.*, 2016).

Auch für die Regulation des Energiemetabolismus scheint CLPXP eine wichtige Rolle einzunehmen (Flynn *et al.*, 2003; Fischer *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2020a). So konnten einige Substrate von CLPXP identifiziert werden, welche beispielsweise an der Glykolyse, dem Citratzyklus, der Elektronentransportkette oder der Aminosäuresynthese beteiligt sind (Flynn *et al.*, 2003; Fischer *et al.*,

2015; Szczepanowska *et al.*, 2016; Szczepanowska *et al.*, 2020). Besonders in der Qualitätskontrolle und des Umsatzes vom Komplex I der Elektronentransportkette scheint CLPXP eine wichtige Rolle einzunehmen (Huang *et al.*, 2020b; Szczepanowska *et al.*, 2020).

All diese Befunde in verschiedenen Organismen beweisen die konservierte biologische Relevanz von CLPXP. Daher ist es umso erstaunlicher, dass der beliebte eukaryotische Modellorganismus *S. cerevisiae* diese mitochondriale Matrix-Protease CLPP nicht besitzt, sondern nur ein Homolog des CLPX-Chaperons (MCX1p) identifiziert werden konnte (van Dyck *et al.*, 1998). Dieser Umstand beweist die Notwendigkeit von verschiedenen eukaryotischen Modellorganismen, um die konservierte biologische Funktion von bestimmten Proteinen untersuchen zu können. Um die Rolle von CLPXP zu untersuchen, würde sich alternativ zu *S. cerevisiae* beispielsweise der filamentöse Ascomycet *Podospora anserina* anbieten. Erste Untersuchungen zur CLPXP in *P. anserina* legten auch hier eine Involvierung dieser Protease in der Regulation des Energiemetabolismus nahe (Fischer *et al.*, 2015). Ein „Substrat-Trapping-Assay“ zeigte, dass viele putative Substrate und Interaktionspartner von PaCLPXP an der Glykolyse, dem Citratzyklus, der Elektronentransportkette oder der Aminosäuresynthese beteiligt sind (Fischer *et al.*, 2015). Interessanterweise führte die Deletion von *PaClpP*, und dadurch das Fehlen von PaCLPP zu einer unerwarteten Lebensspannenverlängerung dieses Pilzes (Fischer *et al.*, 2013). Der Grund dieser Lebensspannenverlängerung ist bislang noch ungeklärt, doch erste Hinweise lassen vermuten, dass die Autophagie hierbei eine wichtige Rolle spielt (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Die Rolle von CLPXP in *P. anserina* bietet ein interessantes Forschungsgebiet und könnte dabei helfen, die biologische Funktion dieser Protease auch in anderen Organismen besser zu verstehen.

1.3 *Podospora anserina* als Modellorganismus zur Entwicklung und Alterung

P. anserina ist ein nicht infektiöser, filamentöser Ascomycet, welcher in der Natur auf dem Dung von Herbivoren wächst. Dieser Pilz bildet ein Geflecht aus Hyphen, welches als Myzel bezeichnet wird. *P. anserina* ist aufgrund der recht einfachen genetischen Manipulation und der leichten Kultivierung im Labor bereits seit mehreren Jahrzehnten ein eukaryotischer Modellorganismus in der Grundlagenforschung (Osiewacz *et al.*, 2010). In der Regel liegt dieser Pilz dikaryotisch vor, wobei zwei unterschiedliche haploide Kerne in mehreren Kopien in den Hyphen vorliegen. Er pflanzt sich über sexuelle Reproduktion fort. Hierbei ist der Organismus bei Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Kernen, mit der Informationen beider Kreuzungstypen im selben Myzel (in *P. anserina* als Paarungstyp „mat+“ oder „mat-“ bekannt (Debuchy und Coppin, 1992)) selbstfertil und bildet Fruchtkörper aus, die sogenannten Perithezien. *P. anserina* zeichnet sich, im Gegensatz zu den meisten anderen Ascomyzeten, durch eine begrenzte Lebensspanne von 20-25 Tagen aus und ist daher besonders für

die Altersforschung interessant (Rizet, 1953). Vor dem Absterben des Modellorganismus treten deutliche Seneszenz-Merkmale auf, z. B. eine reduzierte Wachstumsrate, eine verstärkte Pigmentierung und der Verlust des Luftmyzels (Rizet, 1953; Esser und Tudzynski, 1980). Ein weiterer Vorteil dieses Organismus ist, dass er kostengünstig kultivierbar ist. Außerdem ist das Genom von *P. anserina* vollständig sequenziert und annotiert (Espagne *et al.*, 2008), dies erleichtert die Anwendung von bereits etablierten molekularbiologischen Methoden enorm (Osiewacz *et al.*, 2013).

Schon früh wurde der Fokus der Altersforschung in *P. anserina* größtenteils auf die Mitochondrien gelegt. Hier wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen der Reorganisation der mtDNA und der Alterung hergestellt (Stahl *et al.*, 1978). Während der Alterung nehmen die Schäden in den Mitochondrien durch die vermehrte Freisetzung der sogenannten plDNA („plasmid-like DNA“) und dem gleichzeitigen vermehrten Verlust mitochondrialer Gene zu (Kück *et al.*, 1981; Kück *et al.*, 1985; Albert und Sellem, 2002). In langlebigen Mutanten konnte beobachtet werden, dass diese Instabilität der mtDNA verzögert ist (Osiewacz und Borghouts, 2000), was die Rolle der Mitochondrien für das Einsetzen der Seneszenz in *P. anserina* nahe legt. Es wurde auch gezeigt, dass nicht nur die Instabilität der mtDNA für die Alterung wichtig ist, sondern auch generell die mitochondrialen Prozesse eine große Rolle spielen. Unter anderem wurde nachgewiesen, dass eine Reduzierung von ROS durch eine vermehrte Atmung über die sogenannte alternative Atmung zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt (Osiewacz, 2002b; a). Auch eine Veränderung der mitochondrialen Dynamik, etwa durch die Deletion von *PaDnm1*, ein Gen welches für ein konserviertes Protein kodiert (PaDNM1, Homolog zu DRP1 in Säugetieren), das für die mitochondriale Teilung verantwortlich ist, führt zu einer Lebensspannen-Verlängerung (Scheckhuber *et al.*, 2007). Alle bisherigen Befunde legen nahe, dass sich die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Funktion positiv auf die Alterung von *P. anserina* auswirkt. Daher sind Untersuchungen der mitochondrialen Qualitätskontrolle in diesem Modellorganismus naheliegend.

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass die Manipulation, bzw. die Beeinflussung von verschiedenen mitochondrialen Proteasen in *P. anserina* einen Einfluss auf die Lebensspanne dieses Organismus ausübt. So führt die Überexpression eines Gens, kodierend für die mitochondriale Matrix-Protease PaLON zu einer Lebensspannen-Verlängerung (Luce und Osiewacz, 2009). Während die Deletion dieses Gens in höheren Eukaryoten letal ist, führt sie in *P. anserina* lediglich zu einer Verkürzung der Lebensspanne (Luce *et al.*, 2010; Adam *et al.*, 2012). Dies bedeutet, dass die Qualitätskontrolle, bzw. die Funktion dieser Protease, wichtig für die Regulation der Alterung in *P. anserina* zu sein scheint und beweist die Qualitäten dieses Ascomyzeten als Modellorganismus, da die Deletion dieses Gens in anderen Organismen nicht möglich war.

Interessanterweise führt die Deletion von *Palap*, einem Gen kodierend für eine iAAA-Protease, bzw. von *PaClpP* unerwarteterweise jeweils zu einer Lebensspannen-Verlängerung (Weil *et al.*, 2011;

Fischer *et al.*, 2013). Im Fall der *Palap*-Deletionsmutante konnte ein Temperatur-sensitiver Effekt beobachtet werden, wobei die Deletionsmutante gegenüber dem *P. anserina*-Wildtyp eine erhöhte Hitzesensitivität aufweist (Weil *et al.*, 2011). Dieser Befund legt nahe, dass diese mitochondriale Protease überwiegend bei Hitzestress benötigt wird, während unter Standardbedingungen (27 °C) die Funktion nicht essentiell zu sein scheint. Eine solche Funktion konnte für PaCLPP noch nicht nachgewiesen werden. Erste Untersuchungen zeigen, dass die Langlebigkeit der *PaClpP*-, bzw. der *PaClpXP*-Deletionsmutante Autophagie-abhängig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Dass die *PaClpP*-Deletionsmutante durch das Einbringen einer humanen *HsClpP*-Variante revertiert werden konnte, legt eine hohe Konservierung der PaCLPP-Funktion nahe (Fischer *et al.*, 2013). Dies unterstreicht ein weiteres Mal die Vorzüge von *P. anserina* als Modellorganismus, da Erkenntnisse über die biologische Funktion in diesem Ascomyzeten auch auf andere Organismen übertragen werden könnten.

1.4 Problemstellung

Die Deletion von *PaClpP* resultiert in einer unerwarteten Lebensspannen-Verlängerung ohne sichtbare Einschränkungen des Wachstums, der Fertilität oder der Pigmentierung (Fischer *et al.*, 2013). Die Ursache dieser Langlebigkeit ist bislang noch unklar. Neueste Erkenntnisse legen einen starken Zusammenhang der Langlebigkeit dieser Deletionsmutante mit der Autophagie nahe (Knuppertz und Osiewacz, 2017). So konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung der Autophagie, durch die Deletion von *PaAtg1*, die Langlebigkeit von PaATG1, und somit von der Autophagie abhängig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017).

Anders als bei PaIAP konnte bislang noch keine klare biologische Funktion von PaCLPP in *P. anserina* gefunden werden. Eine Substrat-Analyse mittels eines „*Substrat-trapping-Assays*“ lieferte erste Hinweise auf die biologische Funktion dieser Protease. Hierbei wurde ein Stamm erstellt, welcher eine katalytisch inaktive und markierte CLPP-Variante enthält (Fischer *et al.*, 2015). Dabei zeigte sich, dass die katalytische Inaktivierung von PaCLPP zu einer veränderten Größe dieser Protease in Western-Blot-Analysen führte. Dies könnte darauf hinweisen, dass diese Protease sich selbst durch eine autokatalytische Prozessierung modifiziert (Fischer *et al.*, 2015). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Modifikation für die Substrat-Bindung essentiell ist, wurde daher dieses Experiment ausschließlich mit der humanen Variante durchgeführt (Fischer *et al.*, 2015). Durch diese Analysen konnten erste Hinweise auf die biologische Funktion von CLPP in *P. anserina* erlangt werden. Viele der identifizierten Substrate und Interaktionspartner sind in den Metabolismus, die Glykolyse, den Citratzyklus oder die Elektronentransportkette involviert (Fischer *et al.*, 2015). Dies legt nahe, dass CLPP an der Regulation des Energiemetabolismus beteiligt ist.

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, die biologische Rolle von PaCLPXP und der Einfluss dieser Protease auf den Energiemetabolismus genauer zu untersuchen. Dies soll durch die folgenden Punkte geschehen:

1. Da bei dem „*Substrat-trapping-Assay*“ die humane Variante verwendet wurde, soll nun ein weiteres Verfahren zur Substrat-Analyse angewendet werden. Außerdem soll mit dieser unabhängigen Methode überprüft werden, ob die identifizierten möglichen Substrate durch das Fehlen von PaCLPP angereichert werden.
2. Durch eine Metabolom-Analyse in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtypstamm soll das Ausmaß der Veränderungen durch das Fehlen von PaCLPP untersucht werden.
3. Weiterhin sollte die Ursache der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ untersucht werden. Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass die Autophagie für die Langlebigkeit wichtig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Wie es zu dieser Steigerung des autophagischen Umsatzes kommt, ist noch nicht geklärt.
4. Als Hauptregulator der Autophagie könnte die AMPK ein erster Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen zur Langlebigkeit sein. Dafür wurde zunächst ein Deletionsstamm erstellt und charakterisiert, bei dem das Gen kodierend für die AMPK- α -Untereinheit (*PaSnf1*) deletiert wurde. Parallele Analysen einer anderen Arbeitsgruppe mit einer *PaSnf1*-Deletionsmutante konnten bereits eine erste Charakterisierung dieses Stammes durchführen (Li *et al.*, 2020).
In dieser vorliegenden Arbeit sollten nun die Rolle der AMPK für die Alterung und Entwicklung von *P. anserina* allgemein, sowie der Zusammenhang zwischen der AMPK und der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Alle in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte sind mit den dazugehörigen Modell- und Herstellerangaben in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Gerätschaften inklusive der dazugehörigen Modell- und Herstellerangaben.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	HS 6606 EC-1	Getinge
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	WTC	Binder
	KBW400	
	KBW720	
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
Chemilumineszenz-Detektionssystem	ECL CHEMOSTAR	Intas
Crosslinker	UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Eismaschine	AF 103	Scotsman
Elektroporator	Easyject Prima	Peqlab
Elektrophorese-Kammern (DNA)	Mini SUB Cell GT	BioRad
	Wide-Mini SUB Cell GT	
Elektrophorese-Kammern (Proteine)	Mini-Protean® II Cell	BioRad
	Mini-Protean® Tetra Cell	
Feinwaage	PB 303	Mettler Toledo
Fluoreszenzmikroskop	Cell Observer Spinning Disk, Konfokales Mikroskop	Zeiss
Folienschweißgerät	Futura Junior	Audion
	300 FJR-2	Audion Elektro
Gefrierschrank	(-20) GS 5903	Liebherr
	(-80) MDF-U73V	SANYO
Geldokumentationsgerät	E-Box	Peqlab
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
	Dri-Block DB3	
Homogenisator	Waring Blendor	Waring
	Precellys 24 (Peqlab)	Bertin Technologies
	Bead-Beater™ BB-908-CE	Biospec
Hybridisierungssofen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham
Infrarot-Scanner	Odyssey Infrared Imager 2	LI-COR
Kühlschrank	Profi line (4-8 °C)	Liebherr
Laborabzug	VARIOLAB Mobilien W90	Waldner
Leuchttisch	„slimlite LED“ 2449	Kaiser Fototechnik
Magnetrührer	RCT-B	IKA Labortechnik
	MSH Basic	Roth
	MR3000	Heidolph
Mikroskop	DLMB	Leica

Mikroskop-Kamera	DFC7000 T	Leica
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Safire 2	Tecan
Mikrowelle	Micro-Chef FM B935	Moulinex
Netzteile/Spannungsgeber	EV 243	Consort
	EV 3020	Peqlab
NIR-Dokumentationsgerät	Odyssey® XF Imaging System	LI-COR
PCR-Gerät	T1 Thermocycler	Biometra
pH-Meter	Calimatic 761	Knick
Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Bioscience
Pipetten	10 µl, 25 µl; 50 µl, 100 µl	Hamilton
	Pipetman (5000 µl; 1000 µl; 200 µl; 20 µl; 10µl, 2 µl)	Gilson
Respirometer	Oxygraph-2k C bzw. G	Oroboros Instruments
Röntgenfilm-entwicklungsmaschine	ECOMAX	PROTEC
Schüttelinkubator	HT-Infors	Infors-HT
Schüttler	Rocking Platform	Biometra
	Promay 1020	Heidolph
Spektralfotometer	DS-11	DeNovix
Sterilbank	NSF 49	Clean Air
	LF 460 EC	
Trockenschrank	TKE 117	EHRET
Ultraschallgerät	UW 2070	Bandelin electronic
Ultrazentrifuge	Sorvall WX Ultra 80 mit Rotor TH641	Thermo Fisher
Vakuum-Transferapparatur	VacuGene XL Vacuum Blotting System GE	Healthcare
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Plus SC 110A	Savant
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Waagen	PB 303	Mettler Toledo
	LC 82	
	M-power	Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus	Millipore
Wasserbad	1083	GLF
	MP U3	Julabo
Zentrifugen	5417 R mit FA45-24-11	Eppendorf
	5804 R mit A-4-44 und A-2-DWP	
	Varifuge 3.0	Heraeus Sepatech
	Sorvall RC5B mit Sorvall GSA SLA-1500 und Sorvall SS34	DuPont

2.1.2 Chemikalien und Stoffe

Alle für diese Arbeit verwendeten Stoffe und Chemikalien sind inklusives des Herstellers und der Bestellnummer in Tabelle 2.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Verwendete Stoffe und Chemikalien mit Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Agar	Invitrogen	30391-049
Agarose	Invitrogen	15510-027
Ammoniumacetat	Merck	1116.1000
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck	1.01145.5000
Ampicillin	Roth	K029
Antifoam Y-30 Emulsion	Sigma-Aldrich	A5758
APS	Sigma-Aldrich	9592.2
Arabinose (L-Arabinose)	Sigma-Aldrich	A9, 190-6
Biomalz	Roth	X976.1
Biotin	SERVA	15060
Blasticidin	Roth	CP14.2
Blockierungsreagenz	Roche	14545800
Bromphenolblau	Merck	1.117.460.005
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich	A6003
Calciumchlorid (CaCl ₂ · H ₂ O)	Merck	2382.1000
Casaminosäuren	DIFCO	0231-01-0
Chloroform	Merck	1.02445.2500
Coomassie Blue G250	SERVA	17524
CSPD	Roche	11755633001
Cycloheximid	Sigma-Aldrich	C1988
Dextrin, gelb	Roth	6777.1
DTT	Roth	6908.4
EDTA	Merck	1.08418.1000
EGTA	Sigma-Aldrich	E4378
Eisen(II)-Chlorid (FeCl ₂) · 4 H ₂ O	Merck	1.03861.0250
Essigsäure	Roth	3738.5
Ethanol p.A.	Roth	9065.2
Ethidiumbromid	Roth	HP46.1
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich	F-3754
Glukose-Monohydrat	Merck	1.08342.2500
Glycerin	Roth	4043.3
Harnstoff	Merck	1.08487.0500
Hefeextrakt	VWR	20254
	DIFCO	0127-07
HEPES	SERVA	25245
Heringssperma-DNA	SERVA	18580
Hygromycin B	Calbiochem	400051
Isoamylalkohol	Merck	979.25
Isopropanol (2-Propanol)	Roth	6752.4
Kaliumacetat	Roth	4986.1
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	1.04936.1000
Kaliumcyanid (KCN)	Fluka	60178
K ₂ HPO ₄	Merck	P749.1
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873.1000
KOH	Merck	5033.1000
Lauroylsarkosin	Sigma-Aldrich	L-5125
Leucin (L-Leucin)	Sigma-Aldrich	L-8000
Maismehl	Cornexo	-

Malzextrakt	Roth	X976.1
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	Merck	5833.1000
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Merck	1.05886.0500
Manganchlorid ($\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	Merck	5.934.0100
Mangansulfat ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	SERVA	28405
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	M6250
Methanol	Roth	4627.5
„MitoTracker™ Red CMXRos“	Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes	M7512
Natriumacetat (NaAc)	Merck	1.06268.1000
Natriumbutyrat (Butyrat)	Sigma-Aldrich	303410
Natriumchlorid (NaCl)	Roth	3957.2
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	1.13760.0100
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Merck	1.06345.1000
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Roth	4984.1
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	SERVA	30207
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth	6771.1
„Odyssey Blocking“ Puffer	LI-COR	927-40000
Paraquat	Sigma-Aldrich	856177
PEG	SERVA	33136
Pepton	DIFCO	-
Phenol	Roth	0038.2
Phleomycin	Genaxxon	M3429
Protease-Inhibitor Cocktail IV	Calbiochem	539136
Pyruvat	Sigma-Aldrich	P2256
Rotenon	Sigma-Aldrich	R8875
Roti-Acrylamidmix 30 %	Roth	3029
Roti-Acrylamidmix 40 %	Roth	A515
Roti-Nanoquant	Roth	K880.1
Saccharose	Roth	4621.2
Salizylhydroxamsäure (SHAM)	Sigma-Aldrich	S607
HCl (Salzsäure)	Merck	1.00319.2500
TEMED	Roth	2367.1
Thiamin	Serva	36020
Tris	Roth	4855.3
Triton-x-100	Roth	3051.3
Trypton	Otto Nordwald	211701
Tween©20	Sigma-Aldrich	P-2287
Xylencyanol	SERVA	38505
Zinksulfat (ZnSO_4) $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Merck	8883

2.1.3 Lösungen und Puffer

Die Rezepte der in dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 2.3 dargestellt.

Tabelle 2.3: Verwendete Lösungen und Puffer mit Rezept und Verwendungszweck.

Puffer/Lösung	Verwendungszweck	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	Selektion	50 mg/ml in H ₂ O lösen → sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern
Biotin-Lösung	M2-Medium	0,05 mg/ml (5mg in 100 ml H ₂ O) in H ₂ O lösen → sterilfiltrieren
Blasticidin-Lösung	Selektion	5 mg/ml in H ₂ O → sterilfiltrieren
„Blotting“-Puffer	Western-Blot-Analyse	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol → ad 1l H ₂ O
Chloroform/ Isoamylalkohol	DNA-Isolation <i>P. anserina</i>	96 % (v/v) Chloroform 4 % (v/v) Isoamylalkohol
Coomassie-Entfärber	Proteingel- Entfärbung	25 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 65 % (v/v) H ₂ O
Coomassie- Färbelösung	Proteingel-Färbung	20 mM CuSO ₄ · 5 H ₂ O 45 % (v/v) Methanol 45 % (v/v) H ₂ O 10 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Blue G250
Chloramphenicol- Lösung	Selektion	10 mg/ml in abs. Ethanol
Cycloheximid-Lösung	Cycloheximid-Assay	50 mg/ml in abs. Ethanol → sterilfiltriert, bei -20 °C lagern
DIG-Puffer1	Southern-Blot- Analyse	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl pH 7,5 (NaOH) → autoklavieren
DIG-Puffer2	Southern-Blot- Analyse	0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz in DIG-Puffer1 → bei ca. 60 °C lösen, bei 4 °C lagern
DIG-Puffer3	Southern-Blot- Analyse	0,1 M Tris (pH 9,5, HCl) 0,1 M NaCl → autoklavieren
DIG-Waschpuffer	Southern-Blot- Analyse	0,3 % (v/v) Tween®20 in DIG-Puffer1
Denaturierungslösung	Southern-Blot- Analyse	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH → autoklavieren
1 M DTT-Lösung	Proteinisolation	1 M DTT in 0,01 M NaAc, pH 5,2 → sterilfiltrieren
6x DNA-Ladepuffer	Agarosegele	20 mM EDTA (pH 8,0) 60 % (w/v) Saccharose → autoklavieren Nach dem Autoklavieren Farbstoffe hinzugeben: 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol

0,5 M EDTA	Für Lösungen und Puffer	186,1 g Disodium Ethylen-Diamin-Tetraacetat · 2 H ₂ O (EDTA) → ad 1 l H ₂ O pH 8 (NaOH)
0,25 M HCl	Southern-Blot-Analyse	20,71 ml konzentrierte HCl (37 %) → ad 1 l H ₂ O
Heringssperma-DNA-Lösung	Southern-Blot-Analyse	20 mg/ml Heringssperma-DNA in H ₂ O 1 h bei 60 °C lösen Mehrere Stunden bei Raumtemperatur lagern und wiederholt gründlich mischen, anschließend 15 min mit Ultraschall behandeln
High-SDS-Hybridisierungslösung	Southern-Blot-Analyse	7 % (v/v) SDS 5x SSC 50 mM Natriumphosphat 0,1 % (w/v) Lauroylsarkosin 2 % (w/v) Blockierungsreagenz → Bei mindestens 60 °C in H ₂ O lösen, bei -20 °C lagern
Hygromycin-Lösung	Selektion	394 mg/ml in H ₂ O lösen → sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
KCN-Lösung	Atmungsmessungen	100 mM KCN in H ₂ O → bei -20 °C lagern
10x Laufpuffer (SDS-Laufpuffer)	Western-Blot-Analyse	250 mM Tris 1,5 M Glycin pH 8,3; HCl → autoklavieren Bei Nutzung: 1x Laufpuffer 0,1 % (v/v) SDS (aus 20 %-SDS-Lösung)
3 M Natriumacetat (NaAc)	Für Lösungen und Puffer	24,6 g in 100 ml H ₂ O pH 5,2 mit Essigsäure
M2-Spurenelementlösung	M2-Medium	5 g Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O 5 g ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 1 g Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6 H ₂ O 0,25 g CuSO ₄ · 5 H ₂ O 0,05 g MnSO ₄ · H ₂ O 0,05 g H ₃ BO ₃ 0,05 g NaMoO ₄ · H ₂ O Ad 100 ml H ₂ O → sterilfiltrieren
Maiswasser	Für BMM-Medium	250 g Maismehl/5 l H ₂ O Über Nacht bei 60 °C quellen lassen, anschließend über einem Handtuch filtrieren 8 g Malzextrakt/l pH 6,5 mit KOH → autoklavieren
Mitochondrien-Isolationspuffer1	Mitochondrien-Isolation	10 mM Tris (pH 7,5; HCl) 1 mM EDTA 0,33 M Saccharose

Mitochondrien-Isolationspuffer2	Mitochondrien-Isolation	Mitochondrien-Isolationspuffer1 0,2 % (w/v) BSA → vor der Benutzung ca. 6 Tropfen 1:5 Antifoam hinzugeben
NBT/BCIP-Lösung	Spot-Blot-Analyse	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid- (NBT) oder BCIP®-Fertigtabletten nach Herstellerangaben (Sigma-Aldrich) verwenden
Neutralisierungslösung	Southern-Blot-Analyse	2 M NaCl 1 M Tris (pH 5,5, HCl) pH 5,5 mit HCl → autoklavieren
Paraquat-Lösung	M2-Medium	0,5 M Paraquat in H ₂ O → sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C
10x PBS	Western-Blot-Analyse	0,58 M Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 0,17 M NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O 0,68 M NaCl → autoklavieren
PBS mit Tween©20	Western-Blot-Analyse	1x PBS 0,3 % (v/v) Tween©20
PEG	<i>P. anserina</i> -Transformation	60 % (w/v) PEG 4000 50 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 10 mM Tris (pH 7,5; HCl) Zum Lösen erwärmen → autoklavieren
Phleomycin-Lösung	Selektion	10 mg/ml in H ₂ O → sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern
Protein-Extraktionspuffer	Proteinisolation	1 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7,5 mit NaOH → autoklavieren Vor Gebrauch frisch 5 mM DTT zugeben
RNaseA-Lösung	RNA-Abbau vor Southern-Blot-Analyse	10 mg/ml RNase A in 0,01 M NaAc (pH 5,2, Essigsäure) → 15 min bei 100 °C aufkochen, langsam auf Raumtemperatur abkühlen lassen 1/10 Volumen 1 M Tris (pH 7,5, HCl) zugeben
Rotenon-Stammlösung	Wuchsexperimente	1 mM in abs. Ethanol (0,34 mg/ml)
Sammelgel für SDS-PAGE (5 %)	Western-Blot-Analyse	1,228 ml H ₂ O 500 µl 4x Sammelgel-Puffer 250 µl Roti-Acrylamidmix 40 % (29:1) 2 µl TEMED 20 µl 10 % APS
4x Sammelgel-Puffer	Western-Blot-Analyse	0,5 M Tris pH 6,8 mit HCl 0,4 % (w/v) SDS

6x SDS-Probenpuffer	Western-Blot-Analyse	48 % (v/v) Glycerin 6 % (w/v) Tris (pH 6,8, HCl) 9 % (v/v) β -Mercaptoethanol 6 % (w/v) SDS 0,03 % (w/v) Bromphenolblau → bei -20 °C lagern
SHAM-Lösung	Atmungsmessung	100 mM SHAM in H ₂ O → Bei 70 °C lösen
20x SSC	Southern-Blot-Analyse	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat · 2 H ₂ O pH 7 mit HCl
6x SSC-Blockierlösung	Southern-Blot-Analyse	30 % (v/v) 20x SSC 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz
Stammlösung A	Für CM-Medium	0,1 % (w/v) ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 0,1 % (w/v) FeCl ₂ 0,1 % (w/v) MnCl → autoklavieren
50x Stammlösung 1	<i>P. anserina</i> -Transformation	7,5 % (w/v) KH ₂ PO ₄ 2,5 % (w/v) KCl 2,7 % (w/v) MgSO ₄ · H ₂ O → autoklavieren
50x Stammlösung 2	<i>P. anserina</i> -Transformation	0,005 % (w/v) ZnSO ₄ · 7 H ₂ O 0,005 % (w/v) FeSO ₄ · 7 H ₂ O 0,005 % (w/v) CuSO ₄ · 5 H ₂ O 0,005 % (w/v) MnSO ₄ · 1 H ₂ O → autoklavieren
STC	<i>P. anserina</i> -Transformation	1 M Sorbitol 10 mM Tris 50 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O pH 7,5 mit HCl
STET-Lösung	DNA-Isolation (<i>E. coli</i>)	8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton-X-100 50 mM EDTA (pH 8,0) 10 mM Tris (pH 8, HCl) → autoklavieren
50x TAE-Puffer	Agarosegele	2 M Tris 57,1 ml/l Essigsäure 50 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0) → autoklavieren
TENS-Puffer	DNA-Isolation (<i>P. anserina</i>)	10 mM Tris 1 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM NaCl 2 % (v/v) SDS
Thiamin-Lösung	M2-Medium	250 mg/l in H ₂ O → sterilfiltrieren
TPS	<i>P. anserina</i> -Transformation	1 % (v/v) TPS-Lösung A 9 % (v/v) TPS-Lösung B 20 % (w/v) Saccharose pH 5,5 mit Phosphorsäure → autoklavieren
TPS-Lösung A	<i>P. anserina</i> -Transformation	0,5 M Na ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O

TPS-Lösung B	<i>P. anserina</i> -Transformation	0,5 M KH ₂ PO ₄
Trenngel für SDS-PAGE (12 %)	Western-Blot-Analyse	2,667 ml H ₂ O 1,5 ml 4x Trenngel-Puffer 1,8 ml Roti-Acrylamidmix 40 % (29:1) 3 µl TEMED 30 µl 10 % APS
Trenngel für SDS-PAGE (8 %)	Western-Blot-Analyse	3,26 ml H ₂ O 1,5 ml 4x Trenngel-Puffer 1,2 ml Roti-Acrylamidmix 40 % (29:1) 3 µl TEMED 30 µl 10 % APS
4 x Trenngel-Puffer	Western-Blot-Analyse	1,5 M Tris pH 8,8 mit HCl 0,4 % (w/v) SDS

2.1.4 Anzuchtmedien

Die in dieser Dissertation verwendeten Medien zur Anzucht und Kultivierung von *P. anserina*- und *E. coli*-Stämmen sind in Tabelle 2.4 gelistet

Tabelle 2.4: Verwendete Anzuchtmedien.

Medium	Rezeptur
BMM + AmAc	Maiswasser 2 % (w/v) Agar 60 mM Ammoniumacetat → autoklavieren
BMM (Biomalz-Mais-Medium)	Maiswasser 2 % (w/v) Agar → autoklavieren Ggf. zur Selektion: BMM + Phleo: BMM (pH 7,5, KOH) + 6 µg/ml Phleomycin BMM + Hyg: BMM + 100 µg/ml Hygromycin
CM-Medium („complete medium“)	1 g KH ₂ PO ₄ 0,5 g KCl 0,5 g MgSO ₄ ·7 H ₂ O 10 g Glukose 3,7 g NH ₄ Cl 2 g Trypton 2 g Hefeextrakt 1 ml Stammlösung A pH 6,5 mit KOH ad 1 l H ₂ O → autoklavieren

<p>LB-Medium („lysogeny broth“-Medium)</p>	<p>1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,2 mit NaOH für Festmedium: 2 % (w/v) Agar → autoklavieren Zur Selektion ggf. nach dem Autoklavieren zugeben: LBA: 100 µg/ml Ampicillin LBAB: 50 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Blasticidin LBAC: 50 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol</p>
<p>M2-Medium</p>	<p>0,25 g KH₂PO₄ 0,3 g K₂HPO₄ 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g Harnstoff 10 g Dextrin, gelb 20 g Agar ad 1 l H₂O → autoklavieren Nach dem Autoklavieren: 50 µl/l Biotin-Lösung 200 µl/l Thiamin-Lösung 100 µl/l M2-Spurenelementlösung</p>
<p>M2-Glycerin</p>	<p>0,25 g KH₂PO₄ 0,3 g K₂HPO₄ 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O 0,5 g Harnstoff 10 g Glycerin 20 g Agar ad 1 l H₂O → autoklavieren Nach dem Autoklavieren: 50 µl/l Biotin-Lösung 200 µl/l Thiamin-Lösung 100 µl/l M2-Spurenelementlösung</p>
<p>M2-N</p>	<p>0,25 g KH₂PO₄ 0,3 g K₂HPO₄ 0,25 g MgSO₄ · 7 H₂O 15 g Dextrin, gelb 20 g Agar ad 1 l H₂O → autoklavieren Nach dem Autoklavieren: 50 µl/l Biotin-Lösung 200 µl/l Thiamin-Lösung 100 µl/l M2-Spurenelementlösung</p>
<p>Präparationsagar</p>	<p>24 g Agar ad 300 ml H₂O → autoklavieren</p>

SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt 0,05 % NaCl 20 mM KCl pH 7,0 mit NaOH → autoklavieren Nach dem Autoklavieren: 50 µl 1 M Glukose-Lsg/5 ml. (Stammlsg. in H ₂ O, sterilfiltriert) 50 µl 2 M MgCl ₂ -Lsg/5 ml (Stammlsg. in H ₂ O, sterilfiltriert)
„Trafo“-Medium (Transformationsmedium für <i>P. anserina</i>)	3,7 g Ammoniumchlorid 2 g Trypton 1 g Casaminosäuren 1 g Hefeextrakt 10 g Glukose-Monohydrat 342,3 g Saccharose 20 ml Stammlösung 1 20 ml Stammlösung 2 ad 1 l H ₂ O pH 6,0 mit KOH (für Phleomycin pH 7,5 mit KOH) für Platten: 1,2 % (w/v) Agar für Überschichtungsmedium: 0,5 % Agar → autoklavieren

2.1.5 Stämme

In Tabelle 2.5 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Stämme aufgelistet.

Tabelle 2.5.: Verwendete Stämme.

Organismus	Stamm	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i>	XL1Blue	Stratagene
	KS272 (pKOBEG)	Chaverocche <i>et al.</i> (2000)
<i>Podospira anserina</i>	Wildstamm „s“	Esser (1974)
	$\Delta PaClpP$	Luce und Osiewacz (2009)
	$\Delta PaAtg1$	Knuppertz <i>et al.</i> (2014)
	<i>PaSod1::Gfp</i>	Zintel <i>et al.</i> (2010)
	$\Delta PaSnf1$	Diese Arbeit
	$\Delta PaSnf1/PaSod1::Gfp$	Diese Arbeit
	$\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$	Diese Arbeit
	$\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$	Diese Arbeit
	$\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$	Diese Arbeit
	$\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$	Krotova (2020)

2.1.6 Kits

Alle in dieser Arbeit verwendeten Kits sind mit dem Hersteller und der Bestellnummer in Tabelle 2.6 dargestellt.

Tabelle 2.6: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Aconitase-Assay-Kit	Abcam®	ab83459
DIG-DNA labeling and detection Kit	Roche	11175033910
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel	740 609.250
Plasmid Purification (Maxi-Kit)	QIAGEN	12163
Plasmid Purification (Midi-Kit)	QIAGEN	12145

2.1.7 Vektoren

Die in dieser Dissertation verwendeten Vektoren (Plasmide und Cosmide) wurden mit dem Verwendungszweck und der Referenz in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Verwendete Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Referenz
2D1	Cosmid. Enthält die <i>PaSnf1</i> -Sequenz. Ausgangscosmid zur Herstellung des $\Delta PaSnf1$ -Deletionscosmids. Matrize zur Herstellung einer <i>PaSnf1</i> -Sonde und zur Amplifizierung der <i>PaSnf1</i> -Sequenz.	Osiewicz (1994)
$\Delta PaSnf1_{2D1}$	Deletionscosmid zur Herstellung einer <i>PaSnf1</i> -Deletionsmutante. Die <i>PaSnf1</i> -Sequenz wurde gegen eine <i>Phleomycin</i> -Resistenzkassette ausgetauscht.	Diese Arbeit
pAN7-1	Dient als Positivkontrolle bei der Transformation von <i>P. anserina</i> . Enthält eine <i>Hygromycin</i> -Resistenzkassette.	Punt <i>et al.</i> (1987)
pSnf1KO2	Deletionsplasmid zur Erstellung eines Deletions-Cosmids. Es enthält eine <i>Phleomycin</i> -Resistenzkassette, umgeben von ca. 250 bp großen <i>PaSnf1</i> -Flanken. Zur Selektion in <i>E. coli</i> beinhaltet es zusätzlich eine Ampicillin-Resistenzkassette.	Diese Arbeit
pFlag-Snf1	Ausgangsvektor zur Herstellung des $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ -Stammes. Dieses Plasmid enthält die Promotorregion von <i>PaSnf1</i> , die Sequenz kodierend für ein HIS::FLAG-Epitop, den <i>PaSnf1</i> -ORF inklusive 500 bp der Terminatorregion. Zur Selektion in <i>P. anserina</i> enthält es zusätzlich eine <i>Hygromycin</i> -Resistenzkassette.	Diese Arbeit
pHisFLAG	Ausgangsvektor zur Erstellung von pFlag-Snf1. Enthält die Sequenz kodierend für ein HIS::FLAG-Epitop und eine <i>Hygromycin</i> -Resistenzkassette.	A. Hamann, Arbeitskreis Osiewicz
phph-1	Dient als Negativkontrolle bei der Transformation von <i>P. anserina</i> .	Roche

pHis-Flag::PaSnf1-1	Zwischenvektor zur Herstellung des pFlag-Snf1 Plasmids, enthält den <i>PaSnf1</i> -ORF und 500 bp der Terminatorregion, fusioniert mit der Sequenz kodierend für ein HIS::FLAG-Epitop.	Diese Arbeit
pKO4	Dient als Positivkontrolle bei der Transformation von <i>P. anserina</i> ; enthält eine <i>Phleomycin</i> -Resistenzkassette. Ausgangsvektor zur Herstellung des Deletionsplasmids pSnf1KO2. Zur Herstellung einer <i>Phleomycin</i> -Sonde verwendet.	Grief (2007)
pPaClpPEx2	<i>PaClpP</i> -Überexpressionsplasmid. Dient zur Herstellung einer spezifischen <i>PaClpP</i> -Sonde.	K. Luce, Arbeitskreis Osiewacz
pUC18	Dient als Positivkontrolle bei der Transformation von <i>E. coli</i> (XL1-Blue-Stamm).	GE Healthcare
pKO7-KU17	Zur Herstellung einer <i>Hygromycin</i> -Sonde verwendet.	Kunstmann und Osiewacz (2009)

2.1.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide. Die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
Snf1KO1	CAAGGGCACGGT <u>GCTGTC</u>	Zur Amplifikation der 5'-Flanke von <i>PaSnf1</i> („forward“ Oligonukleotid).
Snf1KO2	TTAAGCTTCATGCTGGCGACGGCTATC	Zur Amplifikation der 5'-Flanke von <i>PaSnf1</i> . Enthält die Erkennungssequenz von HindIII („reverse“ Oligonukleotid).
Snf1KO3	CGCGACTAGTGC <u>GGATGCGGATTGATTATTG</u>	Zur Amplifikation der 3'-Flanke von <i>PaSnf1</i> . Enthält die Erkennungssequenz von BcuI („forward“ Oligonukleotid).
Snf1KO4	AAGCGGCCGCTGTCGATGATACAGATAG	Zur Amplifikation der 3'-Flanke von <i>PaSnf1</i> . Enthält die Erkennungssequenz von NotI („reverse“ Oligonukleotid).
Snf1-1	GCATCGGCGCCTACAACATTGTC	Bindet im <i>PaSnf1</i> -Gen. Zur Herstellung einer <i>PaSnf1</i> -spezifischen Sonde verwendet („forward“ Oligonukleotid).
Snf1-2	GAGACCGAAATCGGCGATCTTG	Bindet im <i>PaSnf1</i> -Gen. Zur Herstellung einer <i>PaSnf1</i> -spezifischen Sonde verwendet („reverse“ Oligonukleotid).
Snf1-4	AAGCGGCCGC <u>CCATGGAAATAAGGACCCAG</u>	Zur Amplifikation der Promotorregion von <i>PaSnf1</i> . Enthält die Erkennungssequenz von NotI („forward“ Oligonukleotid).

Snf1-9	ACCTGCAGTGCCAGAATGGCCAGCCTTATG	Zur Amplifikation vom <i>PaSnf1</i> -ORF und 500 bp der Terminatorregion. Enthält die Erkennungssequenz von PstI („reverse“ Oligonukleotid).
Snf1-11	TTGGATCCCATGCTGGCGACGGCTAT	Zur Amplifikation der Promotorregion von <i>PaSnf1</i> . Enthält die Erkennungssequenz von BamHI („reverse“ Oligonukleotid).
Snf1-12	P-ATGGCCCAGGCCTACGACGACGA	Zur Amplifikation vom <i>PaSnf1</i> -ORF und 500 bp der Terminatorregion. Dem Oligonukleotid wurde ein Phosphatrest („P-“) am 5'-Ende angefügt („forward“ Oligonukleotid).

2.1.9 Hybridisierungssonden

Alle in dieser Arbeit hergestellten und verwendeten Hybridisierungssonden sind in Tabelle 2.9 dargestellt.

Tabelle 2.9: Verwendete Hybridisierungssonden.

Bezeichnung	Fragmentgröße (Bp)	Herstellung
<i>Phleo</i> (<i>Phleomycin</i> -Sonde)	1293	Restriktion des Plasmids pKO4 mit BamHI.
<i>Hyg</i> (<i>Hygromycin</i> -Sonde)	736	Restriktion des Plasmids pKO7-KU17 mit NcoI und ClaI.
<i>PaClpP</i>	634	Restriktion des Plasmids pPaClpPEX2 mit PstI.
<i>PaSnf1</i>	500	PCR mit den Oligonukleotiden Snf1-1 und Snf1-2 und dem Cosmid 2D1 als Matrize.

2.1.10 Enzyme

Tabelle 2.10 fasst alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme zusammen.

Tabelle 2.10: Verwendete Enzyme.

Enzym	Hersteller	Bestellnummer
Klenow-Enzym	Thermo Fisher Scientific	EP0054
„Lysing Enzyme“	Sigma-Aldrich	L1412
Lysozym	Merck	4403
Phusion-Polymerase	Thermo Fisher Scientific	F-530-L
Restriktionsenzyme: BamHI, ClaI, EcoRI, EcoRV, EheI, HindIII, KpnI, NcoI, NotI, PstI, PvuI, SacI, SmaI, XbaI	Thermo Fisher Scientific	ER0051, ER0141, ER0271, ER0301, ER0441, ER0501, ER0521, ER0571, ER0591, ER0611, ER0621, ER1132, ER0661, ER0681
RNase A	SERVA	34390
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific	EL0011
<i>Taq</i> -Polymerase	BioSell	8.060.010.100

2.1.11 Größenstandards

Die in dieser Dissertation verwendeten Größenstandards sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Verwendete Größenstandards.

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller	Bestellnr.
DNA Molecular Weight Marker II, DIG-labeled	DNA-Größenstandard	Roche	11218590910
GenRuler 100 bp DNA Ladder Plus	DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific	SM0312
Lambda DNA/HindIII Marker	DNA-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific	SM0101
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Protein-Größenstandard	Thermo Fisher Scientific	26616

2.1.12 Antikörper

In Tabelle 2.12 sind alle verwendeten Antikörper mit der angewandten Verdünnung, dem Hersteller und der Bestellnummer aufgelistet.

Tabelle 2.12: verwendete Antikörper.

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller	Bestellnr.
anti-ACO2 (aus Kaninchen)	1:10.000	Davids Biotechnologie	(gegen das Peptid: KRTEIGDFARSYAKELRQDDG)
anti-DIG-Alkalische Phosphatase (aus Schaf)	1:10.000	Roche	11093274910
anti-GFP (aus Maus)	1:10.000	Sigma	G6795
anti-PaDNM1 (aus Kaninchen)	1:5.000	Sigma (NEP; New England Peptide, LLC)	(gegen das Peptid: DKGTPEKESIAIRKC)
anti-Phos- α - AMPK (aus Maus)	1:300	Cell Signaling Technology	#2535L
anti-mouse IRDye®680RD (aus Ziege)	1:15.000	LI-COR	926-68070
anti-mouse IRDye®800CW (aus Ziege)	1:15.000	LI-COR	926-32210
anti-rabbit IRDye®680LT (aus Ziege)	1:20.000	LI-COR	926-68021
anti-rabbit IRDye®800CW (aus Ziege)	1:15.000	LI-COR	926-32211

2.1.13 Computerprogramme

Die in dieser Arbeit verwendeten Computerprogramme, mit den Verwendungszwecken und den Herstellern sind in Tabelle 2.13 dargestellt.

Tabelle 2.13: Verwendete Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Hersteller
Adobe Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe Systems
Clone Manager Professional 8	<i>in silico</i> DNA-Analysen	Sci-Ed Software
DatLab6	Atmungsmessungen	Oroboros Instruments
Image Studio (und Image Studio Lite Ver 5.2)	Analyse und Auswertung von Western-Blot-Analysen	LI-COR
LI-COR Software	Analyse und Auswertung von Western-Blot-Analysen	LI-COR
Microsoft Office 2010 (und 2016)	Dokumenten- und Bildbearbeitung, Tabellenkalkulation	Microsoft
Quantiti One® 1-D Analysis Software	Analyse und Auswertungen von DNA-Agarosegelen	BioRad
ZEN 2.5 (blue edition)	Bearbeitung von Mikroskopie-Aufnahmen	Zeiss

2.1.14 Sonstige Materialien

Alle sonstigen Materialien, die verwendet wurden, sind in Tabelle 2.14 zusammengefasst.

Tabelle 2.14: Sonstige Materialien.

Materialien	Hersteller	Bestellnummer
Cellophan	BioRad	165-0963
Cryoröhrchen (mit Außengewinde)	Roth	E292.1
Dialysemembran ($\varnothing = 25$ mm)	Millipore	VSWP02500
Elektroporations-Küvetten (2 mm)	Peqlab	71-2020
Filterpapier 3MM	Whatman®	10426693
Filtereinheit 0,22 μ m	Merck	PR04064
Filtereinheit 0,2 μ m Celluloseacetat Membran	VWR	514-0061
Gelfärbeschalen, MIDI	Roth	CP58.1
Glasperlen (0,5 mm)	Sigma-Aldrich	G-8772
Glaswolle	Sigma-Aldrich	18421
Hybridisierungsmembran (Hybond-N)	GE Healthcare	RPN303N
Hybridisierungsröhrchen	GE Healthcare	-
Küvetten	VWR	634-0676
Mikrotiterplatten (durchsichtig)	NUNC™	256510
Mull (10 cm x 40 cm)	Hartmann	206 407
Multiply®-Pro Farbmix (PCR-Reaktionsgefäße)	Sarstedt	72.737.992
Petrischalen (92 x 16 mm, mit Nocken)	Sarstedt	82.1473
Pipettenspitzen (5000 μ l; 1000 μ l; 200 μ l; 10 μ l)	Sarstedt	70.1183.001; 70.762; 70.760.002; 70.1130
PPN-Röhrchen (Polypropylen-Röhrchen)	Sarstedt	55.515
Precellys-Reaktionsgefäße mit Glasperlen (0,5 mm)	Bertin Technologies	KT03961-1-004.2
PVDF-Membran	Roth	IPFL00010

Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml)	Sarstedt	72.695.500; 72.690.001
Röntgenfilm	Fujifilm	4741019236
Röntgenfilmkassette	Dr. Goos	-

2.2 Methoden

2.2.1 *Escherichia coli*-spezifische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli-Kulturen wurden entweder in LB-Flüssigmedium unter Schütteln oder auf LB-Festmedium (LB-Medium mit 2 % (w/v) Agar) angezogen. Der Stamm KS272 wurde bei 30 °C und der Stamm XL1-Blue bei 37 °C inkubiert. Je nach enthaltenem Vektor, wurde dem Medium als Selektionsmarker ein Antibiotikum in bestimmter Konzentration (siehe Tabelle 2.4, LB-Medium) zugegeben.

2.2.1.2 Anlegen einer *E. coli*-Gefrierkultur

Bei einer längerfristigen Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden Gefrierkulturen angesetzt. Hierfür wurden 824 µl einer Übernacht-Kultur mit 176 µl 86 %-igem Glycerin in einen Cryoröhrchen gegeben und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.3 Erstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine 5 ml LBAC-Vorkultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol und 0,2 % Arabinose) des *E. coli*-Stammes KS272 (mit dem Plasmid pKOBEG) über Nacht bei 30 °C inkubiert und am nächsten Tag in eine 150 ml LBAC-Hauptkultur überführt. Bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $OD_{600nm} = 0,5 - 0,8$ wurde die Kultur weiterhin bei 30 °C inkubiert, wobei die optische Dichte stündlich bis halbstündlich gemessen und überprüft wurde. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4 °C. Die Kultur wurde in einen sterilen GSA-Becher überführt und für 10 min bei 4 °C und 3.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend insgesamt drei Mal in 150 ml H₂O gewaschen und jeweils erneut für 10 min bei 4 °C und 3.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) zentrifugiert. Nach diesen Waschschritten wurde das Pellet in 12 ml H₂O resuspendiert und in ein steriles SS34-Zentrifugationsröhrchen überführt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 5.800 Upm (Sorvall SS34-Rotor). Abschließend wurde das Pellet in insgesamt 450 µl 10 %-iges Glycerin resuspendiert, in 50 µl Portionen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.2.1.4 Elektro-Transformation von *E. coli*-Zellen

Pro Transformationsansatz wurden 50 µl der elektrokompetenten *E. coli* Zellen (KS272) mit 1 µg des zu transformierenden DNA-Fragments vermischt. Um einen Kurzschluss zu vermeiden, wurde die DNA vor der Benutzung zweifach über eine Dialysemembran (Millipore) dialysiert. Der Ansatz wurde für 30 s auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette überführt. Nach Behandlung der Zellen mit einer Spannung von 2.500 V wurden 1 ml SOC-Medium hinzugegeben und vorsichtig vermischt. Anschließend wurden die Zellen für 1 Stunde bei 30 °C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei RT und 3.500 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor). Die Suspension wurde durch das Abnehmen von 1 ml des Überstandes auf ca. 100 µl eingeeengt und abschließend auf LBAB-Platten (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin und 100 µg/ml Blasticidin) ausplattiert und ü. N. bei 30 °C inkubiert.

2.2.1.3 Erstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen (XL1-Blue) wurde eine 5 ml LB-Vorkultur über Nacht bei 37 °C unter Schütteln angezogen und am Folgetag in eine 200 ml LB-Hauptkultur überführt. Die Hauptkultur wurde bis zum Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Kultur in einen sterilen GSA-Becher überführt und für 15 min bei 3.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 ml einer gekühlten 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen erneut für 15 min bei 3.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) und 4 °C zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde in 10 ml gekühlter $CaCl_2$ -Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 350 µl Portionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und, in flüssigem Stickstoff gefroren und abschließend bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.1.5 Hitzeschock-Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Die $CaCl_2$ -kompetenten *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-Blue wurden auf Eis aufgetaut. Der zu transformierende Ligationsansatz (10-15 µl), eine Selbstligationskontrolle (Ligationsansatz mit 100 ng geschnittenen Ausgangsvektor; 10-15 µl), eine Positivkontrolle (2,5 ng pUC18) und eine Negativkontrolle (50 µl TE-Puffer) wurden je mit TE-Puffer auf 50 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefüllt. Pro Transformationsansatz wurden 300 µl der *E. coli*-Zellen hinzugegeben, vorsichtig vermischt und für 40 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze für 3 min bei 42 °C inkubiert und anschließend sofort mit 1 ml LB-Flüssigmedium versetzt. Nach einer Regenerationszeit von 1 h bei 37 °C unter Schütteln, wurden die Ansätze für 5 min bei RT und 3.500 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor) zentrifugiert und durch Abnehmen von 1,1 ml des Überstandes das Volumen der Suspension eingeeengt. Die restlichen Zellen wurden auf je zwei LB-Platten mit

spezifischen Selektionszusätzen ausplattiert. Von der Positiv- und Negativkontrolle wurden je 100 µl des Ansatzes vor der Zentrifugation ausplattiert. Abschließend wurden die Platten ü. N. bei 37 °C inkubiert.

2.2.2 *Podospora anserina*-spezifische Methoden

2.2.2.1 Anzucht von *P. anserina*

Die Anzucht der verschiedenen *P. anserina*-Stämme erfolgte standardmäßig entweder auf BMM- oder M2-Festmedium (2 % Agar) bei 27 °C und Dauerlicht. Gegebenenfalls wurden dem Medium verschiedene Zusatzstoffe oder Selektionsmarker hinzugefügt. Für einige Experimente, wie der Mitochondrien-Isolation, oder für verschiedene Protein-Isolationen wurden die Stämme in CM-Flüssigmedium bei 27 °C unter Schütteln und Dauerlicht angezogen. Für die Kultivierung in Flüssigmedium wurden zuvor M2-Mediumplatten mit Cellophan belegt, mit Myzelstückchen des jeweiligen Stammes angeimpft und für zwei bis drei Tage bei 27 °C inkubiert. Zur Analyse verschiedener Altersstadien wurden die Stämme ggf. auf Platten mit M2-Festmedium bis zum Erreichen eines bestimmten Alters angezogen. Anschließend wurden Myzelstückchen von der Wuchsfrente auf M2-Mediumplatten mit Cellophan angeimpft und für weitere zwei bis drei Tage inkubiert. Abschließend wurde das Myzel mit einem Spatel von dem Cellophan abgenommen, in einen Weithalskolben mit 200 ml CM-Flüssigmedium überführt und für zwei bis drei Tage schüttelnd, bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert.

2.2.2.2 Sporenisolation

Zur Isolation von Sporen wurden zunächst in der Regel zwei monokaryotische *P. anserina*-Stämme mit gegensätzlichen Paarungstypen zur Kreuzung in einem Abstand von ca. 5 cm auf eine M2-Mediumplatte angesetzt. Nach 10-14 Tagen Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht hatten sich die Myzelien der beiden Isolate getroffen und in der Kontaktzone Fruchtkörper, Perithezien, ausgebildet. Diese Fruchtkörper enthalten normalerweise Asci mit je vier dikaryotischen Sporen. Doch bei Störungen während der Kernteilung kann es zu sogenannten irregulären Asci kommen, welche anstelle von einer dikaryotischen Spore, zwei kleinere monokaryotische Sporen bildeten. Vorzugsweise wurde in den meisten Fällen mit monokaryotischen kleinen Sporen bzw. den daraus hervorgegangenen homokaryotischen Stämmen gearbeitet. Nur bei bestimmten Experimenten, wie der Generierung von Doppel-, oder Dreifachmutanten oder bei Fertilitätsproblemen, wurde mit den größeren, dikaryotischen Sporen und den daraus resultierenden Stämmen gearbeitet. Demnach wurde meistens nach Asci gesucht, welche anstelle von vier Sporen, fünf oder mehr enthielten. Die isolierten Sporen wurden zum Auskeimen auf BMM-Platten mit Ammoniumacetat (60 mM) überführt und für zwei Tage bei 27 °C und im Dunklen inkubiert. Die gewachsenen Myzelien wurden entweder sofort für weitere

Experimente benutzt, oder bis zur Verwendung für maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Durch Testkreuzungen der Isolate auf Platten mit M2-Festmedium gegen einen homokaryotischen Wildtyp-Stamm mit bekanntem Paarungstyp wurden die Paarungstypen der frischen Isolate bestimmt und gleichzeitig überprüft, ob die kleineren Sporen tatsächlich homokaryotisch waren.

2.2.2.3 Wuchsrate- und Lebensspannen-Bestimmung

Zur Bestimmung der Wachsraten und Lebensspannen unter Standardbedingungen wurden die zu untersuchenden Stämme nach der zweitägigen Keimung in ein mit 50 ml M2-Festmedium gefülltes „Rennrohr“ (ein hohles Glasrohr, welches an den Seiten leicht angewinkelt ist) überführt und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Wenn das Medium mit Zusätzen (0, 1, 5 oder 10 mM Butyrat; 0, 30, 90 oder 150 µg/ml. Leucine; 20 oder 80 µM Paraquat; M2 – Glycerin, mit Glycerin anstelle von Dextrin; M2-N, M2-Medium ohne Stickstoff, aber mit der 1,5-fachen Menge an Dextrin) versehen wurde, wurden Platten und keine Rennrohre verwendet und die Stämme alle 10 bis 12 Tage auf frisches Medium umgesetzt. Wachsraten-Bestimmungen und Lebensspannen-Analysen heterokaryotischer Isolate (z. B. $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Lebensspannen) wurden ebenfalls auf Platten durchgeführt. Hierbei wurden die Stämme wegen der Fruchtkörperbildung alle 7 Tage auf Platten mit frischem Medium umgesetzt.

Das Wachstum der Isolate wurde alle 2 bis 3 Tage markiert. Wenn ein Stamm einen deutlichen Einbruch des Wachstums aufwies, die Wuchsfront eine dunklere Pigmentierung zeigte und schließlich das Wachstum einstellte, wurde dieses Individuum als tot definiert. Die Lebensspanne eines Stammes entspricht demnach dem Zeitraum dieses konstanten Wachstums in Tagen. Die Wachsraten gemessen in cm pro Tag wurde bestimmt im Zeitraum innerhalb des konstanten Wachstums, also weder kurz nach dem Animpfen noch kurz vor dem Tod.

Bestimmung der Wachsraten und Lebensspanne unter Hitze-Stress-Bedingungen

Um die Auswirkung von Hitze auf die untersuchten Stämme zu ermitteln, wurden Lebensspannen-Analysen von homokaryotischen Isolaten in Rennrohren mit 50 ml M2-Festmedium bei 32 oder 35 °C und Dauerlicht durchgeführt. Hierfür wurden die Rennrohre nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Festmedium mit Ammoniumacetat angeimpft und zum Anwachsen für weitere zwei Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurden die Rennrohre mit den angewachsenen Kulturen zur entsprechenden Temperatur (entweder 32 oder 35 °C) überführt und dort bis zum Tod inkubiert. Das Wachstum der Stämme wurde alle zwei Tage markiert und die Wachsraten wurden innerhalb des Zeitraums des konstanten Wachstums in cm pro Tag bestimmt.

Wuchstest auf Rotenon-haltigem Medium

Für Wuchsexperimente auf Rotenon-haltigem M2-Festmedium (Inhibitor des Komplex I der Atmungskette) wurden homokaryotische Isolate nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Festmedium mit Ammoniumacetat auf Platten mit M2-Festmedium und 2,5 µM Rotenon (Stammlösung: 1 mM in abs. Ethanol) angeimpft und für fünf Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Als Kontrolle wurden die gleichen Stämme auf M2-Festmedium mit 0,25 % abs. Ethanol angeimpft und ebenfalls für fünf Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Das Wachstum der Stämme wurde täglich markiert. Nach 5 Tagen Inkubation wurde das Verhältnis des Wachstums auf Rotenon-haltigem Medium und der Kontrolle mit Ethanol bestimmt (Wachstum auf Rotenon/ Wachstum der Kontrolle).

2.2.2.4 Bestimmung der Fertilität

Homokaryotische Stämme beider Paarungstypen der zu untersuchenden Kulturen wurden einzeln in der Mitte von M2-Mediumplatten angeimpft und für 5 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Nach dem das Myzel der Stämme die Platten überwachsen hatten, wurden die Platten mit jeweils 5 ml H₂O überschichtet und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der fünf-minütigen Inkubation wurde das Wasser mit den darin enthaltenen Spermarien (die männlichen Gameten von *P. anserina*) abgenommen. Je 5x 300 µl der Spermarien-Suspension wurden tropfenförmig auf das Myzel des Stammes mit dem entgegengesetzten Paarungstyp pipettiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Tropfen vorsichtig abpipettiert und die Platten für weitere 5 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Schließlich wurde die Anzahl der entstandenen Perithezien unter einem Binokular bestimmt.

2.2.2.5 Transformation von *P. anserina*

Sphäroplastierung von Myzel

Damit *P. anserina* Fremd-DNA aufnimmt, muss zunächst die Zellwand entfernt werden. Nach der Entfernung der Zellwand bleiben transformierbare Sphäroplasten zurück, welche noch Zellwandrückstände besitzen. Die Sphäroplastierung erfolgte durch die Behandlung des Myzels mit einer „Lysing Enzyme“-Lösung. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Zunächst wurde der zu transformierende Stamm auf BMM-Platten mit Cellophan für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht angezogen. Anschließend wurde das Myzel in 200 ml CM-Flüssigmedium überführt und für weitere 2 Tage unter Schütteln bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Schließlich wurde das Myzel durch zwei Lagen Mull filtriert, mit TPS gespült und das Feuchtgewicht bestimmt. Pro Gramm Myzel wurden 5 ml „Lysing Enzyme“-Lösung (20 mg/ml) verwendet und das Gemisch mit dem „Waring Blendor“ homogenisiert (2 x 5 s „low“ und 2 x 5 s „high“). Die Suspension wurde in einen sterilen Weithalskolben überführt und für ca. 90 min bei 35 °C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Abbau der Zellwände und die Sphäroplastierung unter einem Mikroskop

überprüft. Zur Entfernung der unverdauten Myzelreste wurde die Suspension über vier-lagigen Mull und anschließend über einen Glastrichter mit Glaswolle filtriert. Der Überstand wurde für 10 min bei RT und 4.000 Upm (Heraeus Sepatech Varifuge 3.0) zentrifugiert. Das Sphäroplastenpellet wurde in 1 ml TPS resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgten insgesamt vier Waschschrte mit 1 ml TPS und 10 minütigen Zentrifugationsschritten bei RT und 4.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor). Anschließend wurde das Pellet in 1 ml TPS resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 10 µl einer 1:100 Verdünnung eingesetzt, um die Anzahl der Sphäroplasten mikroskopisch mittels einer Thoma-Zählkammer zu bestimmen. Die Suspension wurde in 1×10^7 Sphäroplasten-Portionen aufgeteilt und entweder direkt für die Transformation verwendet, oder bei -80 °C gelagert.

Transformation

Für die Transformation wurden pro Ansatz 1×10^7 Sphäroplasten in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und für 10 min bei RT und 4.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl STC-Puffer aufgenommen. Insgesamt wurden pro Ansatz 10 µg DNA in einem Volumen von 40 µl (ggf. mit H₂O aufgefüllt) eingesetzt. Pro Transformation wurden die Sphäroplasten mit 10 µg der zu transformierenden DNA, 10 µg einer Positivkontrolle (pKO4 für die Phleomycin-Resistenz, oder pAN7-1 für die Hygromycin-Resistenz), 10 µg einer Negativkontrolle (phph-1) oder einer Regeneration-, bzw. H₂O-Kontrolle (40 µl H₂O) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Den Ansätzen wurden je 50 µl PEG zugegeben, vorsichtig gemischt und für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze in PPN-Röhrchen überführt und auf Eis mit insgesamt ca. 2 ml PEG in 3 x 666 µl Schritten versetzt. Nach einer 30 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt für 10 min bei RT. Anschließend wurden die Ansätze vorsichtig mit je 4 ml STC vermischt. Je nach Selektionsmarker der zu transformierenden DNA, wurden je 800 µl des Transformationsansatzes, sowie jeweils der Positiv- und Negativkontrolle entweder in 4 ml Überschichtungsmedium mit Hygromycin oder mit Phleomycin gegeben und auf Transformationsmedium-Platten mit demselben Selektionsmarker ausplattiert. Für die Regenerations- und Wasserkontrolle wurden zunächst Verdünnungsreihen mit 10^{-1} bis 10^{-6} Verdünnungen in Wasser, bzw. in STC-Puffer erstellt. Von jeder Verdünnung wurde anschließend 1 ml in 4 ml Überschichtungsmedium ohne Zusatz gegeben und auf Platten mit Transformationsmedium ohne Selektionsdruck ausplattiert. Nach einer 4 tägigen Inkubation der Platten bei 27 °C und Dauerlicht wurden die Regenerations-Platten ausgewertet und die Regenerationsrate bestimmt. Nach ca. 10 Tagen erscheinen die ersten Transformanten. Die Transformanten wurden auf BMM gesichert und zusätzlich Hygromycin- bzw. Phleomycin-Resistenz getestet, in dem sie auf BMM-Platten mit den entsprechenden Zusätzen überimpft wurden.

2.2.2.6 Herstellung von Mehrfachmutanten

Zur Herstellung von Doppel- oder Dreifachmutanten wurden zwei Isolate der Ausgangsstämme mit entgegengesetzten Paarungstyp miteinander gekreuzt. Zunächst wurden dikaryotische Sporen isoliert und nach der zweitägigen Keimung im Dunklen bei 27 °C auf Resistenzen überprüft (Hygromycin- und/oder Phleomycin-Resistenz). Hierbei sollen von einem viersporigen-Ascus zwei Sporen über die beiden Selektionsmerkmale der Ausgangsstämme verfügen und zwei Sporen keine Resistenz gegenüber den verwendeten Selektionsmarkern besitzen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Deletionsstämme verfügen über eine Phleomycin-Resistenzkassette, während die verwendeten Reporterstämme über eine Hygromycin-Resistenzkassette verfügen. Eine anschließende Southern-Blot-Analyse diente der Überprüfung des Genotyps. Sobald die Identität der Mehrfachmutanten durch die Southern-Blot-Analyse bestätigt war, wurde einer der beiden dikaryotischen Mehrfachmutanten entweder zur Selbstung in die Mitte einer Platte mit M2-Festmedium angesetzt, oder, bei einer Einschränkung der Fertilität, gegen einen der Ausgangsstämme gekreuzt, um monokaryotische kleine Sporen isolieren zu können. Die so erhaltenen monokaryotischen Nachkommen wurden abschließend ebenfalls durch eine Southern-Blot-Analyse überprüft.

2.2.2.7 Mikroskopie

Zur lichtmikroskopischen Analyse von Sporen und Fruchtkörperinhalten wurden zunächst Kreuzungen homokaryotischer Stämme auf M2-Festmedium angesetzt. Die Stämme wurden genau 4 cm voneinander entfernt angeimpft und die Kreuzungsplatten für entweder 12 oder 14 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurden Fruchtkörperinhalte dieser Kreuzungen in einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger platziert, mit einem Deckgläschen bedeckt und unter dem Biomed Mikroskop (Leica) betrachtet. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Fruchtkörper wurden mit 10-facher Vergrößerung, die Aufnahmen der Sporen mit 40-facher Vergrößerung und der Kamera DFC7000T (Leica) dokumentiert.

2.2.2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurden monokaryotische Isolate nach der zweitägigen Keimung auf BMM mit Ammoniumacetat auf Platten mit M2-Festmedium zum Altern angeimpft. Einen Tag vor dem Erreichen des gewünschten Alters wurden die Stämme in die Mulden von Muldenobjektträgern gesetzt. Dafür wurden zuvor die Mulden mit je 150 µl M2-Festmedium gefüllt. Um eine gerade Oberfläche zu erhalten, wurde die Mulde unverzüglich nach dem Zugeben des Mediums mit einem Deckgläschen abgedeckt. Das Deckgläschen wurde nach dem Festwerden des Mediums wieder entfernt. Die Objektträger konnten nun mit einem kleinen Myzel-Stückchen angeimpft werden. Die angeimpften Objektträger wurden für einen Tag in einer Feuchtkammer bei 27

°C und Dauerlicht inkubiert. Für die Mikroskopie wurde das Myzelstück mit einer Pinzette entfernt. Zum Anfärben der Mitochondrien wurden die Präparate mit 100 µl einer 0,2 µM „MitoTracker® Red“-Lösung (Verdünnung: 1:5.000 in H₂O) benetzt und für 15 min vor der Mikroskopie im Dunklen und RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung vorsichtig abgenommen und das Myzel mit 100 µl H₂O vorsichtig gewaschen. Danach wurde 50 µl H₂O auf das Myzel gegeben und ein Deckgläschen aufgelegt. Zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse wurde das Zeiss „Cell Observer Spinning Disk“-Mikroskop benutzt. Vor der Verwendung des 100x/1,46-Objektivs wurde ein Tropfen Immersol 518F-Öl auf das Deckgläschen gegeben. „MitoTracker™ Red“ erzeugt bei 579 nm ein rotes Signal mit einem Emissions-Maximum bei 599 nm. Die Aufnahmen wurden mit dem Programm „ZEN 2.5“ (blue edition) bearbeitet.

2.2.2.9 Atmungsmessungen mit Myzel

Zur Messung des Sauerstoffverbrauchs von Myzel wurde das Respirometer Oxygraph-2k C und G (Oroboros Instruments) verwendet. Hierbei wird die Sauerstoffkonzentration mit Hilfe eines polarographischen Sauerstoffsensors nach dem Prinzip der Clark-Elektrode gemessen (Clark *et al.*, 1953). Die zu untersuchenden Stämme wurden nach der zweitägigen Keimung auf BMM mit Ammoniumacetat weitere zwei Tage auf M2-Festmedium mit Cellophan bei 27 °C und Dauerlicht angezogen, anschließend in CM-Flüssigmedium überführt und für drei Tage unter Schütteln bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Die Messkammern wurden vor der Messung mit 2 ml CM-Flüssigmedium befüllt, um den Sauerstoffgehalt des Mediums zu ermitteln. Für jede Messung wurde ein mittelgroßes Myzelstück in die Messkammer gegeben und diese luftdicht verschlossen. Der nun zu messende Sauerstoffverbrauch stellt die Grundatmung des Myzels dar. Um die Aktivität, bzw. die Atmung der untersuchten Stämme über die alternative Oxidase (AOX) bzw. die Cytochrom c-Oxidase (COX) zu bestimmen, wurden nach dem Einstellen eines konstanten Sauerstoffverbrauchs des Myzels nacheinander die Inhibitoren Salizylhydroxamsäure (SHAM, AOX-Inhibitor, 80 µl einer 100 mM Stammlösung) und Kaliumcyanid (KCN, COX-Inhibitor, 20 µl einer 100 mM Stammlösung) hinzugegeben und der Sauerstoffverbrauch nach der jeweiligen Inhibierung gemessen. Die Zugabe des zweiten Inhibitors erfolgte nach Erreichung eines konstanten Sauerstoffverbrauchs. Die Messung erfolgte je viermal, wobei die beiden Inhibitoren je zweimal in unterschiedlicher Reihenfolge hinzugegeben wurden. Dies hatte zur Folge, dass Reihenfolge-abhängige Wechselwirkungen der beiden Inhibitoren ausgeschlossen werden konnten. Nach der Messung wurde das Myzel in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 95 °C abgetötet. Das restliche Medium wurde mit einer Pipette abgenommen und das Myzel unter einem Abzug getrocknet. Nach zwei Tagen der Trocknung wurde das Trockengewicht des Myzels bestimmt. Das ermittelte Trockengewicht wurde anschließend zur Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in „pmol/(s*mg)“ verwendet. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit dem Programm DatLab4 (Oroboros Instruments).

2.2.2.10 Metabolom-Analyse

Um Metabolit-Mengen der *PaClpP*-Deletionsmutante mit denen des Wildtyps zu vergleichen, wurde eine Metabolom-Analyse von der Firma Metabolomic Discoveries (Metabolomic Discoveries GmbH; Potsdam, Brandenburg) durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme nach zweitägiger Keimung auf BMM mit Ammoniumacetat (bei 27 °C im Dunkeln) zum Altern auf M2-Platten angezogen. Anschließend wurden sie für 3 weitere Tage auf M2-Platten mit Cellophan überführt und bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Für Proben von 5 Tage alten Kulturen wurden die Isolate direkt von BMM-Festmediumplatten mit Ammoniumacetat abgeimpft und für 3 Tage auf M2-Festmedium mit Cellophan angezogen. Insgesamt wurden Proben von 5, 12 und 20 Tage alten Stämmen mit je vier biologischen Replikaten untersucht. Vor der Ernte des Myzels wurden die Impfstücke von den Platten entfernt, sodass nur Myzel ohne Medium geerntet werden konnte. Das Myzel wurde mit einem Spatel abgenommen und in 50 mg Portionen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur finalen Analyse bei -80 °C gelagert. Die Analyse der Proben erfolgte durch die Firma Metabolomic Discoveries (Metabolomic Discoveries GmbH; Potsdam, Brandenburg), der Versand dorthin erfolgte auf Trockeneis. Dort wurden die Proben mit Edelstahlkugeln („stainless-steel-balls“) in 80 %-igem Methanol mechanisch aufgeschlossen, für 15 min bei 70 °C erhitzt und schließlich abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Metabolom-Analyse eingesetzt. Die Analyse erfolgte durch eine LC-Tandem-Massenspektrometrie und wurde mittels eines LCMS-8050 Triplequadrupol-Massenspektrometers durchgeführt. Insgesamt konnten dadurch 51 Metabolite identifiziert werden.

2.2.3 DNA-spezifische Methoden

2.2.3.1 Isolation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *E. coli*

Midi- und Maxi-Präparation

Zur Isolation von Plasmid- bzw. Cosmid-DNA aus *E. coli* mit einem hohen Reinheitsgrad, wurde das „QIAGEN Plasmid Midi Kit“, oder für eine größere Ausbeute das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ nach Herstellerangaben verwendet. Hierfür erfolgte die Anzucht der Vor- (5 ml LBA-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, über Tag) und Hauptkultur (150 ml LBA-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, über Nacht) unter Schütteln bei 37 °C. Zur Isolation von Cosmid-DNA wurden die Kulturen bei 30 °C angezogen. Die isolierte DNA wurde in 50 – 100 µl (Midi-Präparation) oder in 200 – 300 µl H₂O (Maxi-Präparation) aufgenommen.

STET-Minipräparation

Zur schnelleren Isolation von Plasmid-DNA mit einer geringeren Qualität wurde die STET-Minipräparations-Methode verwendet. Diese Methode diente der schnellen Überprüfung der Transformation von Ligationsansätzen zur Erstellung eines neuen Plasmides. Hierfür wurde je Ansatz eine Einzelkolonie der *E. coli*-Transformanten in 5 ml LBA (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht, schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen für 10 min bei 3.500 Upm (Eppendorf A-4-44-Rotor) und RT abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl STET-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dem Ansatz wurde zur Lyse der Zellen 12 µl einer 10 mg/ml Lysozym-Lösung hinzugegeben, stark gemischt (Vortex) und für 90 s bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min bei 15.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor) und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Pipettenspitze entfernt. Zur Fällung der DNA wurden dem Überstand 150 µl kaltes Isopropanol (-20 °C) hinzugegeben und die Ansätze für 15 min bei -20°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 15.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor) und 4 °C für 10 min. Anschließend wurde das Pellet mit 150 µl 70 %-igen Ethanol (-20 °C) gewaschen (5 min, 15.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor), 4 °C). Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen, während das Pellet für 15 min bei 37 °C getrocknet wurde. Das Rücklösen des getrockneten DNA-Pellets erfolgte in 50 µl RNase A-Lösung (1 µl RNase A (10 mg/ml) und 49 µl H₂O) für 15 min bei 37 °C. Zur Überprüfung der Plasmide wurden 3 µl des Ansatzes für eine Restriktions-Analyse eingesetzt.

2.2.3.2 Isolation genomischer DNA aus *P. anserina*

Zur Isolation von genomischer DNA (gDNA) von *P. anserina* wurden die zu untersuchenden Stämme zunächst für 2 – 3 Tage bei 27 °C und Dauerlicht auf BMM mit Cellophan angezogen. Anschließend wurden die Stämme mit Hilfe eines Spatels in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml TENS-Puffer versetzt. Die Isolation der gDNA erfolgte nach Lecellier und Silar (1994). Das DNA-Pellet wurde abschließend nach 15 minütiger Lufttrocknung bei RT in 50 µl H₂O gelöst.

2.2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA wurden 1 %-ige Agarosegele (in 1x TAE-Puffer) verwendet. Die Agarosegele wurden in mit 1x TAE-Puffer gefüllte Kammern gelegt. Anschließend wurden die DNA-Proben mit 1x DNA-Ladepuffer auf die Agarosegele aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl λHindIII-Marker und/oder 100bp+ - Marker verwendet. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde für 90 min ein elektrisches Feld von 80 V angelegt. Anschließend wurden die Gele für 15 – 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) gefärbt und die DNA auf einem UV-Transilluminator detektiert und dokumentiert.

2.2.3.4 Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, wurde zunächst eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Anschließend wurde das Gel für 15 min. in einer frischen Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml) gefärbt und das entsprechende DNA-Fragment unter UV-Licht detektiert, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (Macherey-Nagel) zur Gelextraktion nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die DNA entweder in 25 – 50 µl H₂O oder NE-Puffer eluiert.

2.2.3.5 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten erfolgte mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben. Die DNA wurde abschließend entweder in 25 – 50 µl H₂O oder NE-Puffer eluiert.

2.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte durch die sogenannte Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Je nach Experiment wurde dafür die *Taq*- oder die *Phusion*-Polymerase eingesetzt. Hierbei wurde die *Taq*-Polymerase überwiegend zur Verifizierung und zur Erstellung von DNA-Sonden eingesetzt, während die *Phusion*-Polymerase aufgrund ihrer geringeren Fehlerrate zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten für die Herstellung von Vektoren verwendet wurde. Ein PCR-Zyklus besteht aus den folgenden drei Schritten: Denaturierung der DNA, Anlagerung der Oligonukleotide als Startmoleküle für die Polymerase und der Synthese des neuen Stranges. In Tabelle 2.15 sind die Komponenten des Reaktionsansatzes aufgelistet, während in Tabelle 2.16 die einzelnen Schritte der Reaktion dargestellt sind.

Tabelle 2.15: Komponenten eines PCR-Ansatzes

Komponente	<i>Taq</i> -Polymerase: Konzentration	<i>Phusion</i> -Polymerase: Konzentration
10x <i>Taq</i> -Puffer/ 5x <i>Phusion</i> -HF-Puffer	1x	1x
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	/
10 mM dNTPs	0,2 mM	0,2 mM
Oligonukleotid „forward“	12,5 pmol	25 pmol
Oligonukleotid „reverse“	12,5 pmol	25 pmol
Matrize	2,5 – 5 ng Vektor-DNA	2,5 – 5 ng Vektor-DNA
Polymerase	0,05 U/µl	0,02 U/µl
H ₂ O	ad 25 µl	ad 50 µl

Tabelle 2.16: Reaktionsschritte der PCR

Schritt	Taq-Polymerase			Phusion-Polymerase		
	Temperatur	Zeit	Zyklen	Temperatur	Zeit	Zyklen
1. Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1x	98 °C	30 s	1x
2. Denaturierung	95 °C	60 s	25-34x	98 °C	10 s	25-34x
3. Anlagerung	48-68 °C	60 s		48-68 °C	30 s	
4. Elongation	72 °C	60 s/kb		72 °C	20 s/kb	
5. finale Elongation	72 °C	6 min	1x	72 °C	6 min	1x

2.2.3.7 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von DNA wurden 0,5 - 10 µg Plasmid-DNA oder 0,5 - 1 µg gDNA in einem Gesamtvolumen von 20 – 100 µl eingesetzt. Bei der Analyse von Plasmid-DNA aus einer STET-Minipräparation wurden je 3 µl der rückgelösten DNA verwendet. Die Restriktionsansätze wurden anschließend entweder für 4 - 6 h, oder über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur (je nach Enzym entweder bei 37 oder 30 °C). In Tabelle 2.17 sind die Komponenten eines Restriktionsansatzes zusammengefasst.

Tabelle 2.17: Komponenten eines Restriktionsansatzes.

Komponente	Konzentration
10x Puffer	1x
DNA	0,5 – 10 µg DNA (bzw. 3 µl aus der STET-Minipräparation)
Enzym	5 U/µg DNA
H ₂ O	ad 20 – 100 µl

2.2.3.8 Ligation

Für die Konstruktion neuer Vektoren wurden jeweils 2 bis 4 DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase verknüpft. Hierfür wurden je 100 ng des entsprechend verdauten Vektorrückgrats mit einem 6-fachen molaren Überschuss der DNA-Fragmente gemischt und zusammen mit der T4-DNA-Ligase über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle der Selbstligation wurde je ein Ansatz nur mit 100 ng des Vektorrückgrats ohne Insertionsfragment hergestellt. Durch eine 10 minütige Inkubation bei 65 °C am Folgetag wurde die Reaktion gestoppt und anschließend in *E. coli* transformiert oder bei -20 °C gelagert. In Tabelle 2.18 sind die Komponenten eines Ligationsansatzes aufgelistet.

Tabelle 2.18: Komponenten eines Ligationsansatzes.

Komponente	Ligation	Selbstligation
10x Puffer	1 µl	1 µl
Vektorrückgrat	100 ng	100 ng
Insertionsfragment	6x molare Masse des Vektors	/
T4-DNA-Ligase	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O	ad 10 µl	ad 10 µl

2.2.3.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) durch die Firma GATC Biotech AG (Konstanz, Deutschland). Hierfür wurden jeweils 500 ng des Plasmides mit 25 pmol eines geeigneten Oligonukleotides in einem Volumen von insgesamt 10 µl (mit H₂O) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Die Auswertung erfolgte anschließend mit dem „Clone Manager Professional 8“-Programm.

2.2.3.10 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmungen von Plasmid-, von Cosmid-DNA und von DNA-Fragmenten erfolgte in der Regel mittels des „NanoDrop 1000“-Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific) oder des Spektralfotometer (DeNovix) nach Herstellerangaben.

Zur Konzentrationsbestimmung von gDNA wurde jeweils 1 µl der isolierten gDNA auf ein 1 %-iges-Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Als Mengenreferenz wurden 5 µl λHindIII-Marker verwendet. Nach der Färbung des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung und der Dokumentation am UV-Transilluminator wurden die Intensitäten der Markerbanden mit bekannten DNA-Konzentrationen mit den Intensitäten der gDNA mittels der „Quantity One 1-D Analysis Software“ (Bio-Rad) verglichen und dadurch die Konzentration der gDNA bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden wurde die optische Dichte bei 260nm (OD_{260nm}) bestimmt und anschließend folgende Formel verwendet:

$$\frac{OD_{260nm}}{E_m} = \text{Konzentration (mol/l)}$$

$$E_m = (A \times 16000) + (T \times 9600) + (G \times 12000) + (C \times 7000)$$

E_m = molarer Extinktionskoeffizient

A, T, G, und C = Anzahl der jeweiligen Nukleotide in der Oligonukleotid-Sequenz

2.2.3.11 Herstellung von Hybridisierungs-Sonden

Zum Nachweis eines bestimmten DNA-Abschnittes in der genomischen oder Cosmid-DNA mittels Southern-Blot-Analyse mussten zunächst mit Digoxigenin (DIG) markierte spezifische DNA-Sonden hergestellt werden. Hierfür wurden bis zu 5 µg des DNA-Fragments in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel in einem Volumen von insgesamt 15 µl vorgelegt und für 10 min in einem Wasserbad gekocht. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend zusammen mit dem „DIG-DNA labeling and detection kit“ (Roche) nach Herstellerangaben für 20 h bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde die Reaktion mit 2 µl EDTA (0,2 M, pH = 8) gestoppt. Bevor die erstellte DNA-Sonde verwendet werden konnte, musste zunächst die Markierung und Konzentration mittels Spot-Blot-Analyse überprüft werden. Alle in dieser Arbeit erstellten Sonden sind in Tabelle 2.9 zusammengefasst.

2.2.3.12 Spot-Blot-Analyse

Zur Überprüfung der DIG-Markierung von DNA-Sonden wurde die sogenannte Spot-Blot-Analyse verwendet. Hierfür wurden definierte Mengen an DIG-markierter Kontroll-DNA in einer Verdünnungsreihe von insgesamt 5 Verdünnungen mit einer Konzentration von 1 ng/µl bis 0,1 pg/µl punktförmig auf eine Nylon-Membran aufgetragen. Nach Herstellerangaben des „DIG-DNA labeling and detection kit“ wird nach 20 h Inkubation so viel DNA markiert wie eingesetzt wurde. Ausgehend von dieser Annahme wurde ebenfalls eine Verdünnungsreihe der markierten DNA-Sonde erstellt und neben die Kontroll-DNA platziert. Nach der UV-Fixierung der DNA auf der Membran mit Hilfe des Crosslinkers „UV-Stratalinker 1800“ erfolgte die Detektion der DNA wie bei einer Southern-Blot-Analyse. Anstelle des CSPD-Substrates wurde bei dieser Analyse NBT/X-Phosphat zur Färbung verwendet und die Membran für mindestens 2 Stunden im Dunklen inkubiert. Durch den Vergleich der Kontroll-DNA mit der aufgetragenen DNA-Sonde konnte nun die Konzentration der Sonde bestimmt werden.

2.2.3.13 Southern-Blot-Analyse

Für den Nachweis von spezifischen DNA-Abschnitten in der genomischen oder Cosmid-DNA wurde die Southern-Blot-Analyse verwendet. Diese Analyse setzt sich aus drei Abschnitten zusammen, dem Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran, der Hybridisierung mit einer spezifischen, mit DIG-markierten DNA-Sonde und der Detektion dieser Sonde.

Zunächst wurden je Ansatz 0,5 – 1 µg DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym behandelt und auf einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA nach dem Färben des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung auf einem UV-Transilluminator detektiert und dokumentiert. Es folgte der Transfer der DNA von dem Agarosegel auf eine Nylon-Membran. Hierfür

wurde das Agarosegel zunächst für 2 – 5 min in einem Wasserbad inkubiert. Währenddessen wurde eine Nylon-Membran auf die passende Größe des Agarosegels zugeschnitten und mit 2x SSC angefeuchtet. Anschließend wurde die Nylon-Membran auf die Vakuum-Transferapparatur gelegt und mit einer Folie verschlossen, die eine passende Öffnung hatte, sodass die Nylon-Membran frei lag. Sobald das Gel luftblasenfrei auf der Nylon-Membran platziert war, wurde es mit 0,25 N HCl-Lösung überschichtet und ein Vakuum von 50 mbar angelegt. Nach einer 20 – 30 minütigen Inkubation (bis zum Farbumschlag des Ladepuffers im Agarosegel) wurde die restliche HCl-Lösung abgenommen und das Gel erst für 20 – 30 min mit einer Denaturierungslösung, anschließend für die gleiche Zeit mit einer Neutralisierungslösung überschichtet. Der eigentliche Transfer der DNA auf die Nylon-Membran erfolgte mit 20x SSC und einer 1,5 – 2 stündigen Inkubation. Nach der Inkubation wurde die überschüssige Lösung abgenommen, die Taschen des Gels auf der Membran markiert und das Gel anschließend unter Vakuum entfernt. Die Membran wurde kurz in 2x SSC inkubiert und auf Filterpapier getrocknet. Nach dem Trocknen wurde die DNA mittels des Crosslinkers „UV-Stratalinker 1800“ auf der Membran fixiert.

Zur Hybridisierung der fixierten DNA auf der Membran mit einer spezifischen, DIG-markierten DNA-Sonde, wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur in 6X SSC mit 0,5 % Blocking-Reagenz inkubiert. Es folgte ein Schritt der Prähybridisierung für 3 h bei 55 °C mit High-SDS-Hybridisierungslösung mit 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht mit High-SDS-Hybridisierungslösung, 1/100 Volumen denaturierter Heringssperma-DNA und 5 – 25 ng/ml denaturierter DNA-Sonde. Am Folgetag wurde die überschüssige und ungebundene Sonde abgenommen und bis zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert.

Nach Entfernung der überschüssigen Sonde wurde die Membran 2x für 5 min bei RT mit 2x SSC und 0,1 % SDS und 2x für 15 min bei 68 °C mit 0,1x SSC und 0,1 % SDS gewaschen. Nach einer kurzen Inkubation mit DIG-Waschpuffer bei RT wurde die Membran für 30 min bei RT mit DIG-Puffer 2 inkubiert und anschließend für weitere 30 min mit der verdünnten Antikörper-Lösung (1:10.000 anti-DIG in DIG-Puffer 2, AK gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase) behandelt. Nach der Antikörperbehandlung wurde die Membran insgesamt 3x für 10 min mit DIG-Waschpuffer gewaschen und kurz (5 min) in DIG-Puffer 3 inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Membran mit 500 µl verdünnter CSPD-Substrat-Lösung (1:100 in DIG-Puffer 3), wobei die Membran mit der Lösung überschichtet in Klarsichtfolie eingelegt wurde und für 5 min inkubiert wurde. Danach wurde das überschüssige Substrat gründlich ausgestrichen und die Membran in der Folie eingeschweißt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37 °C, bevor die Signale detektiert wurden. Die Detektion der Chemilumineszenz konnte nun durch zwei verschiedene Wege erfolgen. Entweder durch das Überführen der eingeschweißten Membran in eine Röntgenfilmkassette und Auflegen eines Röntgenfilms. Der Röntgenfilm wurde nach einer Expositionszeit von 15 min – 3 Stunden durch einen

Filmentwickler entwickelt. Alternativ erfolgte die Detektion erfolgte nach einer Expositionszeit von 15 – 60 min mit dem ECL CHEMOSTAR-Gerät.

Vor einer Hybridisierung mit weiteren Sonden, muss die zuvor verwendete Sonde von der Membran entfernt werden. Hierfür wurde die Membran für 5 min mit Wasser gewaschen und anschließend 2 x 10 min mit 0,2 M NaOH mit 0,1 % SDS bei 37 °C und 2 x 15 min in 2 x SSC bei RT inkubiert. Nun konnte die Membran wie gewohnt hybridisiert werden, wobei sie zunächst für eine Stunde mit 6x SSC und 0,5 % Blocking-Reagenz behandelt wurde.

2.2.4 Protein-spezifische Methoden

2.2.4.1 Gesamt-Proteinextraktion aus *P. anserina*

Bei der Isolation von Gesamtproteinextrakten aus *P. anserina* wurden die Stämme nach der zweitägigen Keimung auf BMM mit Ammoniumacetat entweder für 2 Tage auf M2-Festmedium mit Cellophan angezogen und anschließend für weitere 3 Tage in CM-Flüssigmedium unter Schütteln und Dauerlicht bei 27 °C inkubiert, oder direkt nach 3 tägiger Inkubation bei 27 °C und Dauerlicht auf M2-Platten mit Cellophan geerntet. Für unterschiedliche Altersstadien wurden die Stämme zuvor auf M2-Festmedium angezogen. Zur Protein-Isolation von Flüssigkulturen wurde das Myzel aus je einem Kolben mit 200 ml CM über zweilagigen Mull abfiltriert und je 250 mg in ein Precellys-Reaktionsgefäß mit Glasperlen überführt. Zur Gewinnung von Proteinextrakten von Platten wurde das Myzel direkt mit einem Spatel abgenommen und ebenfalls 250 mg des geernteten Myzels in ein Precellys Reaktionsgefäß mit Glasperlen überführt. Das Myzel wurde anschließend mit dem 2-fachen Volumen (500 µl) Proteinextraktionspuffer versetzt. Die Ansätze wurden stets auf Eis gehalten. Der Aufschluss erfolgte mit dem Homogenisator Precellys 24 (Bertin Technologies) in zwei Schritten für 25 s bei 5.800 Upm. Zwischen den Schritten wurde der Aufschluss für 10 s pausiert. Abschließend wurden die Proben für 5 min bei 10.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor) und 4 °C zentrifugiert und der Überstand, die Proteinextrakte, in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gesamtproteinextrakte wurden entweder direkt verwendet oder bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.2.4.2 Mitochondrien-Isolation aus *P. anserina*

Zur Isolation von Mitochondrien aus *P. anserina* wurden die Stämme nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Festmedium mit Ammoniumacetat für 2 Tag auf M2-Festmedium mit Cellophan angezogen und anschließend für weitere 3 Tage in CM-Flüssigmedium unter Schütteln und Dauerlicht bei 27 °C inkubiert. Zur Isolation von Mitochondrien aus älteren Stämmen wurden die Isolate zunächst zur Alterung auf M2-Festmedium angezogen, bevor sie für 2 Tage auf M2-Festmedium mit Cellophan inkubiert und anschließend für weitere 3 Tage in CM-Flüssigmedium unter Schütteln und Dauerlicht bei 27 °C kultiviert wurden. Nach der Anzucht wurden die Stämme über zweilagigen Mull vorsichtig

abfiltriert und in ein Becherglas auf Eis überführt. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts erfolgten die weiteren Schritte im Kühlraum bei 4 °C. Zunächst wurde je max. 5 g des Myzels in einen Beater-Becher mit Glasperlen überführt und der Becher mit Mitochondrien-Isolationspuffer² gefüllt und luftblasenfrei verschlossen. Der Aufschluss des Myzels erfolgte mechanisch mit dem „Beater™“-Homogenisator in zwei Schritten von je 20 s. Zwischen den Schritten wurde der Aufschluss für 1 min pausiert. Anschließend wurde das Homogenisat durch ein Nesseltuch filtriert und in einen sterilen GSA-Becher überführt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 2.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) und 4 °C wurde der Überstand erneut über einen Glastrichter mit Glaswolle abfiltriert, das Filtrat in einen frischen GSA-Becher überführt und für 20 min bei 10.000 Upm (Sorvall GSA SLA-1500-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig und luftblasenfrei in 1 ml Mitochondrien-Isolationspuffer¹ resuspendiert und auf einen 20/36/50 %-igen Saccharosegradienten (4 ml 50 %-, 4 ml 36 %- und 2 ml 20 %-ige Saccharose-Lösung) aufgetragen. Die Suspension wurde in der Ultrazentrifuge für 60 min bei 25.000 Upm (Sorvall TH641-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bilden sich drei Phasen, zwei Banden zwischen den Phasen und ein Pellet. In der ersten Bande zwischen der 20 und 36 %-igen Saccharose-Lösung sammeln sich defekte Mitochondrien, sodass diese Bande und die beiden zugehörigen Phasen abgenommen und verworfen wurden. In der zweiten Bande zwischen der 36 und 50 %-igen Saccharose-Lösung befinden sich die intakten Mitochondrien. Diese Bande wurde abgenommen und in ein SS34-Röhrchen überführt. Das SS34-Röhrchen wurde zu 2/3 mit Mitochondrien-Isolationspuffer¹ gefüllt und die Suspension für 20 min bei 11.500 Upm (Sorvall SS34-Rotor) und 4 °C zentrifugiert. Die Mitochondrien-Pellets wurden je in 200–500 µl Mitochondrien-Isolationspuffer¹ rückgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach der Konzentrationsbestimmung bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Gesamt- und mitochondrialen Proteinextrakten erfolgte mittels eines photometrischen Bradford-Tests (Bradford, 1976). Hierfür wurde das Bradford-Reagenz „Roti®-Nanoquant“ (1:5-Verdünnung mit H₂O) verwendet. Zunächst musste eine Eichgerade mit bekannten Mengen an Rinderserumalbumin (BSA) erstellt werden. Je nach Extrakt wurden entweder 10 µl Proteinextraktionspuffer (Gesamtproteinextrakt) oder 10 µl Mitochondrien-Isolationspuffer¹ (mitochondriales Proteinextrakt) hinzugeben. Entweder wurden 2 µl der unverdünnten Probe, oder 2 µl einer 1:5-Verdünnung der zu messenden Probe mit 8 µl Proteinextraktionspuffer (bzw. Mitochondrien-Isolationspuffer¹), 190 µl H₂O und 800 µl einer 1:5-„Roti®-Nanoquant“-Verdünnung versetzt. Durch die Zugabe des „Roti®-Nanoquant“ wurde die Reaktion gestartet. Zur Messung der Konzentration wurde die Extinktion der Proben bei 450 und 590 nm im Photometer gemessen. Jede Probe wurde in einer Dreifachbestimmung gemessen. Anschließend wurde der Quotient A₅₉₀/A₄₅₀

der Messwerte gebildet, anhand der Eichgerade konnten die Konzentrationen der Proteinextrakte bestimmt werden.

2.2.4.4 Cycloheximid-Assay

Zur Untersuchung möglicher Substrate von PaCLPXP, wurde ein Cycloheximid-Assay durchgeführt. Cycloheximid inhibiert die Proteinsynthese, sodass sich bei der Behandlung der *PaClpP*-Deletionsmutante die Proteine anreichern sollten, die normalerweise von PaCLPP abgebaut werden. Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Georg Auburger (Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie, ZNN; Klinik für Neurologie; Experimentelle Neurologie; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) und Dr. Ilka Wittig (Funktionelle Proteomics, ZBC, Fachbereich Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) geplant und durchgeführt. Dazu wurden zunächst Wildtyp-Stämme und *PaClpP*-Deletionsstämme nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Festmedium mit Ammoniumacetat im Dunkeln für 3 Tage auf M2-Festmedium mit Cellophan bei 27 °C und Dauerlicht angezogen und anschließend für weitere 3 Tage in 200 ml CM-Flüssigmedium unter Schütteln und Dauerlicht bei 27 °C inkubiert. Zur Behandlung mit 1 µg/ml Cycloheximid (3,6 µM) wurden die Kulturen 24 Stunden vor der Ernte mit 4 µl Cycloheximid-Lösung (50 mg/ml Cycloheximid) versetzt und bis zur Ernte weiterhin bei 27 °C unter Schütteln und Dauerlicht kultiviert. Gleichzeitig wurden zur Kontrolle Stämme angezogen, die nicht mit Cycloheximid behandelt wurden. Anschließend wurden die Gesamtproteinextrakte dieser Stämme wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben isoliert. Nachdem die Konzentration der Proben bestimmt wurde (siehe Abschnitt 2.2.4.3), wurden je 20 µg Proteinextrakt in einem Gesamtvolumen von 16,5 µl in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 3,5 µl 6x SDS-Probenpuffer versetzt. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht und nach dem Abkühlen auf Eis (für 5 min) bei -20 °C gelagert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte mit Hilfe einer massenspektroskopischen Analyse, die von Frau Dr. Ilka Wittig (Funktionelle Proteomics, ZBC, Fachbereich Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) durchgeführt wurde. Dabei wurde ein quantitatives „markierungsfreies“, globales Proteom-Profil erstellt („Label-free global proteom profiling“). Verglichen wurden jeweils die Proben der Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stämme mit Cycloheximid-Behandlung und die Proben der Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stämme ohne Cycloheximid-Behandlung. Pro Stamm wurden je drei biologische Replikate analysiert.

2.2.4.5 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung denaturierter Gesamtproteinextrakte und mitochondrialer Proteine wurden die Elektrophorese-Kammern „Mini-Protean® II“ und „Mini-Protean® Tetra Cell“ von BioRad nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden entweder 8 oder 12 %-ige Polyacrylamid-Trenngele mit 5 %-igen Polyacrylamid-Sammelgelen benutzt. Vor der gelelektrophoretischen

Auftrennung wurden meist 50 – 150 µg der Proben in einem Volumen von 16 µl mit 4 µl eines 6x SDS-Probenpuffers versetzt, für 10 min bei 95 °C im Heizblock aufgeköcht und für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach einer kurzen Zentrifugation (max. 1 min bei 10.000 Upm (Eppendorf FA45-24-11-Rotor)) wurden die Proben in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Größenstandard wurden je 1,5 µl des „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch das Anlegen eines elektrischen Feldes bei 100 V für 2 h in 1x Laufpuffer mit 0,1 % SDS.

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Das Färben von Proteinen in einem Polyacrylamidgel erfolgte durch einstündige Inkubation des Gels in einer Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurde das Gel gründlich mit H₂O gespült und über Nacht in Coomassie-Entfärber-Lösung inkubiert. Am Folgetag wurde der Coomassie-Entfärber über Aktivkohle filtriert und zur Wiederverwendung aufbewahrt. Das Polyacrylamidgel wurde mit H₂O gespült und mit dem Infrarot-Scanner (Odyssey Infrared Imager) dokumentiert.

2.2.4.6 Western-Blot-Analyse

Zur Detektion spezifischer geoelektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dabei wurden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierfür wurde die „Mini Trans-Blot® Cell“ von BioRad nach dem „Wet/Tank-Blot“-Verfahren nach Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurde die Membran in Methanol äquilibriert und anschließend kurz in Blotting-Puffer inkubiert. Die Polyacrylamidgele, Schwämme und Filterpapiere wurden ebenfalls in Blotting-Puffer getränkt. Nach Aufbau und Befüllung der Apparatur mit gekühltem Blotting-Puffer erfolgte der Transfer der Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes für 1 h bei 100 V und 4 °C. Nach dem Transfer wurde die Membran erneut kurz in Methanol inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen und für eine Stunde mit „Odyssey-Blocking-Puffer“ bei RT und unter Schütteln behandelt. Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Membran über Nacht bei 4 °C und unter Schütteln mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert (Antikörper-Verdünnung in „Odyssey-Blocking-Puffer“ mit 0,1 % Tween©20). Am Folgetage wurde die überschüssige Antikörper-Lösung abgenommen und die Membran 4x je 5 min mit 1x PBS mit 0,1 % Tween©20 gewaschen. Es erfolgte eine erneute Inkubation mit einem geeigneten sekundären Antikörper (Fluoreszenz-markiert; Antikörper-Verdünnung in „Odyssey-Blocking-Puffer“ mit 0,1 % Tween©20 und 0,02 % SDS) für 1 – 2 h bei RT, unter Schütteln und im Dunklen. Anschließend wurde erneut die überschüssige Antikörper-Lösung abgenommen und die Membran 4x je 5 min mit 1x PBS mit 0,1 % Tween©20 gewaschen. Abschließend wurde die Membran gründlich mit 1x PBS ohne Tween©20 gespült und entweder direkt mit dem Infrarot-Scanner (Odyssey Infrared Imager) oder dem NIR-

Dokumentationsgerät (Odyssey XF Imager System) bei einer geeigneten Wellenlänge angeregt und dokumentiert oder bis zur Verwendung bei 4 °C in 1x PBS ohne Tween®20 gelagert.

2.2.4.7 Aconitase-Aktivitäts-Messungen

Zur Messung der Aktivität der mitochondrialen Aconitase wurde das Aconitase-Assay-Kit von Abcam nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wird Citrat von der Aconitase in Isocitrat umgesetzt. In diesem Assay wird Isocitrat anschließend weiterverarbeitet, sodass ein Produkt entsteht, das eine fast farblose Probe in eine intensiv gefärbte Probe mit einem Absorptionsmaximum (λ_{\max}) bei 450 nm umsetzt.

Vor der Anwendung des Aconitase-Assay-Kits wurden zunächst die Mitochondrien der zu untersuchenden Stämme wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben isoliert. Am Ende der Isolation wurde das Mitochondrien-Pellet nicht in Mitochondrien-Isolationspuffer¹, sondern in 200 – 400 µl Assay-Puffer des Aconitase-Assay-Kits von Abcam rückgelöst. Anschließend wurde zum Aufschluss der Mitochondrien die Suspension insgesamt 3x für 30 sec bei einer 10 - 15 %-igen Leistung am Ultraschallgerät (UW 2070) beschallt. Zwischen den Schritten wurden die Proben für je 1 min auf Eis gehalten. Danach wurden die Konzentrationen der mitochondrialen Proteine wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben bestimmt, wobei statt des Mitochondrien-Isolationspuffer¹ der Assay-Puffer für die Eichgerade und die Verdünnung der Proben eingesetzt wurde. Unabhängig von der Konzentration wurden anschließend 100 µl der Proben für den Assay eingesetzt. Die Messung der Aconitase-Aktivität erfolgte mit dem Aconitase-Assay-Kit von Abcam nach Herstellerangaben in 96-well Mikrotiterplatten. Die Reaktionen wurden je für 60 min bei 25 °C durchgeführt. Zur Messung der optischen Dichte bei 450 nm (OD_{450nm}) wurde das Mikrotiterplatten-Lesegerät (Safire 2, Tecan) verwendet. Zuvor wurde die Mikrotiterplatte für 1 min bei 2.000 Upm (Eppendorf A-2-DWP-Rotor) und RT zentrifugiert, um Luftblasen zu entfernen. Anhand einer Isocitrat-Standard-Kurve und unter Berücksichtigung der eingesetzten Protein-Menge konnte die Umsetzung von Isocitrat durch die Aconitase bestimmt (mU/mg Protein) und dadurch Rückschlüsse auf die Aconitase-Aktivität gezogen werden.

2.2.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde der gepaarte „Student’s t-Test“ verwendet. Die Signifikanz wurde jeweils als p -Wert angegeben. In Abbildungen wurden die p -Werte folgendermaßen angegeben: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Ggf. wurden die Signifikanzen von Lebensspannen mit der „SPSS statistics 19“-Software (IBM) ermittelt und das Überleben der Kulturen nach Kaplan-Meier analysiert.

3. Ergebnisse

Die *P. anserina*-Mutante $\Delta PaClpP$ zeichnet sich im Vergleich zum Wildtyp durch eine sehr viel längere Lebensspanne aus (Fischer *et al.*, 2013), deren Ursache bislang noch unklar ist. Deshalb wurde eine Substratanalyse von PaCLPP durchgeführt, um einen Eindruck für deren biologische Rolle dieser Protease zu erlangen. Dabei konnten eine Reihe von potentiellen Substraten und Interaktionspartnern von PaCLXP identifiziert werden, die am Energiemetabolismus beteiligt sind (Fischer *et al.*, 2015). Ob und wie PaCLXP an der Regulation des Energiemetabolismus von *P. anserina* beteiligt ist, ist allerdings noch weitestgehend unbekannt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen genaueren Blick auf den Einfluss dieser mitochondrialen Protease auf die Energie-Homöostase zu werfen und möglicherweise Anhaltspunkte zu finden, welche für die Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante wichtig sein könnten. In vorangegangenen Arbeiten konnten bereits zeigen, dass die Autophagie für die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ wichtig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Doch ist noch unklar, ob die Autophagie alleine für den langlebigen Phänotyp zuständig ist und wie diese reguliert wird.

3.1 Identifizierung potentieller PaCLXP-Substrate

In früheren Untersuchungen wurde nach möglichen Substraten der mitochondrialen Protease PaCLXP gesucht (Fischer *et al.*, 2015). Hierfür wurde ein sogenannter „*Substrat-trapping-Assay*“ verwendet, für den ein Stamm mit einer katalytisch inaktiven und markierten CLPP-Variante erstellt wurde. Durch anschließende Aufreinigung und massenspektroskopische Analysen wurden dann die Substrate identifiziert, welche zwar noch von der CLPP gebunden, aber durch die katalytische Inaktivität nicht mehr abgebaut werden können (Fischer *et al.*, 2015). Dieses Verfahren wurde erstmals in *E. coli* angewandt (Flynn *et al.*, 2003; Neher *et al.*, 2006) und wurde von Fischer *et al.* (2015) für *P. anserina* etabliert. Bei dieser Analyse konnten einige Komponenten verschiedener Signalwege als potenzielle Substrate der PaCLXP identifiziert werden. Zum Beispiel Komponenten der Glykolyse, der Elektronentransportkette oder des Citratzyklus (Fischer *et al.*, 2015). Limitierend bei dieser Methode der Substrat-Identifizierung ist beispielsweise, dass nur Substrate gefunden werden, welche direkt an CLPP binden. Solche, welche nur kurz mit der Protease interagieren, können leicht übersehen werden. Auch könnten bei der Aufreinigung der Substrate, bzw. der PaCLPP nach der Co-Immunpräzipitation einige potentielle Substrate und Interaktionspartner verloren gehen, sodass diese gar nicht erkannt werden könnten. Das größte Problem bei dieser Analyse stellt jedoch die Benutzung des humanen Homologes der inaktiven CLPP-Variante dar, da die proteolytisch inaktive PaCLPP-Variante in *P. anserina* eine veränderte Größe im Western-Blot aufweist und somit nicht ausgeschlossen werden

kann, dass diese Protease sich selbst durch eine autokatalytische Prozessierung modifiziert (Fischer *et al.*, 2015). Diese Modifikation wiederum könnte für die Funktion der Protease essentiell sein. Da das humane Homolog den Phänotyp der *PaClpP*-Deletionsmutante revertieren kann, wurde die Analyse mit dem humanen Homolog durchgeführt, da diese Variante keine veränderte Größe in der Western-Blot-Analyse aufweist (Fischer *et al.*, 2015).

Aufgrund der beschriebenen Limitierungen sollten die Ergebnisse mit einer weiteren, unabhängigen Methode untermauert und gegebenenfalls weitere Substrate identifiziert werden. Dies sollte mit Hilfe eines Cycloheximid-Assays erfolgen. Dabei wird die Proteinneusynthese durch Cycloheximid inhibiert, sodass sich in der *PaClpP*-Deletionsmutante mit Cycloheximid die putativen Substrate anreichern. Dieses Experiment wurde im Rahmen einer Kooperation mit Prof. Dr. Georg Auburger (Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie, ZNN; Klinik für Neurologie; Experimentelle Neurologie; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) und Dr. Ilka Wittig (Funktionelle Proteomics, ZBC, Fachbereich Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) geplant und durchgeführt.

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches erfolgreich die RNA- und Proteinsynthese in Eukaryoten, aber nicht in Prokaryoten, inhibiert (Ennis und Lubin, 1964; de Kloet, 1966; Haidle und Storck, 1966; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010). Cycloheximid wird von *Streptomyces griseus* produziert und hemmt durch die Inhibierende Wirkung auf die Proteinsynthese das Wachstum von vielen Hefen und Pilzen, hat allerdings nur einen geringen Effekt auf das Wachstum von Bakterien (Siegel und Sisler, 1963; Ennis und Lubin, 1964; Ennis, 1966).

Für die Analyse wurden die Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stämme nach 2-tägiger Keimung für 3 Tage auf M2-Medium-Platten angezogen und anschließend für weitere 3 Tage in CM-Flüssigmedium inkubiert. 24 Stunden vor der Ernte wurden die Kulturen mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid versetzt. Als Kontrolle wurden zeitgleich Stämme angezogen, welche ohne Cycloheximid inkubiert wurden. Anschließend wurden die Gesamtproteinextrakte isoliert und massenspektroskopisch analysiert. Durch die Zugabe von Cycloheximid wird die Neusynthese von Proteinen unterdrückt, sodass sich die potentiellen Substrate von PaCLPP durch das Fehlen eben dieser Protease anreichern sollten. Die massenspektroskopische Analyse wurde von Dr. Ilka Wittig (Funktionelle Proteomics, ZBC, Fachbereich Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) durchgeführt. Durch diese Proteom-Analyse der mit Cycloheximid-behandelten Proben konnten insgesamt 32 Proteine nachgewiesen werden, welche in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp signifikant angereichert waren (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant angereicherten Proteine nach 24-stündiger Cycloheximid Behandlung im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben sind jeweils die UniProt_IDs der einzelnen Proteine, die ID der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank (Pa_ID), der Faktor („x-fach“) mit den dazugehörigen *p*-Werten ($p < 0,05$; ermittelt mit dem „*Students t-test*“) und die jeweilige UniProt-Annotierung der Proteine. Die Analyse wurde jeweils mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinextrakte der Stämme wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid isoliert. Die identifizierten Proteine sind nach der Stärke der Anreicherung sortiert. Die grau-unterlegten Pa_IDs zeigen die Proteine, die von Fischer *et al.* (2015) ebenfalls als potentielle Substrate und Interaktionspartner identifiziert wurden. Die fettgedruckten Pa_IDs visualisieren die Proteine, welche auch ohne Cycloheximid-Behandlung angereichert waren (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

UniProt_ID	Pa_ID	x-fach $\Delta PaClpP$ vs. WT	<i>p</i> -Wert	UniProt-Annotierung
B2AS71	Pa_1_22550	539,37	6,20E-07	Reticulon-like protein
B2AFE5	Pa_5_12970	144,09	1,37E-05	Protein of unknown function
B2AV80	Pa_7_3830	118,22	1,31E-05	Mitochondrial LSU ribosomal protein L14 precursor
A0A090CGN1	Pa_3_5750	51,94	6,65E-04	Mitochondrial SSU ribosomal protein L32 precursor
B2B5Z2	Pa_2_6240	3,41	1,39E-02	GMP synthase
B2AFW8	Pa_0_1400	3,19	2,63E-02	Peptide hydrolase/ aminopeptidase Y precursor
B2ARQ6	Pa_4_6710	2,91	1,10E-02	Ribosomal_L33 domain
B2ACX4	Pa_3_11170	2,75	6,08E-04	Biotin synthase 2
B2VL96	Pa_5_5380	2,51	4,63E-03	Complex I-B22
B2ANV7	Pa_7_1300	2,46	1,78E-02	Centromere protein T
B2AKK9	Pa_5_8030	2,08	2,73E-02	Calmodulin
B2AXK5	Pa_7_10880	1,93	2,81E-02	Ornithine aminotransferase
A0A090CVB0	Pa_6_6100	1,91	4,89E-02	Aspartate carbamoyltransferase
B2AUS3	Pa_1_20110	1,85	9,21E-04	Mitochondrial methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain precursor
B2B244	Pa_6_5480	1,81	3,26E-02	Cytochrome c oxidase polypeptide 5 encoded by the <i>cox5</i> gene
B2AND2	Pa_6_10240	1,81	3,88E-02	SEC14 cytosolic factor
B2B4T2	Pa_2_2360	1,78	1,95E-02	60S ribosomal protein Rpl36 isoform 1
B2B148	Pa_3_9290	1,73	3,58E-02	ATP citrate synthase subunit 1
A0A090CMY4	Pa_5_9660	1,68	4,27E-02	NADP-dependent oxidoreductase
B2AT34	Pa_1_14540	1,68	2,11E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
B2A8Z7	Pa_1_7930	1,67	4,17E-02	Protein-synthesizing GTPase
A0A090CV63	Pa_6_2130	1,67	5,75E-03	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3
B2AVL5	Pa_7_2530	1,61	9,30E-03	Mitochondrial LSU ribosomal protein L31 precursor
B2B270	Pa_6_5750	1,59	9,97E-03	Precursor of Heat shock protein 60 (HSP60)
B2B6R1	Pa_2_8560	1,57	2,56E-02	Mitochondrial SSU ribosomal protein S13 precursor
B2B1N9	Pa_6_3950	1,55	4,02E-04	Threonine synthase
A0A090CUK0	Pa_3_8970	1,53	4,70E-02	Uncharacterized protein (cytochrome c oxidase subunit 6B family)
B2ARC6	Pa_4_7950	1,51	4,06E-02	Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit precursor
B2B163	Pa_3_9440	1,31	2,14E-02	Glutamate decarboxylase
B2B010	Pa_3_2310	1,29	1,68E-02	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
B2ATJ3	Pa_1_16060	1,26	3,97E-02	Serine-threonine kinase receptor-associated protein
A0A090CK22	Pa_4_6720	1,22	2,08E-02	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase

Wie in Tabelle 3.1 zu erkennen ist, konnten sieben der gefundenen Proteine sowohl in den Proben ohne, als auch mit Cycloheximid identifiziert werden (fettgedruckte Pa_ID; Proteine ohne Cycloheximid: siehe Anhang, Tabelle 8.1). Im Anhang befinden sich detaillierte Tabellen mit allen veränderten Proteinen, also auch denen, welche signifikant vermindert vorliegen (siehe Anhang, Tabelle 8.1 & 8.2). Als Substrate kommen allerdings nur die Proteine in Frage, welche nach der Cycloheximid-Behandlung signifikant angereichert vorliegen, da sich durch die unterdrückte Proteinsynthese die potentiellen Substrate von PaCLPP anreichern sollten. Bei den Proben ohne Cycloheximid könnten einige Proteine zur Kompensation hochreguliert worden sein, also angereichert vorliegen, ohne dass sie wirklich Substrate der PaCLPP sind.

Vier potentielle Substrate wurden gefunden, welche auch durch den „*Substrat-trapping-Assay*“ in Fischer *et al.* (2015) identifiziert werden konnten. Alle anderen Proteine stimmen nicht mit den Daten aus Fischer *et al.* (2015) überein. Durch die Aufreinigung der katalytisch inaktiven PaCLPP-Protease können nur Substrate und Interaktionspartner identifiziert werden, die kovalent an PaCLPP binden und sich in räumlicher Nähe zu dieser Protease befinden. Dies bedeutet, dass auch bei dieser Methode möglicherweise viele Substrate übersehen werden könnten, die nicht präferiert an PaCLPP binden, aber dennoch unter bestimmten Bedingungen von dieser Protease abgebaut werden.

Das Protein, das nach der Cycloheximid-Behandlung um das 500-fache und damit am stärksten angereichert vorliegt, ist ein Retikulum-ähnliches Protein (Pa_1_22550; siehe Tabelle 3.1). Diese Sorte von Proteinen kommen im endoplasmatischen Retikulum vor und sind dort wichtig für die Membrankrümmungen und die Bildung von Vesikeln. Des Weiteren befinden sich unter den angereicherten Proteinen viele ribosomale Untereinheiten oder deren Vorläufer-Proteine. So sind zum Beispiel auch unter den ersten vier Proteinen, die am häufigsten vorkommen, zwei Untereinheiten mitochondrialer Ribosomen vertreten (Vorläufer des mitochondrialen LSU ribosomalen Proteins L14, Pa_7_3830; Vorläufer des mitochondrialen SSU ribosomalen Proteins L32, Pa_3_5750).

Außerdem konnten auch Proteine, die direkt am Energiemetabolismus beteiligt sind, wie zum Beispiel Komponenten der Elektronentransportkette (z. B. eine Untereinheit des Komplex I, NDUFV1, Pa_4_7950), der Aminosäuresynthese (z. B. die Ornithin Aminotransferase, Pa_7_10880) oder der Glykolyse (z. B. eine Komponente der Pyruvat-Dehydrogenase E2, PDHE2, Pa_3_2310) nachgewiesen werden. Auch bei dem „*Substrat-trapping-Assay*“ konnten einige Proteine identifiziert werden, welche im Energiemetabolismus von *P. anserina* involviert sind (Fischer *et al.*, 2015). Diese beiden Analysen unterstützen die Annahme, dass PaCLPP eine wichtige Rolle in der Energiehomöostase einnimmt. Des Weiteren konnten ebenso wie bei Fischer *et al.* (2015) Komponenten des Energiemetabolismus als Substrate identifiziert werden, was die Relevanz der PaCLPP in diesem Bereich verfestigt.

Zusammenfassend lassen diese Ergebnisse vermuten, dass über die Rolle von PaCLPP an der Regulation des Energiemetabolismus hinaus, diese Protease an der Regulation der Translation beteiligt ist, da viele der gefundenen putativen Substrate ribosomale Untereinheiten darstellen. Außerdem lässt die extreme Anreicherung des Retikulum-ähnlichen Proteins darauf schließen, dass der Vesikel-Transport beeinflusst sein könnte. Da bereits gezeigt werden konnte, dass Retikulum-ähnliche Proteine auch für den Lipidaustausch zwischen dem ER und den Mitochondrien wichtig ist (Voss *et al.*, 2012), könnte dies auch ein Hinweis für eine veränderte Lipidverteilung sein.

3.2 Beeinflussung der Autophagie in *Podospora anserina* durch Manipulation der Acetyl-Coenzym A-Menge.

Durch die mögliche Rolle von PaCLPP bei der Regulation der Energiehomöostase (Fischer *et al.*, 2015), ist es möglich, dass die Menge an Acetyl-CoA in der *PaClpP*-Deletionsmutante verändert sein könnte. Acetyl-CoA ist ein wichtiger Faktor für den Energiemetabolismus, da dieses Intermediat im Mittelpunkt des Fett-, Zucker- und des Protein-Katabolismus steht. Daher ist es gut denkbar, dass die Menge an Acetyl-CoA durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst ist. Interessanterweise konnte auch die Regulation der Autophagie mit Acetyl-CoA in Zusammenhang gebracht werden (Eisenberg *et al.*, 2014; Mariño *et al.*, 2014). Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Autophagie in der *PaClpP*-Deletionsmutante wichtig für deren Langlebigkeit ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017), soll in den nächsten Schritten der Zusammenhang zwischen der Acetyl-CoA-Menge und der Autophagie in $\Delta PaClpP$ genauer untersucht werden.

Die Entstehung von Acetyl-CoA bildet den Mittelpunkt des Energiestoffwechsels. Hierbei wird Acetyl-CoA direkt in den Citratzyklus eingeschleust und dient als Intermediat für diesen Stoffwechselweg. Dies ist allerdings nicht zwingend notwendig, auch andere Produkte katabolischer Wege, wie zum Beispiel α -Ketoglutarat, welches beim Abbau von Proteinen aus Glutamat entsteht, können direkt in den Citratzyklus eingeschleust werden (Nelson *et al.*, 2009).

Acetyl-CoA entsteht über den Abbau von Aminosäuren, Fettsäuren und Zuckern. Unter anderem wird Acetyl-CoA beim Abbau der Aminosäuren Tryptophan, Lysin, Phenylalanin, Tyrosin, Isoleucin, Leucin und Threonin gebildet (Nelson *et al.*, 2009). Ein weiterer Weg für die Zelle Acetyl-CoA zu generieren, ist die Umsetzung des Esters der Buttersäure, Butyrat (Leschelle *et al.*, 2000).

In dieser Arbeit sollte nun der Acetyl-CoA-Gehalt und dadurch auch die Autophagie durch die Zugabe der Aminosäure Leucin, sowie alternativ durch die Zugabe von Butyrat manipuliert werden.

Nach der Anzucht auf den verschiedenen Medien wurde zur Beurteilung der nicht selektiven Autophagie der sogenannte „GFP-cleavage-Assay“ mit den Reporterstämmen *PaSod1::Gfp* und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ angewandt. Bei diesen Reporterstämmen ist ein Plasmid ins Genom eingebaut, das für ein PaSOD1::GFP-Fusionsprotein kodiert. Hierbei wurde die cytosolische Superoxid-Dismutase PaSOD1 mit GFP fusioniert (Knuppertz *et al.*, 2014). Bei Autophagie-Induktion können durch den vakuolären Abbau des Reporterproteins PaSOD1::GFP Rückschlüsse auf den autophagischen Fluss gezogen werden. In einer Western-Blot-Analyse mit einem anti-GFP-Antikörper und Gesamtproteinextrakten können sowohl das intakte Fusionsprotein PaSOD1::GFP (ca. 40 kDa) als auch das bereits in der Vakuole befindliche „freie GFP“ (ca. 25 kDa) nachgewiesen werden. Das GFP ist aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften länger in der Vakuole stabil und nachweisbar. Dadurch kann abgeschätzt werden, welche Menge des cytosolischen Reporterproteins durch nicht-selektive Autophagie abgebaut wurde.

3.2.1 Zugabe von Leucin zur Manipulation der Autophagie

Um zu untersuchen, welchen Einfluss eine Zugabe von Leucin zum Medium auf die Autophagie hat, wurden die Reporterstämmen zunächst auf M2-Festmediumplatten zum Altern angezogen. Drei Tage vor der Ernte wurden die Stämme dann auf M2-Platten mit bzw. ohne 150µg/ml Leucin überführt und das Myzel anschließend direkt von der Platte geerntet. In der Theorie sollte eine zusätzliche Bereitstellung von Leucin zu einer Erhöhung des Acetyl-CoA-Gehalts führen und damit zu einer Reduzierung der Autophagie, wenn diese durch einen Mangel an Acetyl-CoA induziert wird. Zur Alterung wurden die Stämme auf M2-Platten zunächst ohne Zugabe von Leucin angezogen. Die Gesamtproteinextrakte von je 5 und 12 Tage alten Stämmen wurden analysiert. Abbildung 3.1 zeigt die Western-Blot-Analyse dieser Proben und deren Quantifizierung vom Verhältnis des „freien GFPs“ und des „gesamten GFPs“ (summierte Intensität des „freien GFP“ und des Fusionsproteins PaSOD1::GFP).

Wie in Abbildung 3.1 zu erkennen ist, hat Leucin nur auf 5 Tage alte Wildtyp-Stämme einen signifikant negativen Einfluss auf die Autophagie (Abb. 3.1 A,B). Dieser Effekt ist bei 12 Tage alten Stämmen nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.1 C,D). Bei der *PaClpP*-Deletionsmutante scheint Leucin keinen Einfluss auf die Autophagie zu haben. Sowohl bei 5 Tage alten, als auch bei 12-Tage alten Kulturen kann kein Unterschied zu den Kulturen ohne Leucin beobachtet werden.

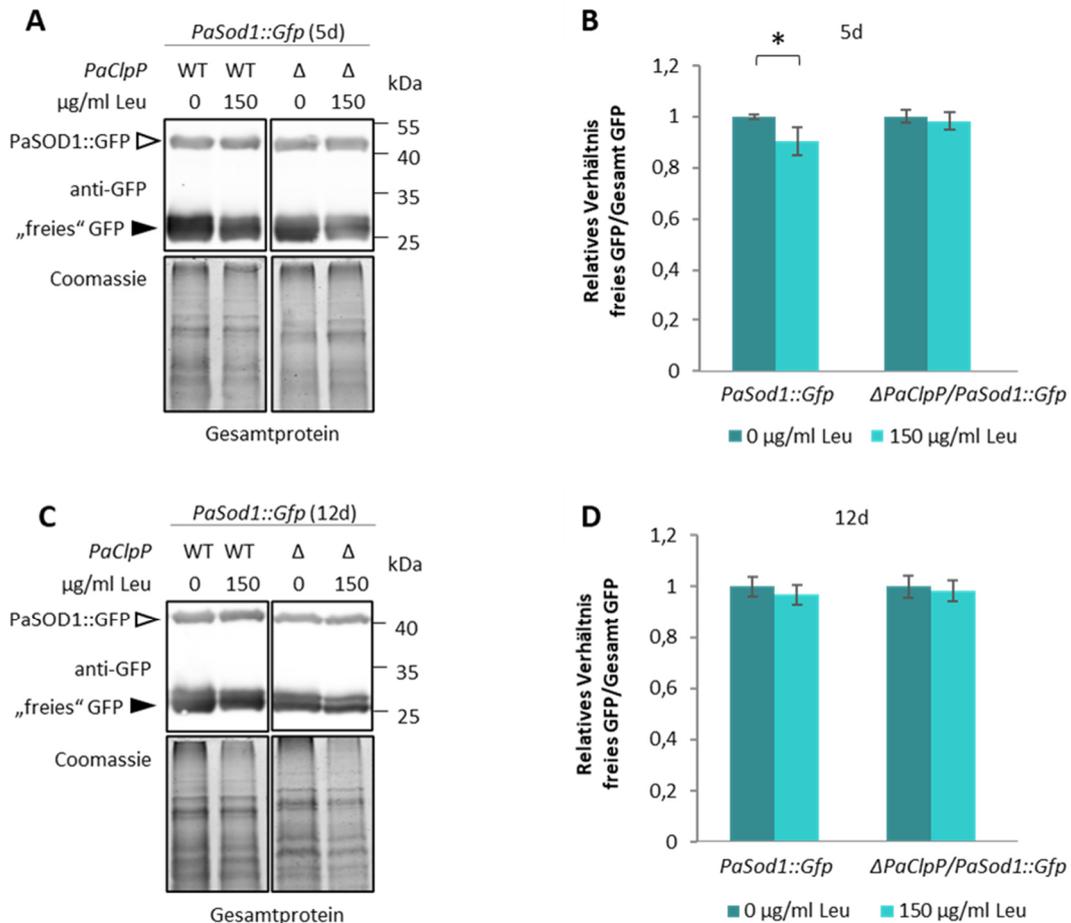


Abbildung 3.1: Effekt von Leucin auf die Autophagie.

(A,C) Western-Blot-Analysen von verschiedenen alternen *P. anserina* Stämmen. Es wurden je 20 μ l der Gesamtproteinextrakte auf 12 %-ige SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Das GFP wurde mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel diente hierbei als Ladekontrolle. Ausgewählte Größen des Größenstandards sind jeweils rechts angegeben. (A) Western-Blot-Analyse 5 Tage (5d) alter *PaSod1::Gfp*- und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Stämme (je $n=4$), welche mit 0 μ g/ml oder mit 150 μ g/ml Leucin angezogen wurden. (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (A). Gezeigt ist das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ (summierte Intensität des freien GFP und des Fusionsproteins PaSOD1::GFP) \pm Standardabweichung. Das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ der Proben ohne Leucin wurde jeweils als 1 definiert. p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (*: $p < 0,05$). (C) Western-Blot-Analyse 12 Tage (12d) alter *PaSod1::Gfp*- und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Stämme, welche mit 0 μ g/ml ($\Delta PaClpP/Sod1::Gfp$: $n=4$; *PaSod1::Gfp*: $n=3$) oder mit 150 μ g/ml (je $n=4$) Leucin angezogen wurden. (D) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (C). Dargestellt ist das Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ (summierte Intensität des freien GFP und des Fusionsproteins PaSOD1::GFP) \pm Standardabweichung. Das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ der Proben ohne Leucin wurde jeweils als 1 definiert.

Daher ist Leucin nicht geeignet, die Autophagie in den untersuchten Stämmen zu beeinflussen. Dennoch sollte auch der Effekt der Zugabe von Leucin auf die Lebensspanne untersucht werden, da Leucin möglicherweise über einen anderen Weg die Lebensspanne von *P. anserina* beeinflussen könnte. Um dies zu testen, wurden Lebensspannen-Analysen des Wildtyps und der *PaClpP*-Deletionsmutante auf M2-Medium mit drei unterschiedlichen Leucin-Konzentrationen (30, 90 und 150

µg/ml Leucin) durchgeführt und mit Stämmen verglichen, welche auf M2-Medium ohne Leucin (0 µg/ml) angezogen wurden.

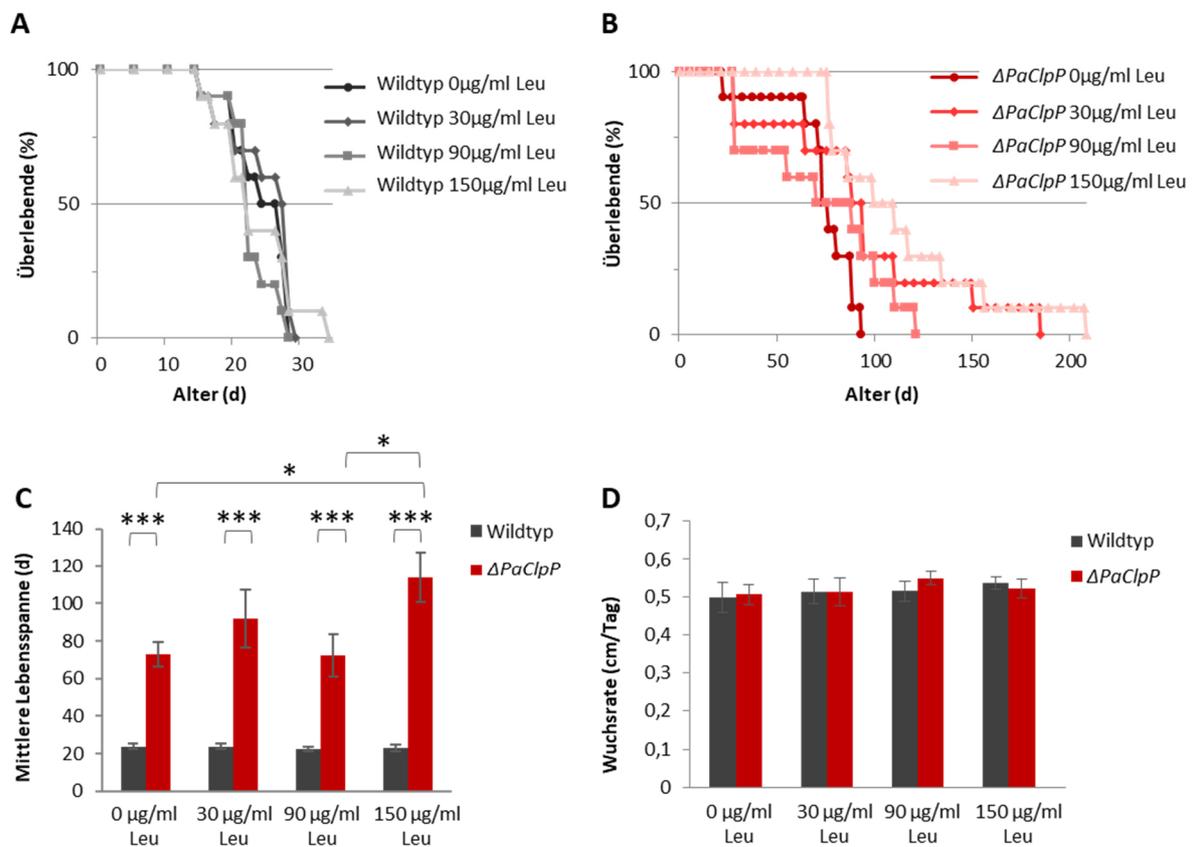


Abbildung 3.2: Effekt von Leucin auf die Lebensspanne und Wachstumsrate.

(A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen (je n=10) auf M2-Medium-Platten mit 0, 30, 90 oder 150 µg/ml Leucin (Leu) bei 27 °C und Dauerlicht. (B) Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ -Stämmen (je n=10) auf M2-Medium-Platten mit 0, 30, 90 oder 150 µg/ml Leucin (Leu) bei 27 °C und Dauerlicht. (C) Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) und (B) mit Standardfehler. *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (D) Wachstumsraten in cm/Tag der Kulturen von (A) und (B) mit Standardabweichung.

In Abbildung 3.2 ist zu erkennen, dass der langlebige Phänotyp von $\Delta PaClpP$ durch die Zugabe von Leucin nicht revertiert werden kann. Die Zugabe von Leucin hat sogar einen positiven Effekt und führt zu einer zusätzlichen Verlängerung der Lebensspanne von $\Delta PaClpP$, ohne die Wachstumsrate zu beeinflussen (Abb. 3.2 B,C,D). Auf die Lebensspanne und Wachstumsrate des *P. anserina* Wildtyp-Stammes übt die Zugabe von Leucin keinen signifikanten Einfluss aus (Abb. 3.2 A,C,D).

Der Effekt von Leucin auf die Menge von Acetyl-CoA konnte durch diese Versuche nicht untersucht werden. Doch da Leucin weder den autophagischen Fluss senken, noch die Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ revertieren kann und da nicht ausgeschlossen werden kann, dass Leucin noch anderweitig metabolisiert werden kann, ist diese Aminosäure für diesen Versuch nicht geeignet.

3.2.2 Zugabe von Butyrat zur Manipulation der Autophagie

Acetyl-CoA kann auch durch den Abbau von Fettsäuren entstehen, sodass durch Zugabe von Butyrat der Acetyl-CoA-Gehalt manipuliert werden sollte. Damit aus Butyrat Acetyl-CoA entstehen kann, muss Butyrat zu Butyryl-CoA umgesetzt werden und anschließend zu Enoyl-CoA, L-Hydroxyacyl-CoA und Acetoacetyl-CoA (Leschelle *et al.*, 2000). Durch die Zugabe von Butyrat sollte so die Autophagie durch Acetyl-CoA-Mangel gesenkt werden. Um diesen Effekt des Buttersäure-Esters auf die Autophagie zu untersuchen, wurden die Reporterstämme *PaSod1::Gfp* und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ nach der Alterung auf M2-Festmedium für zwei Tage in CM-Flüssigkulturen mit unterschiedlichen Butyrat-Konzentrationen (1, 5 und 10 mM Butyrat) angezogen. Es wurden 7 und 15 Tage alte Stämme untersucht, wobei die Alterung auf M2-Mediumplatten ohne Butyrat erfolgte. Anschließend wurden die Gesamtproteine extrahiert und analysiert. Abbildung 3.3 zeigt die Western-Blot-Analyse dieser Gesamtproteinextrakte.

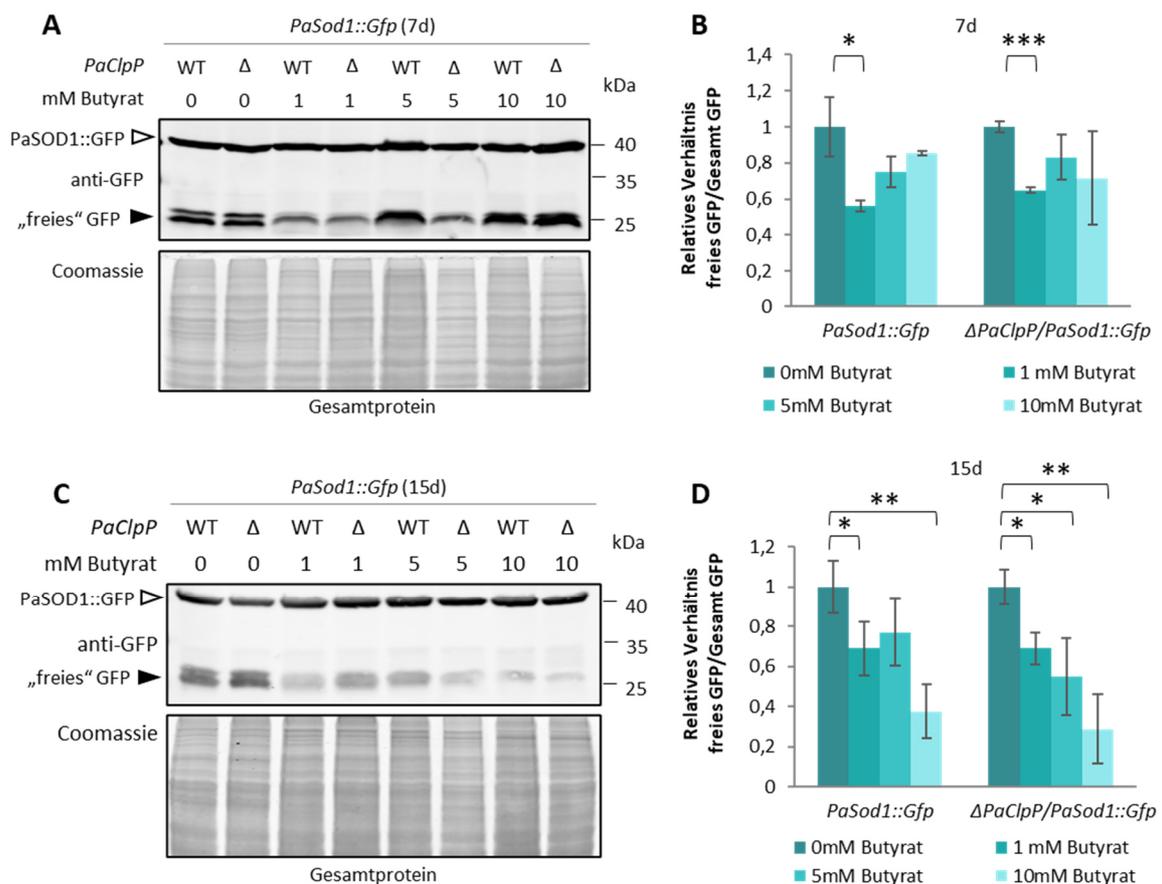


Abbildung 3.3: Effekt von Butyrat auf die Autophagie.

(A,C) Western-Blot-Analysen von 7 Tage (7d) (A) und 15 Tage (15d) alten (C) *PaSod1::Gfp*- und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Stämmen (je n=3) aus Flüssigkulturen mit 0, 1, 5 oder 10 mM Butyrat. Es wurden je 100 μ g Gesamtproteinextrakte auf 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Das GFP wurde mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel

diente hierbei als Ladekontrolle. Ausgewählte Größen des Größenstandards sind jeweils rechts angegeben. **(B)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (A). Gezeigt ist das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ (summierte Intensität des freien GFP und des Fusionsproteins PaSOD1::GFP) \pm Standardabweichung. Das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ der Proben ohne Butyrat wurde jeweils als 1 definiert. **(D)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (C). Dargestellt ist das Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ (summierte Intensität des freien GFP und des Fusionsproteins PaSOD1::GFP) \pm Standardabweichung. Das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt-GFP“ der Proben ohne Butyrat wurde jeweils als 1 definiert. Alle *p*-Werte wurden mit dem zweiseitigen „Student's *t*-test“ ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

In Abbildung 3.3 kann beobachtet werden, dass schon die Zugabe von geringen Mengen Butyrat (1 mM) einen starken, negativen Einfluss auf die Autophagie sowohl im Wildtyp, als auch auf die *PaClpP*-Deletionsmutante hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Zugabe von Butyrat möglicherweise den Acetyl-CoA-Gehalt anheben und die Autophagie-Induktion aufgrund von Acetyl-CoA-Mangel unterdrücken kann. In jungen 7 Tage alten Kulturen scheint der Effekt von 1 mM Butyrat auf beide Stämme (*PaSod1::Gfp* und $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$) am stärksten zu sein, während höhere Konzentrationen nur einen tendenziellen, aber nicht signifikanten negativen Effekt auf die Autophagie ausüben (Abb. 3.3 A,B). Bei älteren 15 Tage alten Kulturen ist der Effekt von 1 mM Butyrat noch immer signifikant im Vergleich zu den Kontrollen ohne Butyrat, doch je höher die Butyrat-Konzentration, desto stärker ist der Effekt (Abb. 3.3 C,D). 15 Tage alte Wildtyp-Kontrollen (*PaSod1::Gfp*) mit 10 mM Butyrat zeichnen sich durch eine 63 % verminderte Autophagie aus, im Vergleich zu den gleichen Stämmen ohne Butyrat. Hingegen führt die Zugabe von 1 mM Butyrat nur zu einer ca. 31 %-igen Verminderung (Abb. 3.3 C,D). Bei der 15 Tage alten *PaClpP*-Deletionsmutante ist der Effekt ein wenig stärker ausgeprägt als bei der Wildtyp-Kontrolle. $\Delta PaClpP$ zeigt bei 10 mM Butyrat eine 71 %-ige Verminderung der Autophagie im Vergleich zu der Kontrolle ohne Butyrat desselben Stammes (Abb. 3.3 C,D). Ebenso wie die Wildtyp-Kontrolle, weisen die gealterten Deletionsstämme bei 1 mM Butyrat eine Verminderung von ca. 31 % auf (Abb. 3.3 C,D). Daraus kann geschlossen werden, dass die Autophagie mit Hilfe von bereits geringen Butyrat-Konzentrationen erfolgreich gesenkt werden kann. Um die Auswirkungen von Butyrat auf die Lebensspanne der Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stämme zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt die verwendeten Stämme auf M2-Medium-Platten mit 0, 1, 5 oder 10 mM Butyrat angezogen und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Die Lebensspannen-Analysen werden in Abbildung 3.4 dargestellt.

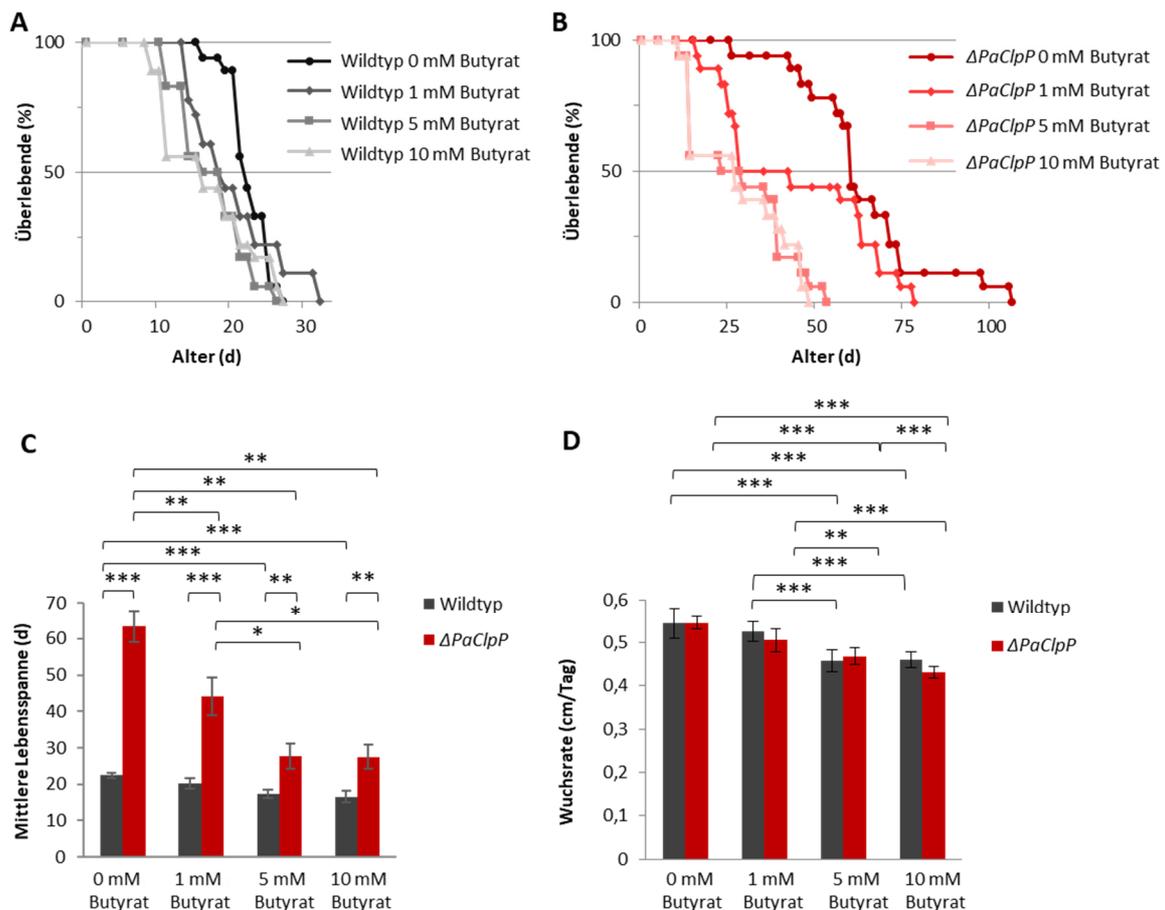


Abbildung 3.4: Effekt von Butyrat auf die Lebensspanne und Wachstumsrate des Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stammes. (A) Lebensspanne von *P. anserina* Wildtyp-Stämmen (je n=18) auf M2-Medium-Platten mit unterschiedlichen Butyrat Konzentrationen (0, 1, 5 oder 10 mM Butyrat) bei 27 °C und Dauerlicht. (B) Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ -Stämmen (je n=18) auf M2-Medium-Platten mit unterschiedlichen Butyrat Konzentrationen (0, 1, 5 oder 10 mM Butyrat) bei 27 °C und Dauerlicht. (C) Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) und (B) \pm Standardfehler. (D) Wachstumsraten in cm/Tag der Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stämme (je n=10) \pm Standardabweichung, nach der Anzucht auf verschiedenen Butyrat-Konzentrationen bei 27 °C und Dauerlicht. Alle *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (*: *p* < 0,05; **: *p* < 0,01; ***: *p* < 0,001).

In Abbildung 3.4 ist zu erkennen, dass bereits geringe Mengen Butyrat einen negativen Einfluss sowohl auf die Lebensspanne des Wildtyp-Stammes, als auch auf die Lebensspanne des *PaClpP*-Deletionsstammes ausübt (Abb. 3.4 A-C). Dabei ist der Effekt auf die Deletionsmutante stärker als der Effekt auf den Wildtyp. Eine Butyrat-Konzentration von 5 mM scheint die stärkste Wirkung auf die Lebensspanne von beiden Stämmen zu haben. Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 10 mM führt nicht zu einem weiteren Rückgang der Lebensspanne (Abb. 3.4 A-C). Durch die Zugabe von 5 mM Butyrat ist eine Verringerung der mittleren Lebensspanne des *PaClpP*-Deletionsstammes von ca. 55 % zu beobachten (von 63 auf 28 Tage; Abb. 3.4 C). Die mittlere Lebensspanne des Wildtyps wird hingegen nur um ca. 23 % reduziert (von 22 auf 17 Tage; Abb. 3.4 C). Die Zugabe von Butyrat führt darüber hinaus zu einer leichten Verschlechterung der Wachstumsrate sowohl beim Wildtyp, als auch bei $\Delta PaClpP$ (Abb. 3.4 D). Das zeigt, dass Butyrat einen allgemeinen negativen Einfluss auf das Wachstum von *P. anserina* ausübt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Butyrat im Gegensatz zu Leucin deutlich die Autophagie reduzieren kann und dass diese Reduzierung mit einer Verkürzung der Lebensspanne einhergeht. Hierbei ist der Effekt von Butyrat auf die Deletionsmutante sehr viel stärker ausgeprägt als auf den Wildtyp. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die für die Langlebigkeit benötigte Autophagie-Induktion mit Butyrat beeinflusst werden kann und dass dadurch eventuell Acetyl-CoA wichtig für die Autophagie in der *PaClpP*-Deletionsmutante ist.

3.3 Metabolom-Analyse des *PaClpP*-Deletionsstammes im Vergleich zum *P. anserina* Wildtyp-Stamm

Bisher konnte nicht geklärt werden, wie die Menge an Acetyl-CoA durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst ist. Auch die Rolle von PaCLXP, bzw. PaCLPP im Energiemetabolismus ist weiterhin nicht bekannt. Um hier die Änderungen im Metabolismus durch das Fehlen von PaCLPP zu untersuchen wurde eine Metabolom-Analyse durchgeführt, bei der die Metabolite von $\Delta PaClpP$ mit denen des Wildtyps verglichen wurden.

Frühere Substrat-Analysen von Fischer *et al.* (2015) und von dieser vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 3.1) zeigten, dass viele Substrate und Interaktionspartner von an verschiedenen Signalwegen der Energiehomöostase beteiligt sind, wie zum Beispiel der Glykolyse, der Elektronentransportkette und des Citratzyklus. Wie diese Proteine durch PaCLXP beeinflusst sind, ist bislang ungeklärt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Substrate in ihrer Menge reguliert sein könnten, was bedeuten würde, dass diese Proteine, bzw. Enzyme durch das Fehlen von PaCLPP angereichert vorliegen würden und dadurch möglicherweise aktiver sind als im Wildtyp. Ein anderer Weg wäre, dass sie in ihrer Qualität reguliert werden, zum Beispiel durch den Abbau geschädigter und defekter Kompartimente der Proteine und deren Ersatz durch neu synthetisierte Komponenten. Dadurch würden durch das Fehlen von PaCLPP möglicherweise viele Enzyme geschädigt vorliegen und wären damit eventuell in ihrer Aktivität eingeschränkt.

Um einen besseren Einblick in die Rolle der PaCLXP für den Energiemetabolismus zu erhalten, wurde eine Metabolom-Analyse bei der Firma *Metabolomic Discoveries* durchgeführt. Hierfür wurden vier biologische Replikate des Wildtyp- und des *PaClpP*-Deletionstammes auf M2-Platten angezogen, das Myzel nach 5, 12 und 20 Tagen geerntet und in je 50 mg Portionen aufgeteilt. *Metabolomic Discoveries* konnte anschließend durch Massenspektroskopie insgesamt 51 Metabolite identifizieren. Um herauszufinden, warum die *PaClpP*-Deletionsmutante langlebig ist und um die größten Unterschiede im Energiemetabolismus zu untersuchen, sind die Unterschiede in den 5 und 20 Tage alten Proben entscheidend. Es wurden bei dieser Analyse immer chronologisch gleichalte Mutanten-

und Wildtyp-Stämme verglichen. Dabei wurden einmal 20 Tage alte Deletionsmutanten mit 20 Tage alten Wildtyp-Stämmen und einmal 5 Tage alte $\Delta PaClpP$ - mit 5 Tage alten Wildtyp-Stämmen verglichen. Außerdem wurden 20 Tage alte Wildtypstämme mit 5 Tage alten Wildtypstämmen und 20 Tage alte Deletionsstämme mit 5 Tage alten Deletionsstämmen verglichen um die Veränderungen der Metabolite im Altern der unterschiedlichen Stämme zu visualisieren.

Beim chronologischen Alter eines Organismus wird das Alter im Rahmen einer reinen Zeitangabe betrachtet, zum Beispiel in Tagen (Hamczyk *et al.*, 2020). Bei dem biologischen Alter eines Organismus wird das Alter anhand des Entwicklungs-, bzw. des Verfallzustands gemessen. Bei der Messung des biologischen Alters werden mehrere verschiedene Faktoren berücksichtigt, López-Otín *et al.* (2013) nennt beispielsweise die genomische Instabilität, die Länge der Telomere, der Verlust, bzw. Störung der Proteostase, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz, die Erschöpfung der Stammzellen, eine veränderte Kommunikation unter den Zellen und eine deregulierte Nährstoffmessung. Nicht alle Faktoren lassen sich auf alle Organismen übertragen, doch können die meisten Kennzeichen wie die genomische Instabilität, die Länge der Telomere, der Verlust, bzw. Störung der Proteostase, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz und eine deregulierte Nährstoffmessung sowohl bei Einzellern als auch bei höheren Eukaryoten beobachtet werden.

$\Delta PaClpP$ weist unter Standardbedingungen (auf M2-Festmedium bei 27 °C und unter Dauerlicht) im Vergleich zum Wildtyp eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne von über 200 % auf (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.4). Dies bedeutet, dass die 20 Tagen alten Wildtyp-Stämme biologisch gesehen schon sehr viel älter sind, als die $PaClpP$ -Deletionsstämme. Um ein besseres Verständnis der unterschiedlichen Alterung der beiden Stämme zu erlangen, ist es unumgänglich auch die Unterschiede in jungen (z. B. 5 Tage alten) Kulturen zu untersuchen. Dadurch können bereits in einem frühen Entwicklungsstadium, in dem beide Stämme juvenil sind, Diskrepanzen in den Signalwegen wahrgenommen werden und diese mit den Unterschieden von 20 Tage alten Stämmen verglichen werden. Abbildung 3.5 zeigt zur besseren Visualisierung der Unterschiede in den Metaboliten eine sogenannte farbcodierte „Heatmap“ der Analyse von 5 und 20 Tage alten Proben. Eine „Heatmap“ mit allen Altersstadien (5, 12 und 20 Tagen) befindet sich im Anhang (siehe Anhang, Abb. 8.1).

Bei der Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 3.5 werden Anreicherungen in rot und Verringerungen in blau gekennzeichnet. Verglichen wurden jeweils 5 Tage alte $\Delta PaClpP$ - mit 5 Tage alten Wildtyp-Stämmen, 20 Tage alte $\Delta PaClpP$ - mit 20 Tage alten Wildtyp-Stämmen, 20 Tage alte Wildtyp-Stämme mit 5 Tage alten Wildtyp-Stämmen, sowie 20 Tage alte $\Delta PaClpP$ - mit 5 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Stämmen.

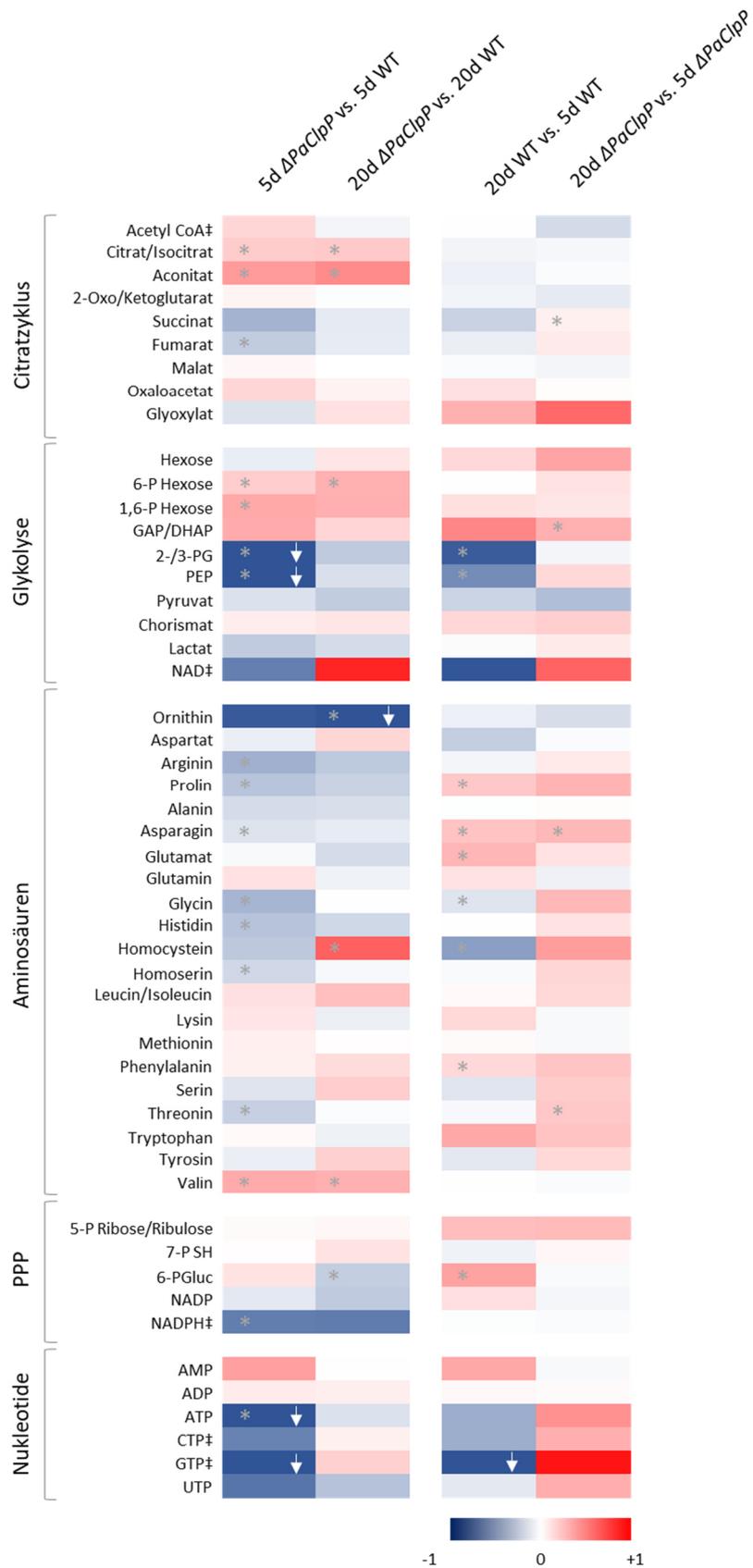


Abbildung 3.5: Grafische Darstellung der in $\Delta PaClpP$ identifizierten Metabolite im Vergleich zu den Metaboliten im Wildtyp.

Farbcodierte „Heatmap“ mit „ x -fach $\log(2)$ “ von 5d $\Delta PaClpP$ vs. 5d Wildtyp (WT)-Stämmen, 20d $\Delta PaClpP$ vs. 20d WT, 20d WT vs. 5d WT und 20d $\Delta PaClpP$ vs. 5d $\Delta PaClpP$. Es wurden jeweils 4 biologische Replikate verwendet. Felder, welche den Wert „1“ oder „-1“ über- bzw. unterschreiten wurden zur besseren Visualisierung mit einem

weißen Pfeil gekennzeichnet. Metabolite, welche bei der massenspektrometischen Messung an der Nachweisgrenze lagen, wurden mit „#“ markiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem grauen Stern im Feld hervorgehoben.

Abkürzungen: Citrat/Isocitrat: Citrat oder Isocitrat; 2-Oxo/Ketoglutarat: 2-Oxoglutarat oder 2-Ketoglutarat; 6-P Hexose: Hexose-6-Phosphat; 1/6-P Hexose: Hexose-1,6-Bisphosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; 2-/3-PG: 2- oder 3-Phosphoglycerat; PEP: Phosphoenolpyruvat; 5-P Ribose/Ribulose: Ribose 5-Phosphat oder Ribulose; 7-P SH: Sedoheptulose 7-Phosphat; 6-PGluc: 6-Phosphogluconat; PPP: Pentosephosphatweg.

p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt. (*: $p < 0,05$ - $p < 0,001$). Modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

In Abbildung 3.5 zeigt sich durch die unterschiedlichen Mengen der Metabolite, dass das Fehlen der PaCLXP-Kernuntereinheit einen starken Einfluss auf die Komponenten des Citratzyklus, der Glykolyse und auf die Menge der Nukleotide ausübt. Auch die Menge an Aminosäuren ist durch den Verlust von PaCLPP beeinflusst. Werden beide Stämme eines Altersstadiums miteinander verglichen (Abb. 3.5, links), ist es auffällig, dass die Mehrheit der stärkeren, signifikanten Unterschiede in 5 Tage alten Stämmen zu detektieren sind. In 20 Tage alten Stämmen sind die meisten Unterschiede nicht mehr so stark ausgeprägt und nicht signifikant. Wenn gleiche Stämme unterschiedlichen Alters verglichen werden (Abb. 3.5, rechts), wird deutlich, dass viele Metabolite in 20 Tage alten Wildtyp-Stämmen reduziert vorliegen, während in 20 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Stämmen die meisten Metabolite angereichert sind.

Bei dem Vergleich von 5 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Stämmen mit 5 Tage alten Wildtyp-Stämmen, scheint der Pentosephosphatweg (PPP) durch das Fehlen der PaCLPP am wenigsten beeinflusst zu sein (Abb. 3.5, links). Werden die Unterschiede in den Mengen der Aminosäuren betrachtet, fällt auf, dass die meisten der signifikant veränderten Aminosäuren in jungen $\Delta PaClpP$ -Kulturen verringert sind verglichen mit dem Wildtyp desselben Alters. Interessanterweise zählt Leucin zu den Aminosäuren, die in der Deletionsmutante angereichert vorliegen. Möglicherweise war es in den zuvor vorgestellten Fütterungsversuchen mit Leucin aus diesem Grund nicht möglich, die Autophagie in der $PaClpP$ -Deletionsmutante durch die Zugabe von Leucin zum Medium zu beeinflussen.

Wenn die Metabolite des Citratzyklus betrachtet werden, ist deutlich eine Änderung innerhalb dieses Stoffwechselweges zu erkennen. Die ersten beiden Metabolite nach Acetyl-CoA (Citrat oder Isocitrat und Aconitat), sind signifikant angereichert in der Deletionsmutante. 2-Ketoglutarat ist anschließend unverändert und die nachfolgenden zwei Metabolite (Succinat und Fumarat) liegen reduziert vor. Dies ist ein Hinweis darauf, dass durch das Fehlen der PaCLXP-Kernuntereinheit die Aconitase beeinflusst sein könnte. Die Aconitase katalysiert die Umsetzung von Citrat zu Aconitat und Aconitat zu Isocitrat. Ob dieses Enzym nun in der Qualität, oder in der Quantität reguliert ist, bleibt weiterhin unklar.

Auch bei den Metaboliten der Glykolyse ist eine solche Veränderung zu beobachten, wenn 5 Tage alte $\Delta PaClpP$ - und 5 Tage alte Wildtyp-Stämme miteinander verglichen werden. Die ersten drei

detektierten Metabolite der Glykolyse (Hexose-6-Phosphat, Hexose-1,6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) oder Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)) sind in der Deletionsmutante angereichert, während die drei nachfolgenden Metabolite (2- oder 3-Phosphoglycerat (2-/3-PG), Phosphoenolpyruvat (PEP) und Pyruvat) reduziert sind. Dieser Effekt deutet entweder auf eine Beeinflussung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase oder der Phosphoglyceratkinase hin.

Auffällig ist auch der Effekt, der das Fehlen von PaCLPP auf die Menge der Nukleotide ausübt. Hierbei kann beobachtet werden, dass es signifikant weniger ATP, aber dafür tendenziell mehr AMP in 5 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Kulturen gibt (Abb. 3.5, links unten). Dieses verschobene AMP/ATP-Verhältnis könnte auf eine gesteigerte Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) hinweisen. In verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass unter Energie-Stress, also beim Abfall des ATP-Gehaltes und gleichzeitigem Anstieg der AMP-Menge, die AMPK spezifische Enzyme phosphoryliert, um die ATP-Generierung zu erhöhen und den ATP-Verbrauch zu senken. Unter anderem ist die AMPK auch dafür bekannt, einer der Hauptregulatoren der Autophagie zu sein. Da Autophagie maßgeblich für die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ verantwortlich ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017), könnte die gesteigerte Autophagie auf eine gesteigerte AMPK-Aktivität zurückzuführen sein.

Insgesamt kann also gesagt werden, dass die PaCLPP-Protease tatsächlich eine bedeutende Rolle im Energiemetabolismus einnimmt. Sowohl die Glykolyse, also auch der Citratzyklus, die Menge der Aminosäuren und der unterschiedlichen Nukleotide sind durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst. Hierbei ist der Effekt in jungen Stämmen deutlich stärker ausgeprägt, als in älteren Stämmen. Möglicherweise passt sich die *PaClpP*-Deletionsmutante im Laufe der Alterung an, sodass die Unterschiede zu älteren Wildtyp-Stämmen nicht mehr so deutlich auftreten, wie bei jungen Stämmen. Die Metabolom-Analyse legt nahe, dass die AMPK eine wichtige Rolle für den Phänotyp der *PaClpP*-Deletionsmutante spielen könnte. Daher wird in den folgenden Untersuchungen dieser Aspekt genauer analysiert.

3.4 Die Rolle der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) in der *PaClpP*-Deletionsmutante

In vorherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Autophagie eine wichtige Rolle für die Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante spielt (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit Butyrat legen nahe, dass Autophagie für die Langlebigkeit wichtig ist. Ein verschobenes AMP/ATP-Verhältnis zu Gunsten von AMP, lässt vermuten, dass die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) bei der Autophagie-Induktion involviert sein könnte (Abb. 3.5). Dies bedeutet, dass in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp die Aktivität der AMPK verändert sein könnte.

Zudem deutet diese veränderte Aktivität auf eine Interaktion zwischen PaCLPXP und der AMPK hin. Die AMPK ist der Hauptenergiesensor der Zelle und besteht aus insgesamt drei Untereinheiten. Sie setzt sich aus einer katalytischen α -Untereinheit (SNF1) und den regulatorischen β - und γ -Untereinheiten zusammen (Hardie *et al.*, 2012) (siehe Abschnitt 1.2.1). Um das Zusammenspiel der AMPK und der PaCLPXP zu untersuchen, wurde zunächst eine Deletionsmutante erstellt werden, bei der das Gen (*PaSnf1*) codierend für die katalytische α -Untereinheit der AMPK deletiert ist. Anschließend wurde dieser $\Delta PaSnf1$ -Stamm mit dem $\Delta PaClpP$ -Stamm gekreuzt, um eine Doppelmutante zu erhalten. Wenn die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ von der AMPK abhängig ist, sollte der Phänotyp von $\Delta PaClpP$ durch die zusätzliche Deletion von *PaSnf1* revertiert werden.

3.4.1 Erstellung einer *PaSnf1*-Deletionsmutante

Zur Erstellung einer *PaSnf1*-Deletionsmutante wurde ein etabliertes Zweistufenverfahren verwendet (Hamann *et al.*, 2005). In diesem Verfahren werden Deletionscosmide verwendet, welche mindestens 3 kb große Flanken besitzen, die das betreffende Gen umgeben. Derartig große homologe Bereiche sind aufgrund der ineffizienten homologen Rekombination in *P. anserina* nötig. Je größer die flankierenden Sequenzen, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination und eines erfolgreichen Austauschs des zu deletierenden Gens mit einem Markergen (z. B. einer Resistenzkassette).

Eine Sammlung von genomischen DNA-Sequenzfragmenten von *P. anserina*, eingebracht in verschiedene Cosmide, wird als Cosmidbank bezeichnet (Osiewacz, 1994). Die Benennung der Cosmide erfolgte nach der Position in der 96-well-Mikrotiterplatte, in der die *E. coli*-Kulturen mit den jeweiligen Cosmiden aufbewahrt werden. Auf diese Weise existieren Cosmide, welche als Gesamtheit das komplette Genom von *P. anserina* enthalten. Zur Erstellung von Deletionscosmiden musste zunächst ein Cosmid identifiziert werden, welches die wildtypartige Sequenz des zu deletierenden Gens enthält, inklusive ca. 3 kb der im Genom vorliegenden 5'- und 3'-Flanken. Die Identifizierung geeigneter Cosmide erfolgte zunächst über eine Kolonie-PCR und anschließend über Southern-Blot-Analysen.

Zur Herstellung eines Deletionscosmids, wurde ein Vektor (Cosmid 2D1) aus der Cosmidbank (Osiewacz, 1994) ausgewählt, der die Wildtyp-Version von *PaSnf1* enthält, inklusive der im Genom vorliegenden umgebenen Sequenzen (Flanken). Mithilfe des Cosmids 2D1 als Matrize für die umgebenen *PaSnf1*-Flanken, wurde ein Deletionsplasmid erstellt, welches eine Phleomycin-Resistenzkassette anstelle des *PaSnf1*-Gens besitzt (pSnf1KO2, Plasmidkarte im Anhang, Abb. 8.2 A). Anschließend wurde ausgehend von diesem Deletionsplasmid, über homologe Rekombination in *E. coli* die *PaSnf1*-Sequenz des Cosmides 2D1 mit einer Phleomycin-Resistenzkassette (*ble^R*) ausgetauscht. Abbildung 3.6 zeigt diesen Vorgang in *E. coli* schematisch. Das daraus hervorgehende Deletionscosmid $\Delta PaSnf1_2D1$ wurde für die Transformation in den *P. anserina* Wildtyp-Stamm verwendet.

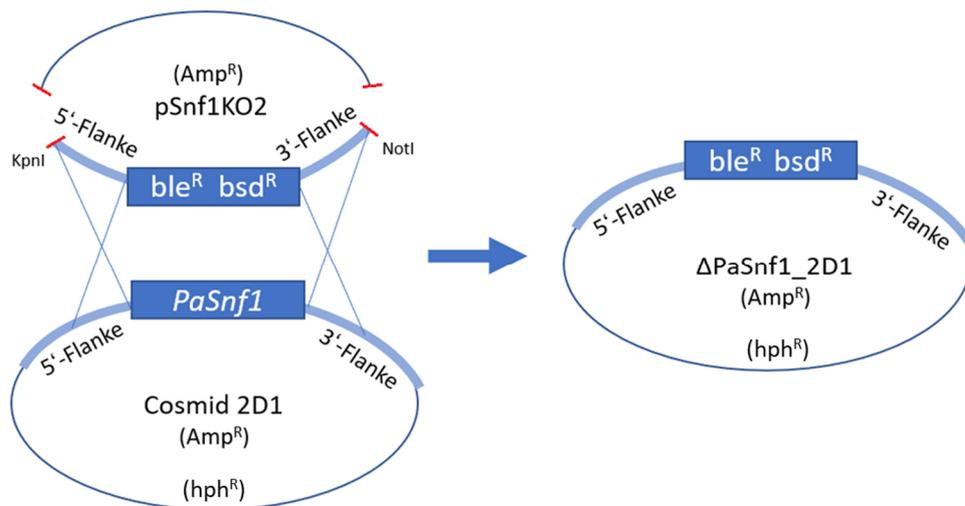


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Deletionscosmid-Herstellung.

Das Cosmid 2D1 wird in den *E. coli*-Stamm KS272 transformiert, welcher eine induzierbare homologe Rekombinationsmaschinerie besitzt. Die Phleomycin-Resistenzkassette (ble^R) mit den dazugehörigen ca. 250 bp großen *PaSnf1*-Flanken wird mit KpnI und NotI herausgeschnitten und in denselben Stamm transformiert. Durch homologe Rekombination wird nun das *PaSnf1*-Gen gegen die Resistenzkassette ausgetauscht. Das daraus resultierende Deletionscosmid $\Delta PaSnf1_2D1$ mit den sehr viel größeren Flanken von mind. ca. 3 kb kann anschließend aus *E. coli* isoliert und in *P. anserina* transformiert werden. Zur späteren Selektion einer erfolgreichen homologen Rekombination in *P. anserina* enthält das Deletionscosmid zusätzlich eine *Hygromycin*-Resistenzkassette (hph^R) im Rückgrat.

Während der Transformation des Deletionscosmids wird durch die großen homologen Sequenzen der 5'- und 3'-Flanken durch homologe Rekombination das *PaSnf1* im Genom durch die Phleomycin-Resistenzkassette ersetzt. Durch die Selektion auf Phleomycin-haltigem Medium können nur Stämme wachsen, die die Resistenzkassette erfolgreich aufgenommen haben. Die homologe Rekombination in *P. anserina* wird durch die großen Flanken zwar begünstigt, dennoch kann das Cosmid auch ektopisch integriert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die Transformanten auch auf ihre Hygromycin-Resistenz überprüft. Bei einem erfolgreichem Austausch der *PaSnf1*-Sequenz mit der Phleomycin-Resistenzkassette, sollte die Hygromycin-Resistenzkassette des Cosmid-Rückgrats nicht mit in das Genom integriert werden, sodass die Stämme nur Phleomycin-, aber nicht Hygromycin-resistent sind. Die Transformationseffizienz dieser Transformation betrug 9,04 Transformanten pro μg eingesetzter DNA. Von insgesamt 58 getesteten Transformanten waren nur vier Stämme Phleomycin-resistent und Hygromycin-sensitiv. Durch eine Southern-Blot-Analyse dieser vier Stämme, konnte nur die Transformante T1-5 positiv als *PaSnf1*-Deletionsmutante identifiziert werden, während die anderen drei Transformanten weiterhin die *PaSnf1*-Sequenz aufwiesen (Abb. 3.7 A).

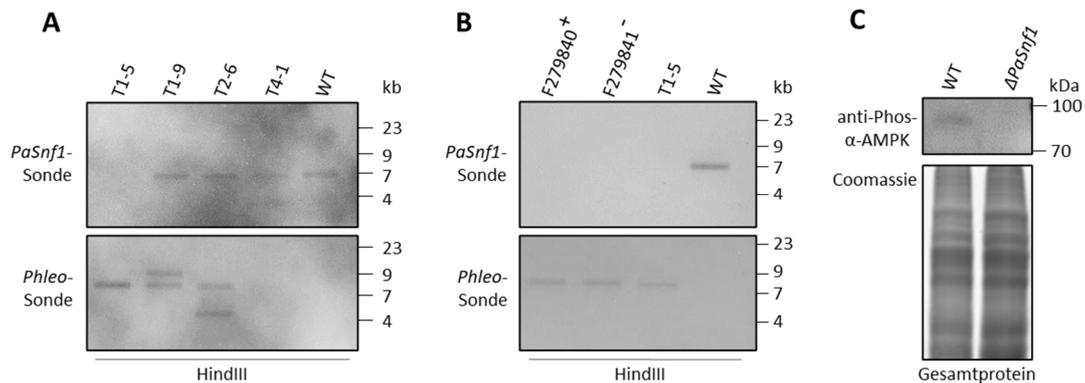


Abbildung 3.7: Untersuchung ausgewählter potentiellen *PaSnf1*-Deletionsstämme.

(A,B) Southern-Blot-Analysen möglicher *PaSnf1*-Deletionsmutanten und des Wildtyp-Stammes (WT) als Negativ-Kontrolle. Es wurden entweder 500 ng (A) oder 1 µg (B) genomische DNA (gDNA) mit HindIII behandelt und auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der fraktionierten gDNA auf eine Nylon-Membran konnten durch spezifische DIG-markierte Hybridisierungssonden die entsprechenden Gene nachgewiesen werden. *PaSnf1*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion des *PaSnf1*-Gens; *Phleo*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion der Phleomycin-Resistenzkassette. (A) Die Transformante T1-5 zeigt als einziger Stamm kein Signal nach der Hybridisierung mit einer *PaSnf1*-spezifischen Sonde. (B) Die monokaryotischen Isolate F279840⁺ und F279841⁻ stammen aus einer Kreuzung von T1-5 mit dem Wildtyp-Stamm, die gDNA der Primärtransformante T1-5 wurde zur Kontrolle mit aufgetragen. (C) Western-Blot-Analyse mit 150 µg Gesamtproteinextrakten eines $\Delta PaSnf1$ - und eines Wildtyp-Stammes (WT). Die Gesamtproteinextrakte wurden auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Zum Nachweis von PaSNF1 wurde ein Antikörper (anti-Phos- α -AMPK) verwendet, welcher sich gegen den phosphorylierten T172-Rest der α -Untereinheit aus der Maus richtet. Western-Blot-Analyse ist modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

Durch Kreuzung der Primärtransformante T1-5 mit dem Wildtyp konnten anschließend Sekundärtransformanten isoliert werden, welche ebenfalls über eine Southern-Blot-Analyse verifiziert wurden (Abb. 3.7 B). Die monokaryotischen Isolate F279840⁺ und F279841⁻ konnten erfolgreich als $\Delta PaSnf1$ -Stämme identifiziert werden und dienen für weitere Experimente als Ausgangsstämme. Zusätzlich wurde in einer Western-Blot-Analyse gezeigt, dass phosphorylierte PaSNF1 fehlt (Abb. 3.7 C). Bei dieser Analyse wurde ein Antikörper verwendet, der sich gegen den phosphorylierten T172-Rest der AMPK- α -Untereinheit in der Maus richtet, da es keinen funktionierenden Antikörper gegen PaSNF1 gibt. Die Phosphorylierungsstelle am T172-Rest der α -Untereinheit in der Maus ist hoch konserviert, daher ist dieser Antikörper auch geeignet, phosphorylierte PaSNF1 nachzuweisen. Durch dieses Experiment konnte erfolgreich gezeigt werden, dass keine aktive AMPK in der Deletionsmutante vorliegt.

3.4.2 Charakterisierung der *PaSnf1*-Deletionsmutante

Nachdem die Deletion von *PaSnf1* verifiziert wurde, wurde ein Komplementations-Stamm erstellt, welcher eine PaSNF1-Variante beinhaltet, die am N-Terminus mit einem HIS-FLAG-Epitop markiert wurde. Dieser Stamm sollte bestätigen, dass der Phänotyp der *PaSnf1*-Deletionsmutante tatsächlich durch das Fehlen von PaSNF1 verursacht wird und nicht durch weitere, zufällige Änderungen im Genom. Zur Erstellung dieses Stammes wurde ein Plasmid mit einem *Flag::PaSnf1*-Konstrukt erstellt,

welches von den nativen Promotor- und Terminatorregionen umgeben ist (pFlag-Snf1; Plasmidkarte im Anhang, Abb. 8.2 B). Dieses Plasmid wurde in zwei Schritten erstellt. Zunächst wurde das Plasmid pHisFlag mit der Promotor-Sequenz von *PaSnf1* kloniert. Anschließend wurde in dieses Zwischenkonstrukt die vollständige *PaSnf1*-Sequenz inklusive der Terminatorregion einkloniert. Durch diese Strategie befindet sich das *His::Flag*-Epitop zwischen der Promotorregion und der *PaSnf1*-Kodierungssequenz. Im Rahmen der Bachelorarbeit von E. Krotova (Krotova, 2020) wurde dieses Plasmid in $\Delta PaSnf1$ transformiert und die erhaltenen Transformanten charakterisiert. Diese Daten wurden nun durch Wildtyp- und $\Delta PaSnf1$ -Analysen dieser Doktorarbeit vervollständigt. Abbildung 3.8 stellt einige der ersten phänotypischen Analysen dar.

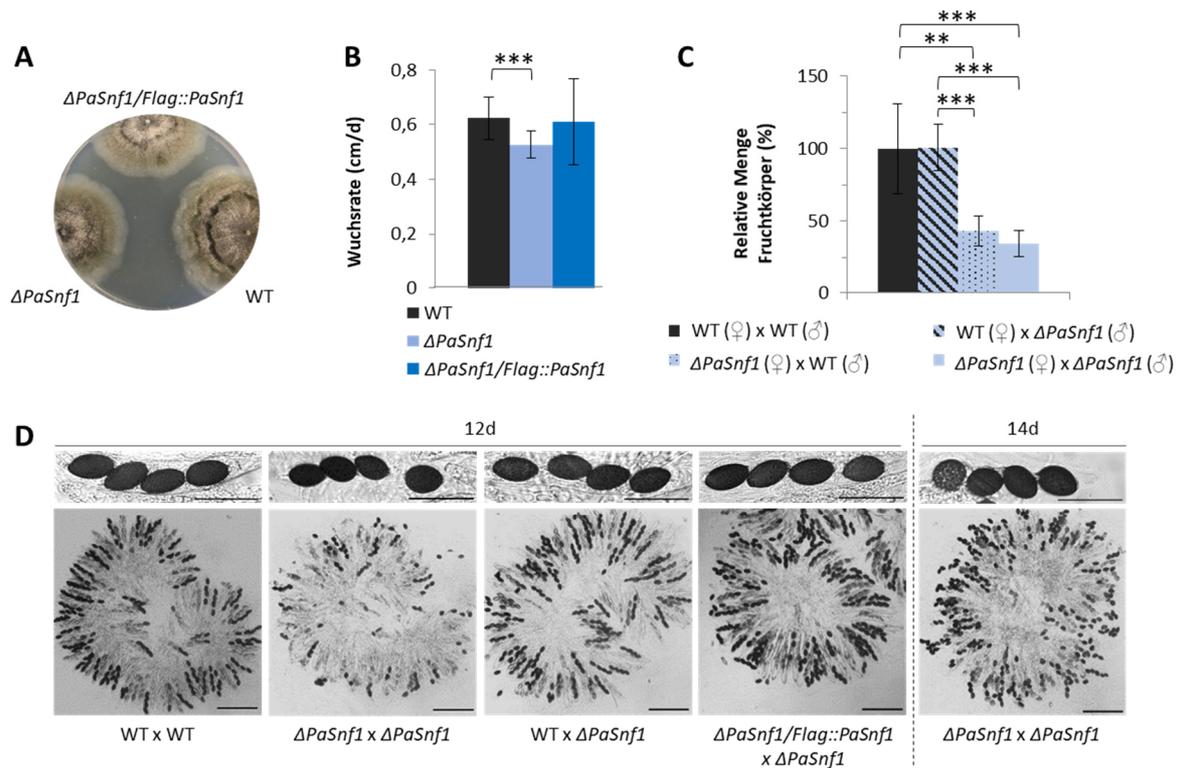


Abbildung 3.8: Phänotypisierung der *PaSnf1*-Deletionsmutante.

(A) Phänotypische Analyse von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ und dem Wildtyp (WT). Monokaryotische Isolate der einzelnen Stämme wurden, nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Medium mit Ammonium-Acetat im Dunklen, auf M2-Medium Platten angesetzt und für weitere 7 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. **(B)** Wachsraten der Stämme von (A). Die Stämme wurden in Rennrohren mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht angezogen, anschließend wurde nach 9 – 10 Tagen das Wachstum pro Tag ermittelt (cm/d). Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung: Wildtyp (0,62 cm/d \pm 0,08; n=32); $\Delta PaSnf1$ (0,53 cm/d \pm 0,05; n=28); $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ (0,61 cm/d \pm 0,16; n=25). (Die Daten der Komplementation stammen aus Krotova, 2020). **(C)** Relative Menge an Fruchtkörpern von Spermatisierungen des Wildtyp-Stammes (WT; n=6) und des $\Delta PaSnf1$ -Stammes (n=6) mit unterschiedlichen männlichen oder weiblichen Partnern. Angegeben ist der Prozentsatz \pm Standardabweichung. Die Wildtyp x Wildtyp-Spermatisierung wurde auf 100 % gesetzt. **(D)** Lichtmikroskopische Analyse von Fruchtkörper-Inhalten und Ascosporen 12-Tage alter (12d) Konfrontations-Kreuzungen monokaryotischer Isolate mit unterschiedlichen Paarungstypen. Es wurden insgesamt zwei Wildtyp (WT)-Stämme, zwei $\Delta PaSnf1$ -Stämme, ein WT-Stamm mit einem $\Delta PaSnf1$ -Stamm und ein $\Delta PaSnf1$ -Stamm mit einem $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ -Stamm auf M2-Medium-Platten gekreuzt. (D, rechts) Fruchtkörperinhalt und Ascosporen einer Kreuzung mit zwei $\Delta PaSnf1$ -Stämmen nach zusätzlicher Inkubation von zwei Tagen (Insgesamt 14d). Maßstäbe der Fruchtkörperinhalte entsprechen je 250 μ m. Maßstäbe der Ascosporen entsprechen je 100 μ m. Alle *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (***: *p* < 0,001; **: *p* < 0,01).

Zunächst konnte beobachtet werden, dass $\Delta PaSnf1$ verglichen mit dem Wildtyp eine signifikant verringerte Wachstumsrate aufweist, ohne Unterschiede in der Pigmentierung des Myzels zu zeigen (Abb. 3.8 A,B). Zudem ist bei Konfrontations-Kreuzungen mit monokaryotischen Kulturen aufgefallen, dass die $PaSnf1$ -Deletionsmutante eine geringere Anzahl an Fruchtkörpern bildet als eine Wildtyp-Kreuzung.

P. anserina vermehrt sich über sexuelle Fortpflanzung und besitzt männliche Gameten (die Spermastien) und weibliche Gametangien (die Protoperithezien). Zusätzlich besitzen einige Pilze, unter anderem auch *P. anserina*, unterschiedliche Paarungstypen, sodass nur die Spermastien eines bestimmten Paarungstyps mit den Protoperithezien des gegenteiligen Paarungstyps interagieren können (Raju und Perkins, 1994). In *P. anserina* sind die unterschiedlichen Paarungstypen als *mat+* und *mat-* bekannt (Debuchy und Coppin, 1992). In der Natur entwickelt sich das Myzel meistens aus Ascosporen, welche zwei haploide Kerne, mit je einem der Paarungstypen, besitzen (Raju und Perkins, 1994). Diese heterokaryotischen Kulturen sind demnach in der Lage selbstständig Fruchtkörper zu bilden (Raju und Perkins, 1994). Bei molekularbiologischen Arbeiten ist dies allerdings oft unerwünscht, weswegen für die meisten Experimente kleinere, monokaryotische Sporen aus irregulären Ascis isoliert werden, die jeweils nur ein „*mat*“-Allel besitzen und deren Myzel deshalb keine Fruchtkörper bilden kann.

Bei Spermatisierungs-Experimenten konnte beobachtet werden, dass eine verminderte Anzahl an Fruchtkörper gebildet werden, wenn die Protoperithezien der $PaSnf1$ -Deletionsmutante mit isolierten Spermastien des Wildtyp befruchtet werden (Verminderung um 57 %; Abb. 3.8 C). Wenn $\Delta PaSnf1$ -Spermastien auf $\Delta PaSnf1$ -Protoperithezien aufgebracht werden, kann eine Reduzierung der Fruchtkörperbildung um 66 % beobachtet werden. Bei einer Spermatisierung von Protoperithezien des Wildtyps mit Spermastien von $\Delta PaSnf1$, kann kein Unterschied zu einer Spermatisierung von Wildtyp-Protoperithezien mit Wildtyp-Spermastien ermittelt werden (Abb. 3.8 C). Dies beweist, dass $\Delta PaSnf1$ eine eingeschränkte weibliche Fertilität besitzt, allerdings nicht vollständig steril ist, da auch bei einer Spermatisierung von $\Delta PaSnf1$ -Protoperithezien mit $\Delta PaSnf1$ -Spermastien noch eine geringe Anzahl an Fruchtkörpern entstehen kann (Abb. 3.8 C). Lichtmikroskopische Analysen der Fruchtkörper-Inhalte konnten zudem zeigen, dass das Fehlen von PaSNF1 zu einer verzögerten Sporenentwicklung führt (Abb. 3.8 D). Erst nach 14 Tagen zeigen sich ungefähr genauso viele reife Sporen in den Fruchtkörpern wie bei einer Kreuzung mit zwei Wildtyp-Stämmen (Abb. 3.8 D, rechts). Diese Verzögerung tritt nicht mehr auf, wenn $\Delta PaSnf1$ mit einem Wildtyp gekreuzt wird, dann werden bereits nach 12 Tagen reife Sporen gebildet (Abb. 3.8 D, links). Außerdem kann beobachtet werden, dass die Sporen einer $\Delta PaSnf1$ -Kreuzung runder sind als die einer Wildtyp-Kreuzung, bei der die Sporen eine elliptische Form aufweisen. Auch dieser Phänotyp wird durch die Kreuzung eines Wildtyp-Stammes mit $\Delta PaSnf1$ aufgehoben. E. Krotova analysierte und beschrieb dieses Phänomen im Rahmen ihrer Bachelorarbeit genauer.

Anschließend wurde die Lebensspanne der $PaSnf1$ -Deletionsmutante analysiert. Hierbei konnte interessanterweise beobachtet werden, dass das Fehlen von PaSNF1 einen positiven Effekt auf

die Lebensspanne ausübt (Abb. 3.9 A). Die mittlere Lebensspanne von $\Delta PaSnf1$ ist um 22 % verlängert, verglichen mit dem Wildtyp (von 22,6 Tage vom Wildtyp auf 27,6 Tage von $\Delta PaSnf1$; Abb. 3.9 B). Wie bereits von E. Krotova gezeigt werden konnte, kann diese Lebensspannenverlängerung durch die Präsenz einer FLAG-markierten PaSNF1-Variante revertiert werden (Abb. 3.9 A,B; Daten von $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ wurden von Krotova, 2020 im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert).

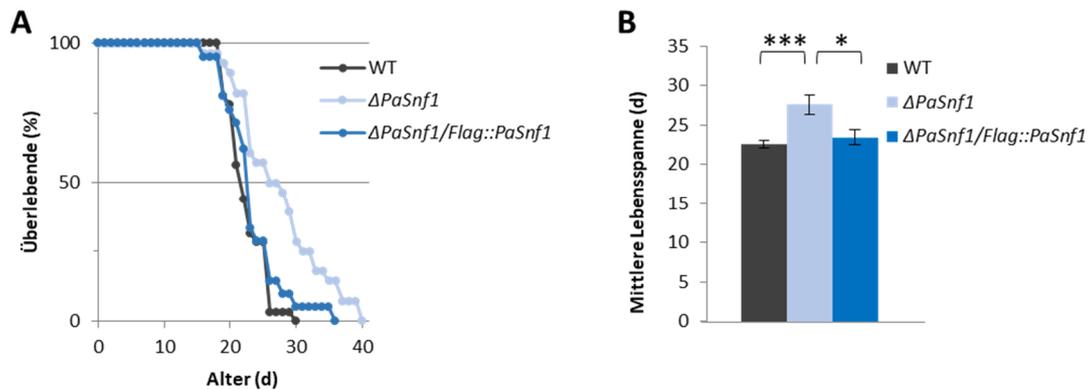


Abbildung 3.9: Lebensspannen-Analyse der *PaSnf1*-Deletionsmutante.

(A) Lebensspannen-Analyse von monokaryotischen Wildtyp- (n=32), $\Delta PaSnf1$ - (n=28) und $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ -Nachkommen (n=21) in Rennrohren mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht. **(B)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) in Tage (d) ± Standardfehler. Wildtyp: 22,6 d ± 0,5; $\Delta PaSnf1$: 27,6 d ± 1,2 (p=0,0002); $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$: 23,4 d ± 0,4 (p=0,4027). p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die angegebenen p-Werte beziehen sich auf den Wildtyp. Die Daten von $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ wurden von E. Krotova im Rahmen ihrer Bachelorarbeit generiert. Modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

Zusammenfassend kann demnach gesagt werden, dass das Fehlen der PaSNF1 zu einer verzögerten und verringerten Sporenbildung, bzw. Sporenreifung und interessanterweise zu einer verlängerten Lebensspanne führt. Möglicherweise nimmt die *PaSnf1*-Deletionsmutante einen abfallenden Energiestatus in Form von ATP nicht wahr und somit wird die Induktion des Zelltodes verzögert.

3.4.3 Erstellung und Charakterisierung einer $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante

Um die Rolle von PaSNF1 für die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ zu untersuchen, wurde eine Doppelmutante erstellt, der sowohl PaCLPP als auch PaSNF1 fehlt. Zur Herstellung dieser Doppelmutante wurden die Stämme $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1$ gekreuzt und dikaryotische Nachkommen eines regulären Ascus isoliert. Beide Ausgangsstämme besitzen eine Phleomycin-Resistenzkassette, sodass nach Ascis gesucht wurde, bei denen zwei Sporen Phleomycin-resistent und zwei Sporen Phleomycin-sensitiv sind. Der Ascus mit diesem Resistenz-Muster wurde mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 3.10 A). Anschließend wurde eine der Phleomycin-resistenten Sporen gegen $\Delta PaClpP$ gekreuzt, da die *PaSnf1*-Deletionsmutante Einschränkungen in der Fertilität aufweist und daher keine Selbstung möglich ist. Kleine, monokaryotische Nachkommen dieser Kreuzung

wurden abschließend auf ihre Phleomycin-Resistenz getestet und mit einer Southern-Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 3.10 B).

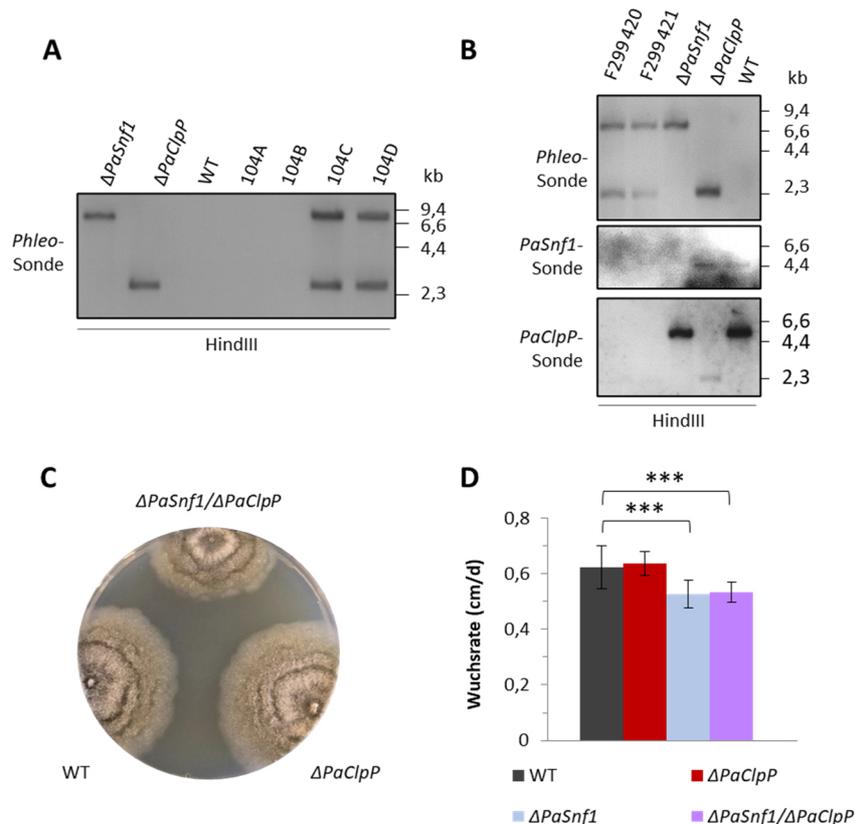


Abbildung 3.10: Phänotypische Analysen der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante.

(A-B) Southern-Blot-Analyse möglicher $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Deletionsmutanten, des Wildtyp-Stammes (WT) als Negativ-Kontrolle und den jeweiligen Einzel-Deletionsmutanten als Positiv-Kontrolle. Es wurden jeweils 1 μ g genomische DNA (gDNA) mit HindIII behandelt und auch einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der aufgetrennten gDNA auf eine Nylon-Membran konnten durch spezifische DIG-markierte Hybridisierungssonden die entsprechenden Gene nachgewiesen werden (*Phleo*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion der Phleomycin-Resistenzkassette; *PaSnf1*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion des *PaSnf1*-Gens; *PaClpP*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion des *PaClpP*-Gens). (C) Phänotypische Analyse von $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpP$ und dem Wildtyp (WT). Monokaryotische Isolate der einzelnen Stämme wurden, nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Medium mit Ammonium-Acetat im Dunklen, auf M2-Medium-Platten angesetzt und für weitere 7 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. (D) Wachsraten der Stämme $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$, $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und des Wildtyps (WT). Die Stämme wurden in Rennrohren mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht angezogen, anschließend wurde nach 9 – 10 Tagen das Wachstum pro Tag ermittelt (cm/d). Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung: Wildtyp (0,62 cm/d \pm 0,08; n=32); $\Delta PaSnf1$ (0,53 cm/d \pm 0,05; n=28); $\Delta PaClpP$ (0,64 cm/d \pm 0,04; n=22); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ (0,53 cm/d \pm 0,04; n=25). *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (***: *p* < 0,001).

Erste phänotypische Analysen ergaben, dass die Doppelmutante sich äußerlich im Hinblick auf ihre Pigmentierung nicht vom Wildtyp oder der *PaClpP*-Deletionsmutante unterscheidet (Abb. 3.10 C). Allerdings weist sie ähnlich wie die *PaSnf1*-Deletionsmutante eine signifikant verminderte Wachsraten auf (Abb. 3.10). Generell gleicht die Doppelmutante der *PaSnf1*-Deletionsmutante.

Als nächstes wurde die Auswirkung der Doppelmutation auf die Lebensspanne analysiert. Hierfür wurden monokaryotische Nachkommen vom Wildtyp, $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ in mit M2-Medium gefüllten Rennrohren bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert (Abb. 3.11 A).

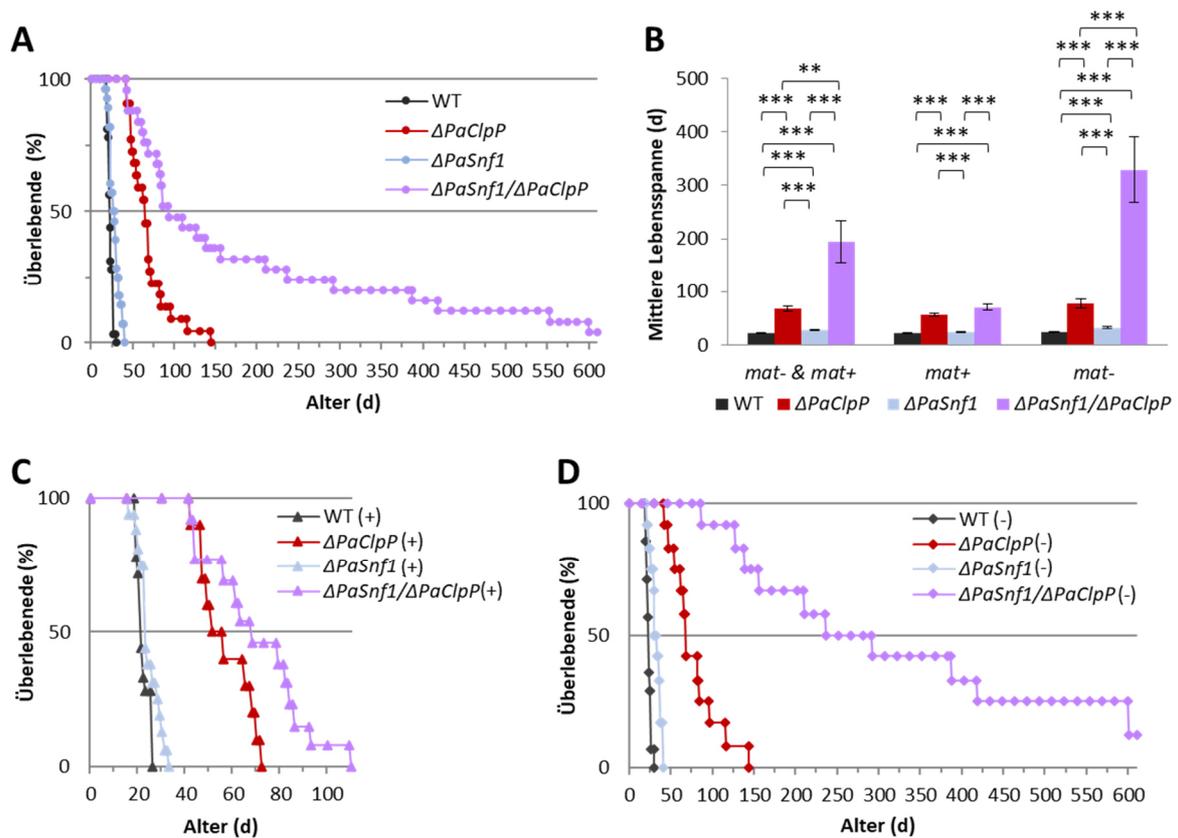


Abbildung 3.11: Lebensspannen-Analyse von Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämmen. (A) Lebensspannen-Analyse von monokaryotischen Wildtyp- (n=32), $\Delta PaSnf1$ - (n=28), $\Delta PaClpP$ (n=22) und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Nachkommen (n=25) in Rennrohren mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht. (B) Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A). (B, links) Beide Paarungstypen (*mat- & mat+*) zusammengenommen (Wildtyp n=32; $\Delta PaSnf1$ n=28, p=0,0002; $\Delta PaClpP$ n=22, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=25, p < 0,0001). (B, Mitte) Alle Nachkommen von (A) mit dem Paarungstyp „+“ (*mat+*) (Wildtyp n=18; $\Delta PaSnf1$ n=16, p=0,0735; $\Delta PaClpP$ n=10, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=13, p < 0,0001). (B, rechts) alle Nachkommen von (A) mit dem Paarungstyp „-“ (*mat-*) (Wildtyp n=14; $\Delta PaSnf1$ n=12, p=0,0002; $\Delta PaClpP$ n=12, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=12, p < 0,0001). Angegeben sind die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern. p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Wildtyp. (C,D) Zur besseren Visualisierung der Unterschiede, wurden die beiden Paarungstypen der Kulturen von (A) getrennt. (C) Alle monokaryotische Nachkommen der Kulturen von (A) mit dem Paarungstyp „+“ (*mat+*). (D) Alle monokaryotische Nachkommen der Kulturen von (A) mit dem Paarungstyp „-“ (*mat-*).

Wie in Abbildung 3.11 A zu erkennen ist, führt das gleichzeitige Fehlen von PaSNF1 und PaCLPP ($\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) überraschenderweise zu einer extremen Lebensspannen-Verlängerung, die die der *PaClpP*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp noch übertrifft. Die Überlebenskurve der Doppelmutante zeigt deutlich eine Abnahme der Sterberate, nach dem ca. 50 % der Isolate gestorben sind (Abb. 3.11 A). Auch nach aktuell 750 Tagen sind noch nicht alle Stämme abgestorben.

Bei einer genaueren Betrachtung der einzelnen Isolate fiel auf, dass die Kulturen, die zu Beginn gestorben waren, alle den Paarungstypen „+“ (*mat+*) aufwiesen, während die langlebigeren Doppelmutanten alle den Paarungstypen „-“ (*mat-*) hatten (Abb. 3.11 B). Auch bei den Einzelmutanten zeigen sich leichte Unterschiede zwischen den Paarungstypen, wobei bei allen Stämmen der Paarungstyp „*mat-*“ langlebiger ist. $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ mit Paarungstyp „*mat-*“ zeigt eine Verlängerung

der mittleren Lebensspanne um mehr als 327 % im Vergleich zur *PaClpP*-Deletionsmutante ($\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP = >329$ Tage; $\Delta PaClpP = 77$ Tage), bzw. eine Verlängerung um mehr als 928 % im Vergleich zur *PaSnf1*-Deletionsmutante ($\Delta PaSnf1 = 32$ Tage) (Abb. 3.11 B (rechts), D). Auch $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ mit dem Paarungstyp „mat+“ zeigt eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne um 22 % im Vergleich zu $\Delta PaClpP$ desselben Paarungstyps ($\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP = 70$ Tage, $\Delta PaClpP = 57$ Tage), bzw. um 180 % im Vergleich zur *PaSnf1*-Deletionsmutante ($\Delta PaSnf1 = 25$ Tage) (Abb. 3.11 B (Mitte), C). Beim Wildtyp kann auf diesem Medium kein Unterschied in der Lebensspanne zwischen den Paarungstypen beobachtet werden (Abb. 3.11 B).

Diese Aufspaltung der Lebensspanne bei den unterschiedlichen Paarungstypen ist recht untypisch, aber nicht gänzlich unbekannt für *P. anserina*. Es konnten bereits einige Paarungstyp-abhängige Effekte mit zwei Allelen von *rmp1* in Zusammenhang gebracht werden (Belcour *et al.*, 1991; Contamine *et al.*, 1996; Contamine *et al.*, 2004; Adam *et al.*, 2012). Das *rmp1*-Allel ist nahe am Paarungstyp-Locus lokalisiert und wird daher bei Kreuzungen nicht durch interchromosomale Rekombination getrennt und mit dem jeweiligen Paarungstyp vererbt. Hierbei wird das *rmp1-1*-Allel mit dem Paarungstyp „mat-“ und das *rmp1-2*-Allel mit dem Paarungstyp „mat+“ vererbt. Bedingt durch eine natürlich aufgetretene Mutation besitzt das *rmp1-2*-Allel ein vorzeitiges Stopcodon und liegt somit verkürzt vor (Contamine *et al.*, 2004). Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse kann also gesagt werden, dass das zeitgleiche Fehlen von PaSNF1 und PaCLPP nur im Zusammenhang mit dem *rmp1-1*-Allel zu dieser extremen Lebensspannen-Verlängerung führt. Doch auch mit dem *rmp1-2*-Allel kann eine leichte Lebensspannenverlängerung im Vergleich zu $\Delta PaClpP$ beobachtet werden (Abb. 3.11 C). Da der Verlust von PaSNF1 weder in den Stämmen mit dem Paarungstyp „mat+“, noch in den Stämmen mit dem Paarungstyp „mat-“ für eine Reversion der Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante sorgt, ist die AMPK nicht für den langlebigen Phänotyp von $\Delta PaClpP$ verantwortlich. Interessanterweise führte die zusätzliche Deletion von *PaSnf1* zu einer zusätzlichen Verlängerung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Anwesenheit von PaSNF1 das Potenzial der Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ begrenzt.

3.4.4 Auswirkung von Hitzestress auf $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$

Die Deletion von *PaSnf1* scheint für *P. anserina* nicht nachteilig zu sein, da die Lebensspanne der *PaSnf1*-Deletionsmutante sogar leicht verlängert ist, im Vergleich zum Wildtyp. Bisher wurden die Stämme unter standardmäßig unter konstanten Bedingungen (Anzucht bei 27 °C unter Dauerlicht) betrachtet. Allerdings schwanken die Bedingungen, wie Licht, Luftfeuchtigkeit oder Temperaturen in der Natur erheblich, sodass das Fehlen von PaSNF1 möglicherweise unter gleichbleibenden Laborbedingungen bei 27 °C nicht nachteilig ist, die AMPK aber für die Adaption an sich ändernde

Umweltbedingungen benötigt werden könnte. Aufgrund dessen wurden die Auswirkungen von unterschiedlich hohen Temperaturen auf die *PaSnf1*-Deletionsmutanten untersucht. Möglicherweise ist PaSNF1 nur unter Stressbedingungen wie zum Beispiel Hitzestress wichtig. Hierfür wurden Lebensspannen-Analysen in Rennrohren mit M2-Medium, bei 32 und 35 °C durchgeführt.

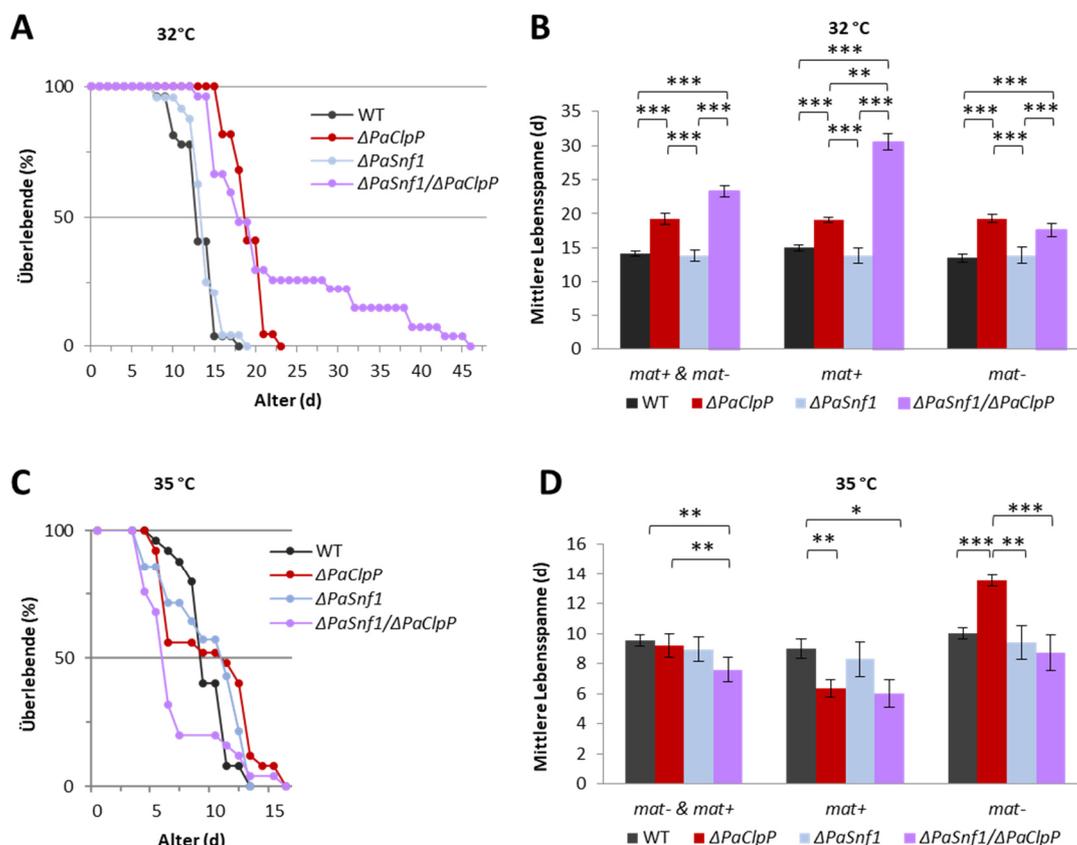


Abbildung 3.12: Auswirkung von Hitzestress auf die Lebensspannen von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

(A,C) Lebensspannen Analysen bei 32 °C (A) oder 35 °C (C) von monokaryotischen Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Nachkommen in Rennrohren mit M2-Medium und bei Dauerlicht (A: Wildtyp, n=27; $\Delta PaSnf1$, n=24; $\Delta PaClpP$, n=22; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$, n=27; C: Wildtyp, n=25; $\Delta PaSnf1$, n=17; $\Delta PaClpP$, n=28; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$, n=19). Alle Stämme wurden für 2 Tage zur Keimung im Dunklen auf BMM mit Ammonium-Acetat inkubiert, anschließend in Rennrohre mit M2-Medium überführt und für 2 Tage bei 27 °C und Dauerlicht angezogen, bevor die Stämme bei der jeweiligen Temperatur inkubiert wurden, bis sie das lineare Wachstum einstellten und abstarben. **(B)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) \pm Standardfehler. (B, links) Beide Paarungstypen (*mat-* & *mat+*) zusammengenommen: Wildtyp n=27; $\Delta PaSnf1$ n=24, p=0,5664; $\Delta PaClpP$ n=22, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=25, p < 0,0001. (B, Mitte) Alle Nachkommen mit Paarungstyp „+“ (*mat+*): Wildtyp n=13; $\Delta PaSnf1$ n=14, p=0,1908; $\Delta PaClpP$ n=9, p=0,0003; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=12, p < 0,0001. (B, rechts) Alle Nachkommen mit Paarungstyp „-“ (*mat-*): Wildtyp n=14; $\Delta PaSnf1$ n=10, p=0,6346; $\Delta PaClpP$ n=13, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=15, p < 0,0001. **(D)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (C) \pm Standardfehler. (D, links) „*mat-* & *mat+*“: Wildtyp n=25; $\Delta PaSnf1$ n=17, p=0,4803; $\Delta PaClpP$ n=28, p=0,7025; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=19, p=0,0252. (D, Mitte) „*mat+*“: Wildtyp n=12; $\Delta PaSnf1$ n=7, p=0,5719; $\Delta PaClpP$ n=17, p=0,0047; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=8, p=0,0136. (D, rechts) „*mat-*“: Wildtyp n=13; $\Delta PaSnf1$ n=10, p=0,5860; $\Delta PaClpP$ n=11, p < 0,0001; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=11, p=0,2788. **(B,D)** Alle angegebenen p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Wildtyp. **(C,D)** modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

Wie in Abbildung 3.12 A und B zu erkennen ist, übt bereits eine Temperaturerhöhung von 5 °C (statt 27 °C, 32 °C) einen negativen Effekt auf die Lebensspanne aller untersuchten Stämme aus. Allerdings

sind die Stämme $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ nach wie vor langlebig im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.12 A,B). Werden die Wachsraten betrachtet, fällt allerdings eine deutliche Reduzierung der Wachsrates der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante im Vergleich zum Wildtyp auf (siehe Anhang, Abb. 8.4 A). Bei dieser Temperatur (32 °C) zeigt die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante erneut einen Paarungstyp-abhängigen Unterschied, hierbei scheint das *rmp1-2*-Allel, gekoppelt mit dem „mat+“-Locus von Vorteil zu sein. Alle anderen Stämme zeigen keine Unterschiede zwischen den Paarungstypen (Abb. 3.12 B). Bei 35 °C lassen alle analysierten Stämme eine starke Verkürzung der Lebensspanne erkennen (Abb. 3.12 C,D). Am stärksten ist die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante beeinträchtigt. Interessanterweise zeigt bei dieser Temperatur die Doppelmutante keine Paarungstyp-abhängigen Unterschiede mehr (Abb. 3.12 D). Allerdings kann nun ein solcher Unterschied bei der *PaClpP*-Deletionsmutante beobachtet werden (Abb. 3.12 D). Hier sind die Stämme mit dem Paarungstyp „mat-“, also mit dem *rmp1-1*-Allel, langlebiger als die Stämme mit dem Paarungstyp „mat+“. Bei den anderen Stämmen sind diese Unterschiede zwischen den Paarungstypen marginal und nicht signifikant. Die Wachsraten der Deletionsstämmen sind im Vergleich zum Wildtyp bei 35 °C deutlich reduziert (Siehe Anhang, Abb. 8.4 B). Nur die $\Delta PaClpP$ -Nachkommen mit dem Paarungstyp „mat-“ weisen eine ähnliche Wachsrates wie der Wildtyp des selben Paarungstyps auf (Siehe Anhang, Abb. 8.4 B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die untersuchten Stämme ein reduziertes Wachstum und eine reduzierte Lebensspanne aufweisen, wenn sie bei höheren Temperaturen inkubiert werden. Die Lebensspannen-Analyse zeigt, dass Hitze zwar schädlich ist, aber im Vergleich zum Wildtyp ist die Lebensspanne von den Einzel-Deletionsstämmen nicht verkürzt (Abb. 3.12). Nur die Doppelmutante $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ zeigt bei 35 °C im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verkürzte Lebensspanne (Abb. 3.12 C,D). Bei 35 °C zeigen alle Deletionsstämmen ein reduziertes Wachstum auf, bis auf die *PaClpP*-Deletionsmutante mit dem *rmp1-1*-Allel (Paarungstyp „mat-“). Dies ist ein Hinweis dafür, dass *rmp1-1* einen positiven Effekt auf das Wachstum und die Lebensspanne der *PaClpP*-Deletionsmutante ausübt und diesem Stamm hilft, resistenter gegenüber Hitzestress zu sein.

3.4.5 Beeinträchtigung der Autophagie in den *PaSnf1*-Deletionsmutanten

Da die AMPK als Haupt-Regulator der Autophagie bei Nährstoffmangel, bzw. bei Energiestress gilt, und die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ nach Knuppertz und Osiewacz (2017) mit einem gesteigerten autophagischen Umsatz zusammenhängt, ist die Untersuchung der Autophagie in der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante unumgänglich. Möglicherweise könnte auch in der Doppelmutante die Autophagie für die extreme Langlebigkeit verantwortlich sein, da der Organismus einen sich verändernden Energiestatus nicht mehr wahrnehmen kann und so die Regulation der Autophagie

gestört sein könnte. Die AMPK kann die Autophagie entweder direkt durch die Phosphorylierung von ATG1, oder indirekt durch die Regulation weiterer Kinasen, zum Beispiel durch die Inhibierung von mTOR beeinflussen (Gwinn *et al.*, 2008; Mao und Klionsky, 2011; Holczer *et al.*, 2020).

ATG1 bildet mit verschiedenen anderen Proteinen den sogenannten ATG1-Komplex. In Säugetieren besteht dieser Komplex aus den Proteinen ULK1 (homolog zum Hefe-ATG1), ATG13, FIP200 und ATG101 (Ganley *et al.*, 2009; Mercer *et al.*, 2009), in der Hefe aus den Proteinen ATG1, ATG13 und dem ATG17-ATG29-ATG31-Subkomplex (Köfinger *et al.*, 2015). Dieser Komplex ist essentiell für die Autophagie-Induktion. Hierbei ist die ATG1-Aktivität wichtig für die richtige Anordnung und Lokalisation der betreffenden Proteine an der prä-autophagosomalen Struktur (PAS) (Cheong *et al.*, 2008).

Um zu untersuchen, ob, bzw. wie die Autophagie in der $\Delta PaSnf1$ und in der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ verändert ist, wurden beide Stämme mit dem $PaSod1::Gfp$ -Reporterstamm gekreuzt. Dadurch wurden Reporterstämme, mit denen generelle, nicht selektive Autophagie verfolgt werden können, erzeugt. Um die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Tripelmutante zu erhöhen, wurde die Doppelmutante mit dem $\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Stamm gekreuzt. Zunächst wurden aus dieser und der Kreuzung von $\Delta PaSnf1$ und $PaSod1::Gfp$ dikaryotische Nachkommen isoliert und in einer Southern-Blot-Analyse untersucht (Abb. 3.13 A-C). Zur Erlangung monokaryotischer Nachkommen wurden die entsprechenden dikaryotischen Stämme wegen ihrer eingeschränkten Fertilität mit den jeweiligen Ausgangstämmen ($\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ oder $PaSod1::Gfp$) gekreuzt und die monokaryotischen Isolate in einer Southern-Blot-Analyse überprüft (Abb. 3.13 A-C).

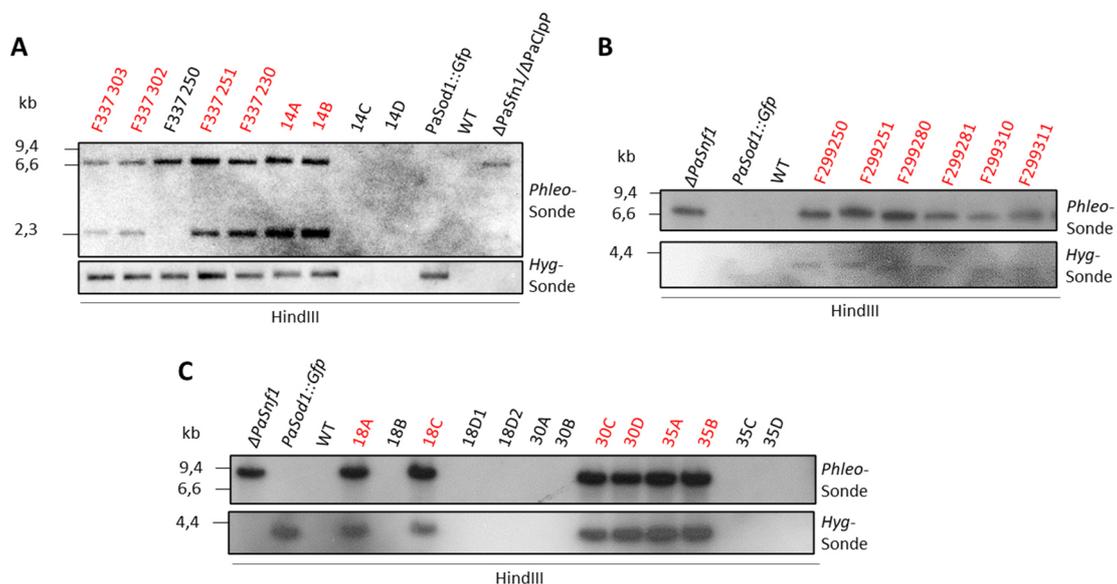


Abbildung 3.13: Southern-Blot-Analysen der möglichen $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ - und $\Delta PaSnf1/PaSod1::Gfp$ -Stämme.

(A-C) Southern-Blot-Analysen möglicher $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ -Dreifachmutanten (A) und möglicher $\Delta PaSnf1/Sod1::Gfp$ -Doppelmutanten (B und C). Proben des Wildtyp-Stammes (WT) wurden als Negativ-Kontrolle und der jeweiligen Einzel-Deletionsmutanten als Positiv-Kontrolle aufgetragen. Jeweils 1 μ g genomische DNA (gDNA) wurden mit HindIII behandelt und auf einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der gDNA auf eine Nylon-Membran konnten durch spezifische DIG-markierte Hybridisierungssonden die entsprechenden Gene nachgewiesen werden (Phleo-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion der

Phleomycin-Resistenzkassette; *Hyg*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion der Hygromycin-Resistenzkassette). Die Stämme, welche als Doppel-, bzw. Dreifachmutanten identifiziert werden konnten, wurden durch eine rote Beschriftung hervorgehoben. **(A,C)** Die untersuchten Ascii wurden folgendermaßen beschriftet: Die vorangestellte Zahl stellt die Nummer des isolierten Ascus dar, während die Buchstaben A-D die jeweiligen Sporen innerhalb dieses Ascus repräsentieren (Beispiel: 14A-14D).

Für alle Versuche mit dem $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stamm mussten die eingesetzten Nachkommen im Southern-Blot verifiziert werden, da beide Deletionsstämme eine Phleomycin-Resistenzkassette als Selektionsmarker tragen. Zur Untersuchung der Autophagie wurde Myzel dieser Stämme nach 7 und 20 Tagen geerntet und Gesamtprotein isoliert. Hierfür wurden die Stämme zuvor zur Alterung auf M2-Platten angezogen und für die letzten zwei Tage in CM-Flüssigkulturen bei 27 °C unter Schütteln und Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurden die Proteinextrakte in einer Western-Blot-Analyse genauer untersucht (Abb. 3.14 A,B).

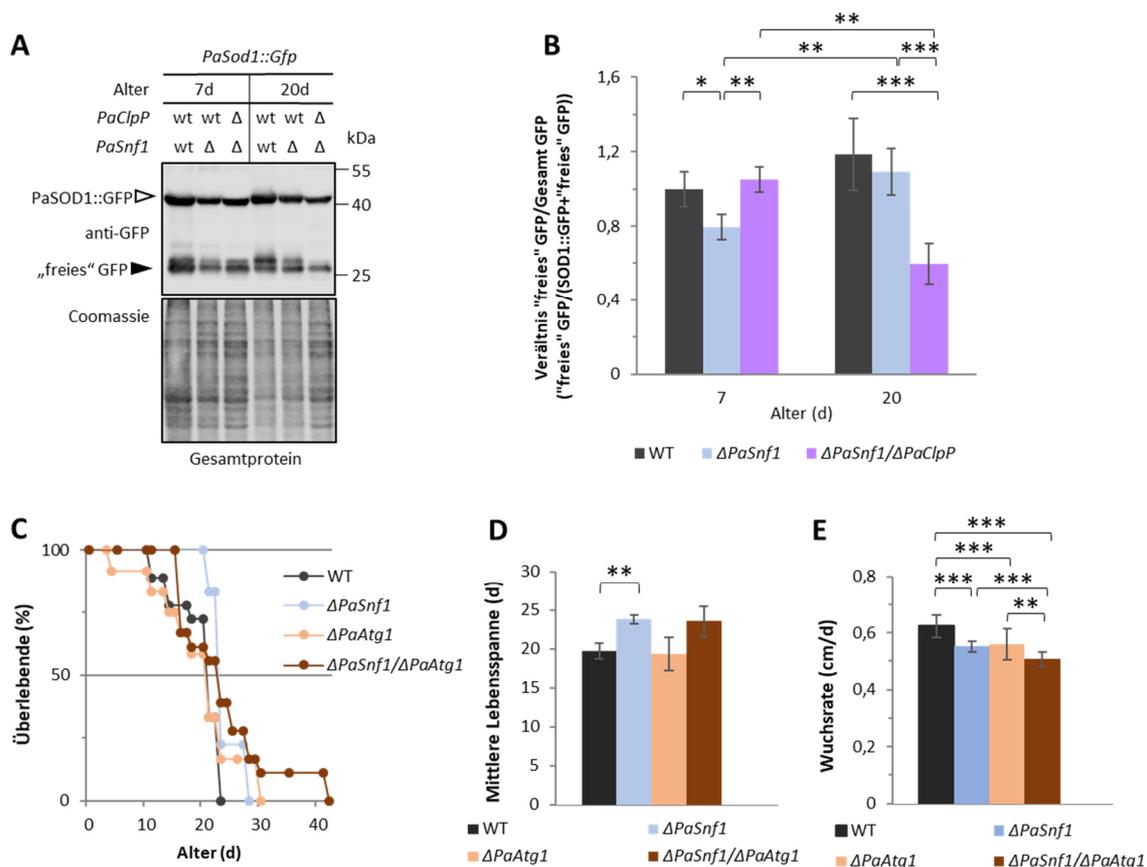


Abbildung 3.14: Rolle der Autophagie in den *PaSnf1*-Deletionsmutanten.

(A) Western-Blot-Analysen von verschiedenen alten *P. anserina* Stämmen (*PaSod1::Gfp* (Wildtyp-Kontrolle) je n=5; $\Delta PaSnf1/PaSod1::Gfp$ 7d: n=4, 20d: n=5; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ 7d: n=3, 20d n=5). Es wurden je 50 µg Gesamtproteinextrakte auf 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Das GFP wurde mit einem anti-GFP-Antikörper detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel diente hierbei als Ladekontrolle. Ausgewählte Größen des Größenstandards sind jeweils rechts dargestellt. **(B)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (A). Gezeigt ist das relative Verhältnis vom „freien GFP“ zum „Gesamt GFP“ (summierte Intensität des freien GFP und des Fusionsproteins *PaSOD1::GFP*) ± Standardabweichung. Das relative Verhältnis des freien GFP und des Fusionsproteins der Proben des 7 Tage alten (7d) *PaSod1::Gfp*-Stammes wurde als 1 definiert. **(C)** Lebensspannen-Analyse von dikaryotischen Wildtyp- (n=18), $\Delta PaSnf1$ - (n=18), $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ - (n=18) und $\Delta PaAtg1$ -Nachkommen (n=12) auf Platten mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht. Die Stämme mussten aufgrund der Fruchtkörperbildung alle 7 Tage auf frische Platten umgesetzt werden. **(D)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (C) in Tage (d) ± Standardfehler. Wildtyp: 20 d ±

1,0; $\Delta PaSnf1$: 23,8 d \pm 0,6 (p=0,0013); $\Delta PaAtg1$: 19,3 d \pm 2,1 (p=0,8564); $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$: 23,6 d \pm 1,9 (p=0,0875). (E) Wuchsraten in cm/Tag (cm/d) der Kulturen von (C) \pm Standardfehler. Alle p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student's t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Wildtyp.

Wie in Abbildung 3.14 zu erkennen ist, führt das Fehlen von PaSNF1 in 7 Tage alten Stämmen zu einer signifikanten Reduzierung der Autophagie um 21 % im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (*PaSod1::Gfp*). Die Doppelmutante jedoch zeigt bei 7 Tage alten Stämmen keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Bei 20 Tage alten Stämmen ist dieser Effekt umgekehrt. Hier kann kein signifikanter Unterschied der *PaSnf1*-Deletionsmutante zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 3.14 B). $\Delta PaSnf1$ zeigt einen signifikanten Anstieg des autophagischen Flusses um 22 %, wenn 7 Tage alte mit 20 Tage alten Stämmen verglichen werden. Bei 20 Tage alten $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämmen hingegen ist eine signifikant verminderte Autophagie um 58 % zu beobachten wenn sie mit gleichalten Wildtyp-Kontrollen verglichen werden (Abb. 3.14 B). Im Gegensatz zu $\Delta PaClpP$, bei der die Autophagie konstant gesteigert ist und für die Langlebigkeit benötigt wird, nimmt also die Autophagie in dieser extrem langlebigen Doppelmutante mit dem Alter ab. Die Paarungstypen spielen bei diesem Experiment keine große Rolle, da sowohl Proben von „mat+“- als auch von „mat“-Stämmen benutzt und zusammen genommen wurden.

Um zu untersuchen, ob die Langlebigkeit der *PaSnf1*-Deletionsmutante Autophagie-abhängig ist, wurde eine $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Doppelmutante erstellt und Lebensspannen-Analysen durchgeführt (Abb. 3.14 C,D). Durch das Fehlen von PaATG1 wird die Autophagie in diesen Stämmen zum Großteil inhibiert. Für die Analyse wurden nur Nachkommen großer, dikaryotischer Sporen verwendet, da sowohl die *PaSnf1*- als auch die *PaAtg1*-Deletionmutante eine Beeinträchtigung der Fertilität zeigen. Aufgrund dessen war es nicht möglich die dikaryotischen Stämme erneut gegen $\Delta PaSnf1$ oder $\Delta PaAtg1$ zu kreuzen um kleine, monokaryotische Nachkommen zu erhalten. Alle verwendeten Stämme mit einer *PaSnf1/PaAtg1*-Doppelmutation wurden in einer Southern-Blot-Analyse und eine Hybridisierungs-Sonde gegen die Phleomycin-Resistenzkassette überprüft, da beide Deletionsstämme als Selektionsmarker eine Phleomycin-Resistenz tragen (Siehe Anhang, Abb. 8.5 A-C). Durch die Verwendung dikaryotischer Nachkommen mussten die Lebensspannen-Analysen auf M2-Medium-Platten durchgeführt und die verwendeten Stämme alle 7 Tage auf frisches Medium umgesetzt werden, da die Wildtyp- und die $\Delta PaSnf1$ -Stämme nach 7 Tagen Fruchtkörper gebildet haben, welche nach einer längeren Inkubation Sporen freigesetzt hätten. Somit wäre es nicht möglich, die genaue Wuchsfrente des analysierten Stammes zu bestimmen. Um den Stress durch das Umsetzen bei allen Stämmen gleich zu halten, wurden auch die Stämme mit einer *PaAtg1*-Deletion ($\Delta PaAtg1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$) alle 7 Tage auf frisches Medium umgesetzt. Wie in Abbildung 3.14 C,D zu erkennen ist, ist die Lebensspannenverlängerung der *PaSnf1*-Deletionsmutante nicht Autophagie-abhängig. Auch die *PaSnf1/PaAtg1*-Doppeldelentionsmutante zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine leichte, nicht

signifikante Lebensspannenverlängerung. In dieser Analyse ist auch die Lebensspanne der *PaSnf1*-Deletionsmutante nicht so stark erhöht wie in der Analyse in Rennrohren (Abb. 3.9 A,B). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, dass der durch das häufige Umsetzen entstandene Stress einen negativen Einfluss auf die Lebensspanne ausüben könnte. In Rennrohren können die meisten Stämme bis zum Absterben wachsen. Auch die Verwendung dikaryotischer Nachkommen kann einen negativen Einfluss auf die Lebensspanne ausüben, da unter diesen Umständen der Organismus viel Energie für die Fruchtkörperbildung aufwendet.

Die Wachsrate der *PaAtg1*-Deletionsmutante ist im Vergleich zum Wildtyp genauso stark vermindert wie die Wachsrate der *PaSnf1*-Deletionsmutante (Abb.3.14 E). Eine gleichzeitige Deletion der beiden Gene ($\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$) führt zu einer zusätzlichen, signifikanten Reduzierung der Wachsrate (Abb. 3.14 E). Die verminderte Wachsrate durch das Fehlen von PaATG1 stimmt mit früheren Untersuchungen dieser Deletionsmutante überein (Knuppertz *et al.*, 2014).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass PaSNF1 für die basale Autophagie, also für die grundlegende Autophagie in *P. anserina* die kontinuierlich abläuft, keine große Rolle einzunehmen scheint. Unter normalen Bedingungen wird die AMPK ebenso häufig phosphoryliert wie dephosphoryliert, wenn AMP diese aktivierende Phosphorylierung nicht schützt (Sanders *et al.*, 2007). Daher ist es nicht verwunderlich, dass das Fehlen von PaSNF1 keinen Einfluss auf die Autophagie unter optimalen Bedingungen wie in CM-Flüssigmedium ausübt.

Um zu untersuchen, ob die Autophagie-Induktion unter Stressbedingungen, zum Beispiel unter Nährstoff-Mangel funktioniert, wurden Lebensspannen-Analysen von Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämmen auf M2-Medium-Platten ohne Stickstoffquelle (M2-N), allerdings mit der 1,5-fachen Menge an Dextrin (Kohlenstoff-Quelle), bei 27 °C und Dauerlicht durchgeführt (Abb. 3.15). Es ist allgemein bekannt, dass Autophagie bei Stickstoffmangel induziert wird (Takehige *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 2004; Onodera und Ohsumi, 2005; Kohda *et al.*, 2007).

Wie in Abbildung 3.15 zu erkennen ist, sind alle Stämme ohne PaSNF1 nicht fähig auf Stickstoffmangel-Medium (M2-N) zu überleben. Sie sterben bereits nach durchschnittlich 6 ($\Delta PaSnf1$), bzw. nach ca. 10 Tagen ($\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) ab. Der Wildtyp hingegen zeigt eine deutliche Lebensspannen-Verlängerung im Vergleich zu der Lebensspanne auf normalen M2-Medium. Auf M2-N beträgt die mittlere Lebensspanne des Wildtyps ca. 39 Tage, während die mittlere Lebensspanne auf M2-Medium ca. 23 Tage beträgt, wobei die Lebensspannen unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt wurden (M2-Medium im Rennrohr und M2-N-Medium auf Platten) und die Daten deswegen nicht direkt verglichen werden können. $\Delta PaClpP$ zeigt auf M2-N-Medium nach wie vor eine Lebensspannen-Verlängerung im Vergleich zum Wildtyp (mittlere Lebensspanne von ca. 55 d) (Abb. 3.15 A,B).

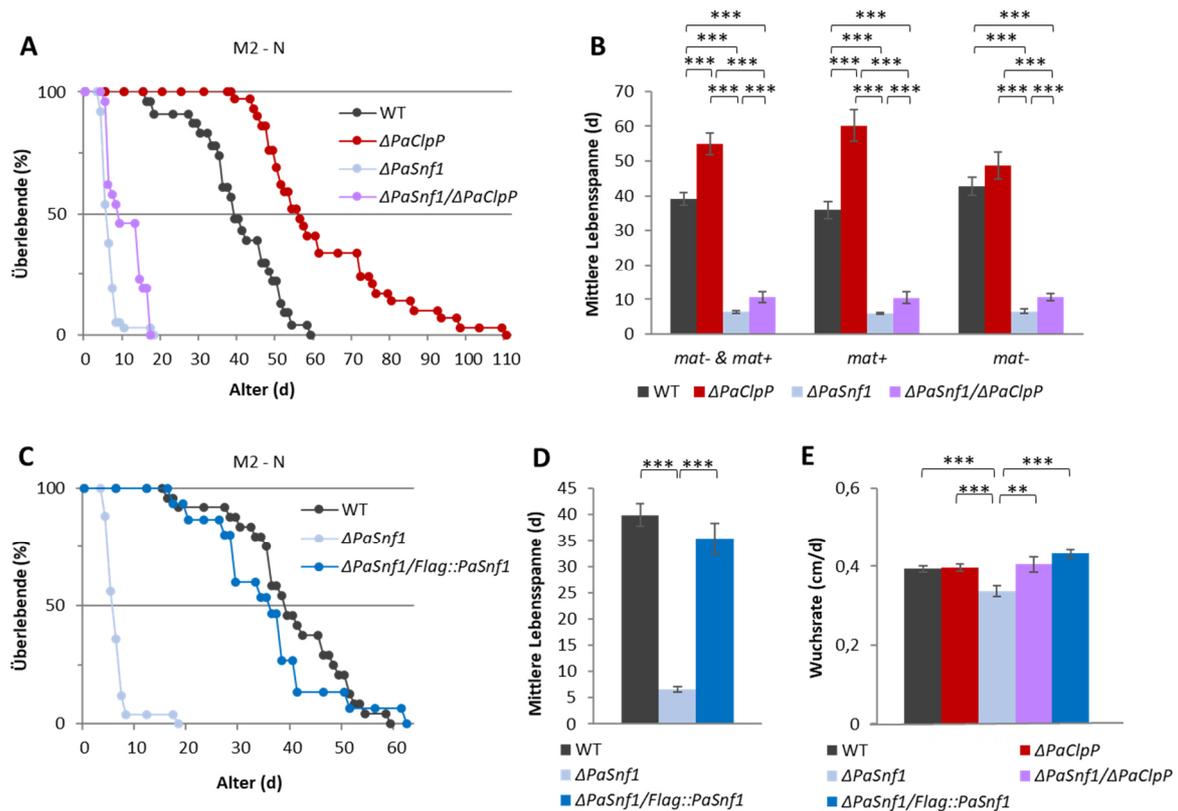


Abbildung 3.15: Lebensspannen-Analysen auf M2-N, einem Autophagie-induzierenden Medium.

(A,C) Lebensspannen-Analyse von monokaryotischen Wildtyp- (A,C: n=34), $\Delta PaSnf1$ - (A,C: n=37), $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ - (A: n=26), $\Delta PaClpP$ - (A: n=42) und $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$ -Nachkommen (C: n=15) auf Platten mit M2-Medium ohne Stickstoff, mit der 1,5-fachen Menge an Dextrin bei 27 °C und Dauerlicht. (B) Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) in Tage (d) \pm Standardfehler. (B, links) Kulturen von (A) mit beiden Paarungstypen (*mat-* & *mat+*): Wildtyp: 39 d \pm 1,9; $\Delta PaSnf1$: 6,4 d \pm 0,4 (p < 0,0001); $\Delta PaClpP$: 55 d \pm 3,1 (p=0,0001); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 10,6 d \pm 1,5 (p < 0,0001). (B, Mitte) Kulturen von (A) mit dem Paarungstyp „+“ (*mat+*): Wildtyp: 36 d \pm 2,5; $\Delta PaSnf1$: 6 d \pm 0,3 (p < 0,0001); $\Delta PaClpP$: 60 d \pm 4,5 (p < 0,0001); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 10,4 d \pm 1,7 (p < 0,0001). (B, rechts) Kulturen von (A) mit dem Paarungstyp „-“ (*mat-*): Wildtyp: 43 d \pm 2,6; $\Delta PaSnf1$: 6,6 d \pm 0,6 (p < 0,0001); $\Delta PaClpP$: 49 d \pm 3,9 (p=0,2329); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 10,7 d \pm 1,1 (p < 0,0001). (D) Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (C) in Tage (d) \pm Standardfehler. Wildtyp: 39 d \pm 1,9; $\Delta PaSnf1$: 6,4 d \pm 0,4 (p < 0,0001); $\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$: 35,3 d \pm 2,9 (p=0,2801) (E) Wachstumsraten in cm/Tag (cm/d) der Kulturen von (A & C) \pm Standardfehler. Alle p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001). Die angegebenen p-Werte beziehen sich jeweils auf den Wildtyp.

Die Lebensspanne von $\Delta PaSnf1$ auf M2-N wird durch die Komplementation mit dem *Flag::PaSnf1*-Konstrukt revertiert (Abb. 3.15 C,D). Der Stamm ($\Delta PaSnf1/Flag::PaSnf1$) zeigt eine ähnliche Lebensspanne wie der Wildtyp (Abb. 3.15 C,D). Dies belegt, dass die verkürzte Lebensspanne von $\Delta PaSnf1$ und auch von $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ auf M2-N tatsächlich durch das Fehlen von PaSNF1 verursacht wird. Interessanterweise ist allerdings die Wachstumsrate der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante auf dem M2-N-Medium signifikant verbessert im Vergleich zu der *PaSnf1*-Deletionsmutante (Abb. 3.15 E). Dies zeigt, dass die zusätzliche Deletion von *PaClpP* im *PaSnf1*-Deletionshintergrund einen positiven Effekt auf das Wachstum, aber nicht auf die Lebensspanne auf M2-N ausübt. Auf diesem Medium scheint der Paarungstyp, bzw. die unterschiedlichen *rmp1*-Allele keinen Einfluss auf die Lebensspannen der

analysierten Stämme auszuüben. Obwohl eine leichte Verkürzung der Lebensspanne des $\Delta PaClpP$ „mat“-Stamm beobachtet werden kann, ist dies nicht signifikant ($p=0,0663$).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass, anders als bei der $PaClpP$ -Deletionsmutante, Autophagie unter normalen Bedingungen keine größere Rolle in $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ spielt. Allerdings ist PaSNF1 essentiell für die Stress-bedingte Autophagie-Induktion und in diesem Fall für das Überleben der Stämme bei Stickstoff-Mangel.

3.4.6 Beeinflussung der Mitochondrien-Morphologie durch PaSNF1

Da der Autophagie für die extreme Langlebigkeit der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante keine besondere Rolle zukommt, ergibt sich die Frage, wie die Deletionsmutante eine mögliche Beeinträchtigung der Energiehomöostase kompensiert. Sind möglicherweise die Mitochondrien in den entsprechenden Stämmen verändert und sorgen somit für einen Ausgleich des veränderten Energiemetabolismus? Um dies zu überprüfen, wurden in den nächsten Experimenten die Mitochondrien genauer auf ihre Morphologie, vor allem aber auf ihre Funktionalität untersucht. Mitochondrien nehmen während der Alterung von Organismen eine wichtige Rolle ein. Es sind sehr dynamische Strukturen und unterliegen einem ständigen Wechsel zwischen Fusion und Fission (Bereiter-Hahn und Vöth, 1994a). Es konnte in *P. anserina* gezeigt werden, dass die Unterdrückung der Fission durch die Deletion von $PaDnm1$ zur Langlebigkeit (Scheckhuber *et al.*, 2007) und die Förderung der Fission zu einer verkürzten Lebensspanne führt (Scheckhuber *et al.*, 2011b). Wegen dieser großen Rolle der Mitochondrien während der Alterung und Entwicklung, wurde die Mitochondrien-Morphologie der $\Delta PaClpP$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme genauer untersucht. Dazu wurden die Mitochondrien der Stämme zunächst mit dem Membranpotential-abhängigen Fluoreszenz-Farbstoff MitoTrackerRed gefärbt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 3.16).

Bei der Fluoreszenz-mikroskopischen Analyse zeigte sich, dass alle Stämme in einem Alter von 7 Tagen filamentöse Mitochondrien aufweisen (Abb. 3.16). Der Wildtyp zeigt bei 20 Tage alten Stämmen nur noch fragmentierte Mitochondrien. Interessanterweise sind die Mitochondrien von 20 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Stämmen ebenfalls überwiegend fragmentiert (Abb. 3.16), obwohl dieser Stamm biologisch betrachtet noch nicht so stark gealtert ist wie der Wildtyp, da die $PaClpP$ -Deletionsmutante eine sehr viel längere Lebensspanne aufweist.

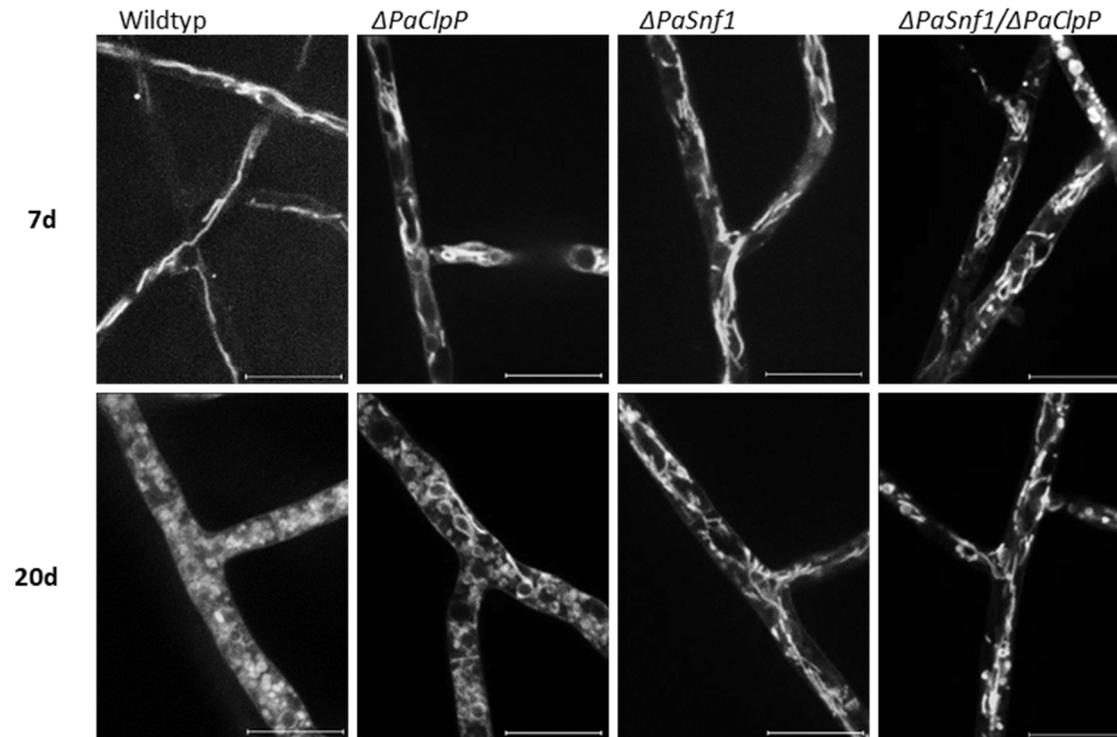


Abbildung 3.16: Das Fehlen von PaSNF1 beeinflusst die Mitochondrien-Morphologie.

Konfokale Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie mit Myzel von 7- und 20 Tage alten Stämmen. Wildtyp-, $\Delta PaClpP$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme wurden nach der Alterung auf M2-Platten vor der Mikroskopie für einen Tag auf Muldenobjektträger mit M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht angezogen. Die Mitochondrien wurden kurz vor der Mikroskopie mit 2 μM MitoTrackerRed für 15 min im Dunklen gefärbt und das Myzel anschließend mit Wasser gewaschen. Der Maßstab entspricht 10 μm . Modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

In Abbildung 3.16 ist zu erkennen, dass bei 20 Tage alten $\Delta PaSnf1$ -Stämmen, im Gegensatz zu den $\Delta PaClpP$ -Stämmen, überraschenderweise nach wie vor filamentöse Mitochondrien zu beobachten sind. Die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante zeigt in 20 Tage alten Stämmen sowohl filamentöse, als auch einige fragmentierte Mitochondrien, obwohl die Anzahl der filamentösen Mitochondrien überwiegt (Abb. 3.16). Dies zeigt, dass hier der Phänotyp durch das Fehlen von PaSNF1 epistatisch gegenüber dem Fehlen von PaCLPP ist.

Dass die AMPK die mitochondriale Dynamik regulieren kann, ist bereits bekannt (Toyama *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2019; Seabright *et al.*, 2020). Da die AMPK die mitochondriale Fission fördern kann (Toyama *et al.*, 2016) und die $PaSnf1$ -Deletionsmutante auch im hohen Alter weiterhin filamentöse Mitochondrien aufweist, wurde analysiert, wie das Fehlen von PaSNF1 das mitochondriale Fissions-Protein PaDNM1 beeinflusst. Hierfür wurden Western-Blot-Analysen mit Gesamtprotein- und mitochondrialen Extrakten durchgeführt, um die Menge an PaDNM1 zu untersuchen und ob die Rekrutierung von PaDNM1 an die Mitochondrien gestört ist, wenn PaSNF1 fehlt (Abbildung 3.17).

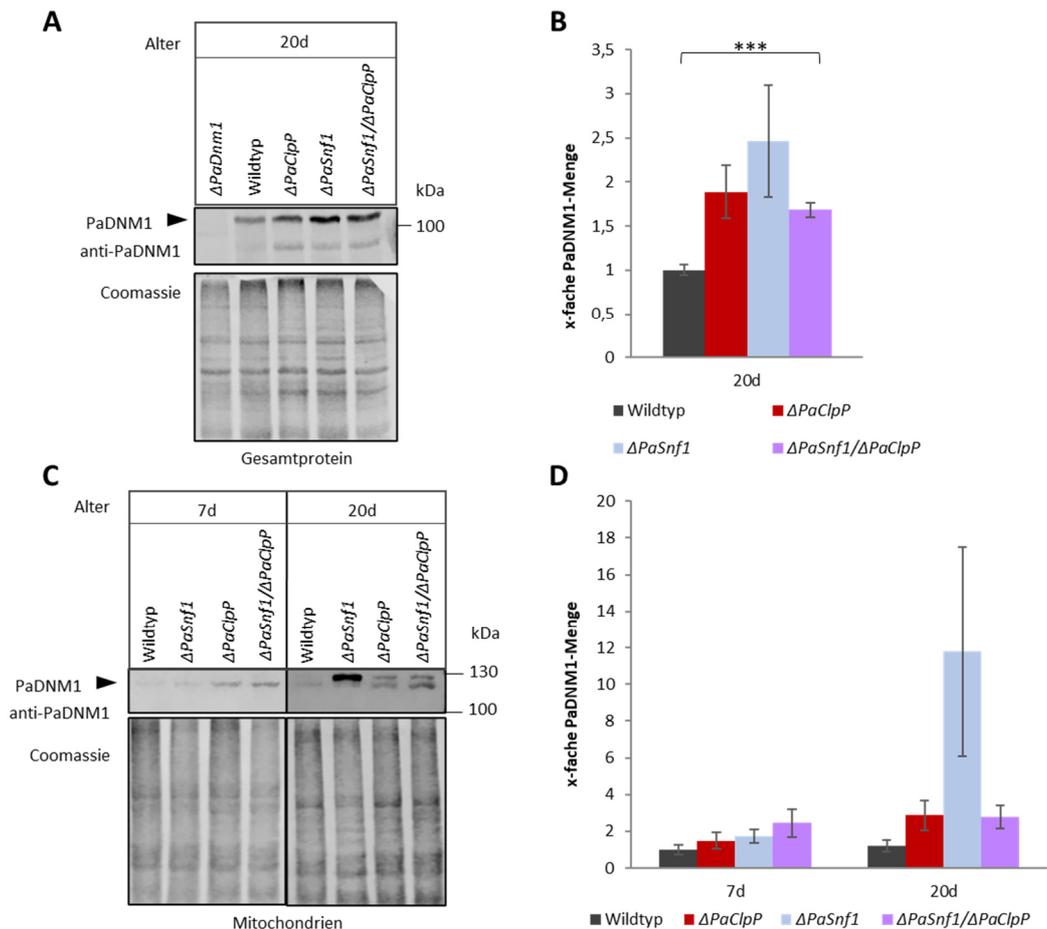


Abbildung 3.17: PaDNM1-Gehalt in $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

(A,C) Western-Blot-Analysen von Proteinen 20 (A,C) und 7 Tage alter *P. anserina* Stämme (C) (A: Wildtyp n=3; $\Delta PaSnf1$ n=3; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ n=4, $\Delta PaClpP$ n=4; C: je n=3). Es wurden entweder 100 μ g Gesamtprotein (A) oder 50 μ g mitochondriale Proteinextrakte (C) auf 8 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. PaDNM1 wurde je mit einem anti-PaDNM1-Antikörper detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel diente als Ladekontrolle. Ausgewählte Größen des Größenstandards ist jeweils rechts angegeben. (B) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (A) \pm Standardfehler. Das PaDNM1-Signal wurde auf das mit Coomassie gefärbte Gel normiert. Der Wildtyp wurde als 1 definiert. *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student's *t*-test“ ermittelt (***: *p* < 0,001). (D) Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (C) \pm Standardfehler. Das PaDNM1-Signal wurde auf das mit Coomassie gefärbte Gel normiert. Der 7 Tage alte Wildtyp wurde als 1 definiert. Modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

Wie in Abbildung 3.17 zu erkennen ist, zeigen alle drei 20 Tage alten Deletionsmutanten ($\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) eine erhöhte PaDNM1-Menge in Gesamtproteinextrakten (Abb.3.17 A,B). Doch nur in $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ ist dieser Unterschied zum Wildtyp signifikant. Auch in den mitochondrialen Proteinextrakten zeigen alle drei Deletionsstämme, sowohl in 7 Tage als auch in 20 Tage alten Stämmen, eine Anreicherung von PaDNM1. Diese Unterschiede sind allerdings nicht signifikant (Abb. 3.17 C,D). Überraschenderweise zeigt $\Delta PaSnf1$ hierbei den größten Unterschied, obwohl die Mitochondrien in den 20 Tage alten Stämmen weiterhin filamentös sind (Abb. 3.16 und Abb. 3.17 C,D). PaDNM1 ist eine GTPase, was bedeutet, dass dieses Protein für seine Funktion GTP benötigt. Möglicherweise ist zwar in $\Delta PaSnf1$ vermehrt PaDNM1 zu finden, aber das Protein könnte funktionslos, bzw. inaktiv sein. In $\Delta PaClpP$ korreliert die erhöhte PaDNM1-Menge in 20 Tage alten

Stämmen mit dem auftretenden fragmentierter Mitochondrien (Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen PaCLPX und PaDNM1 sein.

3.4.7 Unterschiede der $\Delta PaClpP$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme in der Mitochondrien-Funktion

Die veränderte Mitochondrien-Morphologie lässt darauf schließen, dass auch die Funktion dieser Organellen verändert ist. Frühere Arbeiten mit $\Delta PaClpXP$ zeigten, dass der Sauerstoffverbrauch in diesem Stamm reduziert war (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Zudem konnte in der Hefe gezeigt werden, dass die AMPK einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung ausüben kann (Yi *et al.*, 2017). Dies bedeutet, dass beide Proteine einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion ausüben könnten. In den nächsten Experimenten wurde deshalb ein genauerer Blick auf die Auswirkungen von PaCLPP und PaSNF1 auf die mitochondriale Funktion geworfen.

Zunächst wurde die Atmung in den Deletionsmutanten $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ untersucht werden. Hierfür wurden Wuchsexperimente auf Rotenon-haltigem M2-Medium durchgeführt. Rotenon ist ein Inhibitor des Komplex I der Atmungskette. Bei einer Beeinträchtigung dieses Komplexes, sollte die zusätzliche Inhibierung durch Rotenon keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Stämme ausüben. Damit wurde untersucht, in wie fern die Stämme auf die Atmung über Komplex I angewiesen sind. Wie in Abbildung 3.18 (A) zu erkennen ist, zeigen alle drei Deletionsmutanten ($\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) ein signifikant schlechteres Wachstum auf Rotenon-haltigem Medium, während der Wildtyp bei dieser Konzentration (2,5 μ M Rotenon) keine Einschränkungen im Wachstum zeigt. Daraus folgt, dass die Deletionsstämme auf die Atmung über Komplex I angewiesen sind. Eine Inhibierung dieses Komplexes führt zu einem schlechteren Wachstum der Stämme.

Atmungsmessungen mit Myzel aus Flüssigkulturen zeigten, dass $\Delta PaClpP$ in allen Altersstadien (7, 12 und 20 Tage) im Vergleich zum Wildtyp einen geringeren Sauerstoffverbrauch aufweist (Abb. 3.18 B). Doch nur bei 12 Tage alten Stämmen ist dieser Unterschied auch signifikant. Die $\Delta PaSnf1$ -Deletionsmutane zeigt hingegen in 7 und 12 Tage alten Kulturen einen marginal erhöhten und in 20-Tage alten Kulturen einen leicht verringerten Sauerstoffverbrauch (Abb. 3.18 B). Diese Unterschiede sind im Vergleich zum Wildtyp in keinem Altersstadium signifikant.

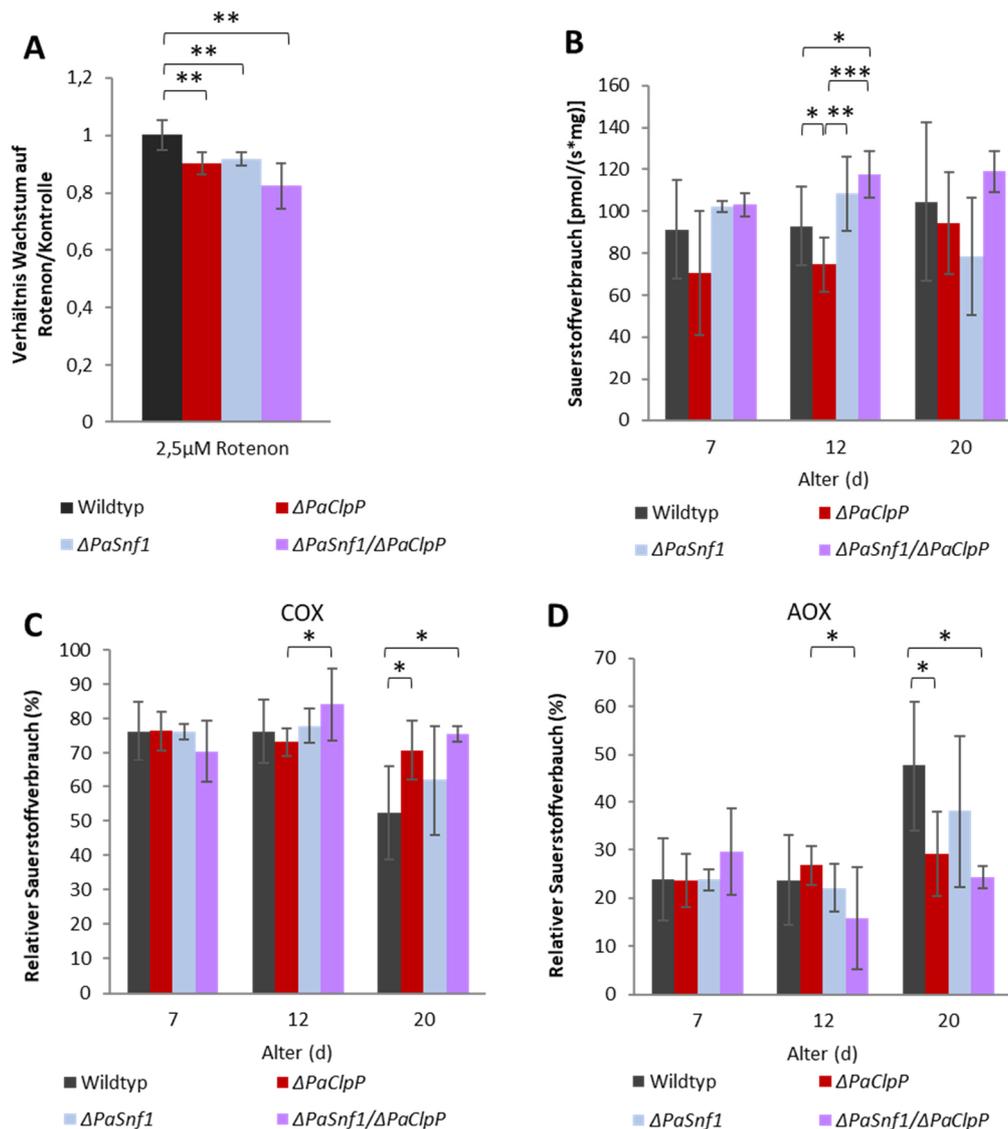


Abbildung 3.18: Mitochondriale Atmung in $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

(A) Wuchsexperimente von Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaClpP$ -Stämmen (je n=5) auf M2-Medium mit 2,5 µM Rotenon. Die Stämme wurden für 5 Tage bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Angegeben ist das Verhältnis des Wachstums auf Rotenon-haltigem Medium und der Kontrolle ohne Rotenon. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler. **(B-D)** Atmungsmessungen mit Myzel von monokaryotischen 7, 12 und 20 Tage alten Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaClpP$ -Nachkommen. Die Kulturen wurden auf M2-Platten zum Altern angezogen und vor der Messung für 3 Tage in CM-Flüssigmedium inkubiert. **(B)** Sauerstoffverbrauch in pmol/(s*mg) (Wildtyp: 7d n=14, 12d n=13, 20d n=8; $\Delta PaSnf1$: 7d n=3, 12d n=4, 20d n=3; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 7d n=4, 12d n=4, 20d n=3; $\Delta PaClpP$: 7d n=6, 12d n=6, 20d n=6). **(C)** Relativer Sauerstoffverbrauch in % über den Komplex IV (COX). Hierfür wurde der Sauerstoffverbrauch nach der Inhibierung der alternativen Oxidase (AOX) mit Salicylhydroxamsäure (SHAM) gemessen (Wildtyp: 7d n=14, 12d n=11, 20d n=8; $\Delta PaSnf1$: 7d n=3, 12d n=3, 20d n=3; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 7d n=4, 12d n=4, 20d n=3; $\Delta PaClpP$: 7d n=6, 12d n=6, 20d n=6). **(D)** Relativer Sauerstoffverbrauch in % über die AOX. Hierfür wurde der Sauerstoffverbrauch nach der Inhibierung der COX mit Kaliumcyanid (KCN) gemessen (Wildtyp: 7d n=14, 12d n=11, 20d n=8; $\Delta PaSnf1$: 7d n=3, 12d n=3, 20d n=3; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 7d n=4, 12d n=4, 20d n=3; $\Delta PaClpP$: 7d n=6, 12d n=6, 20d n=6). **(C,D)** Zur Bestimmung des relativen Sauerstoffverbrauchs nach der Zugabe der spezifischen Inhibitoren, wurde der Sauerstoffverbrauch der Stämme nach der Zugabe von SHAM (C) oder KCN (D) auf den absoluten Gesamtsauerstoffverbrauch ohne Inhibitoren normalisiert. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte ± Standardabweichung. Alle p-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t-test“ ermittelt (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ***: p < 0,001).

Die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante weist in allen drei Altersstadien eine leichte Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs auf (Abb. 3.18 B), doch nur in 12 Tage alten Kulturen ist dieser Anstieg auch signifikant im Vergleich zum Wildtyp. Wenn die Atmung über Komplex IV (COX) oder die Alternative Oxidase (AOX) betrachtet wird (Abb. 3.18 C,D), kann beobachtet werden, dass der Wildtyp im jungen Alter, mit 7 und 12 Tagen, überwiegend über die COX atmet. Mit 20 Tagen ist diese Atmung allerdings verringert, dafür steigt die Atmung über die AOX an (Abb. 3.18 C,D).

Alternative Oxidasen (AOX) kommen in verschiedenen Organismen vor, unter anderem auch in Pflanzen und Pilzen (Huq und Palmer, 1978; Lambowitz *et al.*, 1989; Lorin *et al.*, 2001; Sellem *et al.*, 2009). Bei der Atmung über die AOX, wird nur der Komplex I der Elektronentransportkette benötigt und die Elektronen direkt auf die AOX übertragen (Moore und Siedow, 1991). Wenn die Atmung über die Atmungskette gestört ist, oder aber der mitochondriale Stress durch ROS zu groß ist, kann die Atmung über die AOX induziert werden (Borghouts *et al.*, 2001). Hierbei wird zwar weniger ROS, dafür aber auch weniger ATP generiert (Wagner und Moore, 1997; Scheckhuber *et al.*, 2011a). Mit zunehmendem Alter, nimmt die ROS-Entstehung und dadurch auch die durch ROS verursachten Schäden in den Mitochondrien zu (Borghouts *et al.*, 2001). Aufgrund dessen wird im Alter vermehrt über die Eisen-abhängige AOX geatmet und weniger über den Kupfer-abhängigen Komplex IV (COX) und den Komplex III (Scheckhuber *et al.*, 2011a).

Ein ähnliches Verhalten bei der Atmung zeigt auch die $PaSnf1$ -Deletionsmutante wobei der Anstieg der Atmung über die AOX bei 20 Tage alten Kulturen nicht so stark ausgeprägt ist wie bei dem Wildtyp. Dies könnte allerdings auch an der verlängerten Lebensspanne von $\Delta PaSnf1$ liegen, sodass der Stamm biologisch jünger ist wie der Wildtyp mit gleichem chronologischem Alter. Möglicherweise würde die Atmung über die AOX nach ein paar Tagen weiterer Inkubation noch ansteigen.

Die Atmung von $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ ähneln sich in Bezug auf die COX- und die AOX-Atmung. Beide Stämme zeigen auch mit 20 Tagen noch eine Atmung, welche überwiegend über die COX abläuft und die Atmung der AOX bleibt über die drei Altersstadien weitestgehend gleich (Abb. 3.18 C,D). Nur in 12 Tage alten Kulturen ist die Atmung von $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ über die COX signifikant höher und die Atmung über die AOX signifikant niedriger im Vergleich zu $\Delta PaClpP$. In 20 Tage alten Kulturen ist dieser Unterschied nicht mehr zu erkennen. Die vermehrte Atmung über die COX in diesen beiden Stämmen könnte auch mit den Unterschieden im biologischen und chronologischen Alter erklärt werden.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Atmung über Komplex I für alle drei Deletionsmutanten wichtig ist, da eine Inhibierung des Komplexes durch Rotenon zu einem schlechteren Wachstums führt. Zudem ist die Atmung aller Deletionsmutanten über die AOX im Vergleich zum Wildtyp niedriger, was darauf schließen lässt, dass die Deletionsmutanten vermehrt über die normale Elektronentransportkette, also über die COX, atmen. Außerdem zeigt der Sauerstoffverbrauch von $\Delta PaClpP$, dass die Mitochondrien-Funktion durch das Fehlen von PaCLPP verändert zu sein scheint.

3.4.7.1 Funktionalität der Mitochondrien und Auswirkungen von mitochondrialem Stress auf die $\Delta PaClpP$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme

Um die Funktionalität der Mitochondrien in den analysierten Stämmen genauer zu untersuchen, wurde im nächsten Schritt eine Lebensspannen-Analyse auf einem Medium durchgeführt, welches eine Kohlenstoff-Quelle beinhaltet, die nicht fermentierbar ist, also die nicht über die Glykolyse verarbeitet werden kann, sodass die Stämme auf die mitochondriale Atmung angewiesen sind. Es wurde M2-Medium gewählt, welches Glycerin anstatt Dextrin enthält (M2-Glycerin).

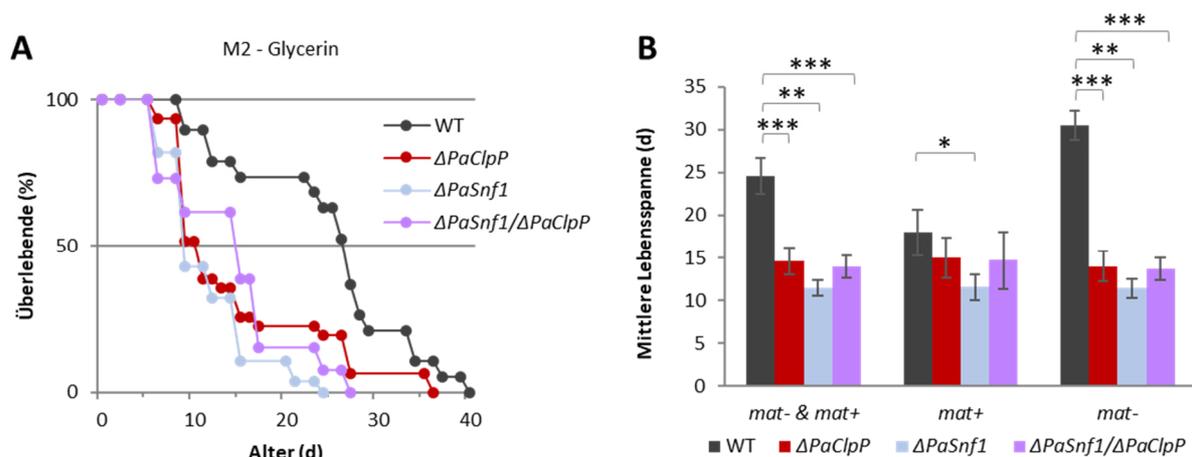


Abbildung 3.19: Die $PaSnf1$ -, $PaClpP$ - und $PaSnf1/PaClpP$ -Deletionsstämme zeigen reduziertes Wachstum auf M2-Glycerin.

(A) Lebensspannen-Analyse von monokaryotischen Wildtyp- ($n=19$), $\Delta PaSnf1$ - ($n=28$), $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ - ($n=26$) und $\Delta PaClpP$ -Nachkommen ($n=31$) auf Platten mit M2-Medium mit Glycerin anstelle von Dextrin (M2-Glycerin) bei 27 °C und Dauerlicht. **(B)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) in Tage (d) \pm Standardfehler. (B, links) beide Paarungstypen zusammengenommen (mat^- & mat^+): Wildtyp: 25 d \pm 2,1; $\Delta PaSnf1$: 11 d \pm 0,9 ($p < 0,0001$); $\Delta PaClpP$: 15 d \pm 1,6 ($p=0,0003$); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 14 d \pm 1,3 ($p < 0,0001$). (B, Mitte) alle Kulturen mit dem Paarungstyp „+“ (mat^+): Wildtyp: 18 d \pm 1,7; $\Delta PaSnf1$: 12 d \pm 1,6 ($p=0,0378$); $\Delta PaClpP$: 15 d \pm 2,4 ($p=0,4458$); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 15 d \pm 3,4 ($p=0,4527$). (B, rechts) alle Kulturen mit dem Paarungstyp „-“ (mat^-): Wildtyp: 31 d \pm 1,7; $\Delta PaSnf1$: 11 d \pm 1,1 ($p < 0,0001$); $\Delta PaClpP$: 14 d \pm 1,8 ($p < 0,0001$); $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$: 14 d \pm 1,4 ($p < 0,0001$). Alle p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student's t -test“ ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Die angegebenen p -Werte beziehen sich auf den Wildtyp. Modifiziert nach Heinz *et al.* (2021).

Wie in Abbildung 3.19 zu erkennen ist, weisen alle drei Deletionsstämme eine stark verkürzte Lebensspanne auf. Dies zeigt, dass alle drei Mutanten eine stark beeinträchtigte Mitochondrien-Funktion aufweisen. Die mittlere Lebensspanne des Wildtyps liegt bei ca. 25 Tagen, wobei auffällig ist, dass der Wildtyp starke Paarungstyp-abhängige Unterschiede in der Lebensspanne zeigt (Abb. 3.19 B). Hierbei sind die Wildtyp-Stämme mit dem Paarungstyp „ mat^- “ sehr viel langlebiger, als die Wildtyp-Stämme mit dem Paarungstyp „ mat^+ “. Bei den Deletionsmutanten ist dieses Phänomen nicht zu beobachten. Dies zeigt, dass das $mp1-1$ -Allel, welches mit dem Paarungstyp „ mat^- “ gekoppelt ist, einen positiven Effekt ausübt, wenn die Stämme auf die mitochondriale Funktion angewiesen sind. Hingegen scheint das Allel $rmp1-2$ unter diesen Bedingungen eher schädlich zu sein.

Da die bisherigen Versuche eine veränderte und vor allem beeinträchtigte Funktionalität der Mitochondrien in den Deletionsmutanten zeigt, sollte als nächstes untersucht werden, ob möglicherweise durch Deletion der beiden Gene eine positive Adaption mitochondrialer Funktionen induziert wird, was auch als Mitohormesis bezeichnet wird. Mitohormesis für die Lebensspannenverlängerung von $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1$ verantwortlich ist.

Als Hormesis wird der positive Effekt geringer Mengen einer ansonsten schädlichen Substanz bezeichnet (Calabrese, 2002; Rattan, 2008). Unter Mitohormesis ist der positive Effekt von leichtem mitochondrialem Stress zu verstehen (Tapia, 2006). Hierbei spielt die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wichtige Rolle (Harman, 1956). Es konnte gezeigt werden, dass leichter mitochondrialer Stress zu einer erhöhten Stress-Resistenz und zur Langlebigkeit führt (Masoro, 1998; Sharma *et al.*, 2011). Allerdings ist auch bekannt, dass die Senkung von ROS, bei *P. anserina* z. B. durch die vermehrte Atmung über die AOX (Stumpferl *et al.*, 2004), ebenso einen positiven Effekt auf die Lebensspanne ausüben kann. Dies zeigt, dass das Prinzip der Hormesis ein sensibler Prozess ist.

Um den Effekt von Mitohormesis auf den Wildtyp, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1$ zu ermitteln, wurden Lebensspannen-Analysen auf M2-Medium durchgeführt, welchem zusätzlich Paraquat hinzugegeben wurde. Durch die Zugabe von Paraquat wird der oxidative Stress erhöht (McCarthy *et al.*, 2004). Hierbei wird Paraquat überwiegend an Komplex I reduziert, wodurch Paraquat-Radikalkationen entstehen, die unter der Entstehung von Superoxid mit Sauerstoff reagieren (Cochemé und Murphy, 2008).

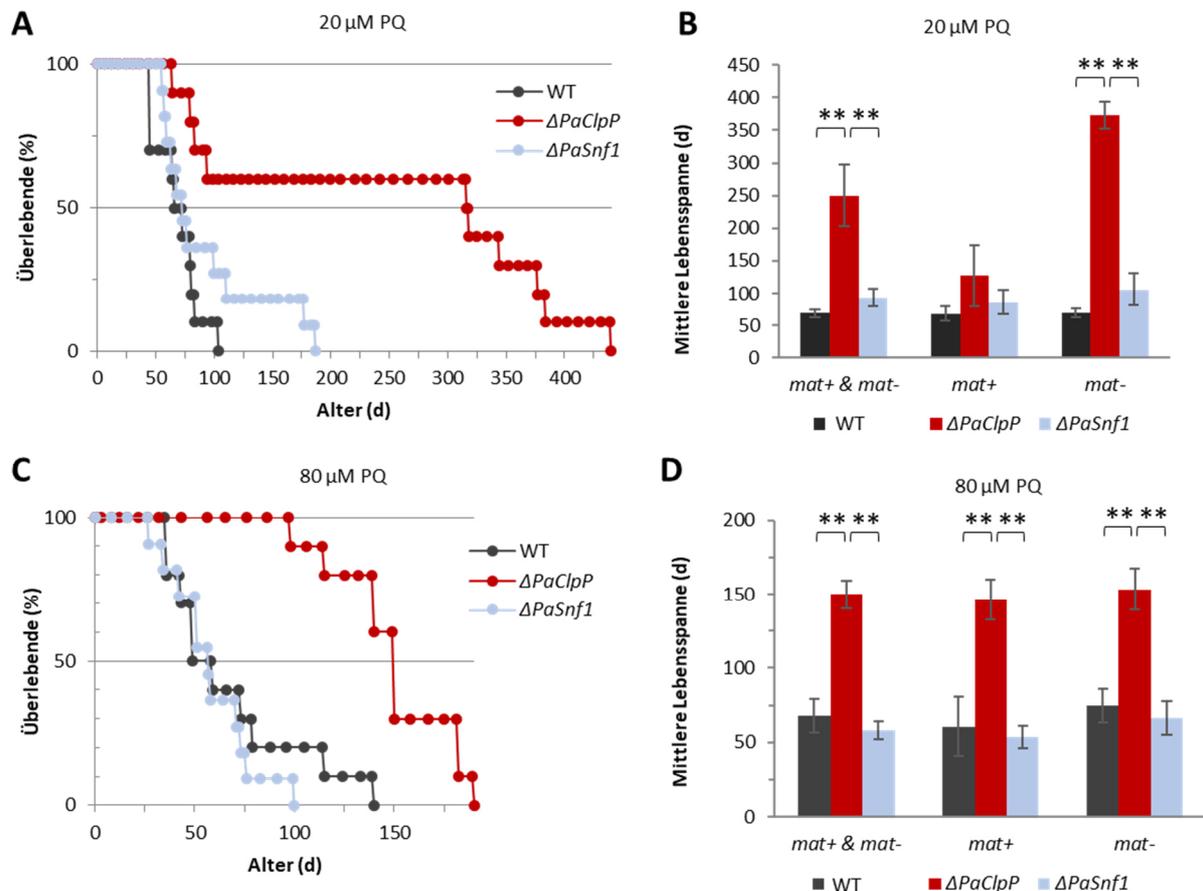


Abbildung 3.20: Paraquat-induzierter oxidativer Stress führt zu einer Lebensspannen Verlängerung. (A,C) Lebensspannen-Analyse von monokaryotischen Wildtyp- (n=10), $\Delta PaSnf1$ - (n=11) und $\Delta PaClpP$ -Nachkommen (n=10) auf Platten mit M2-Medium mit 20 µM (A) oder mit 80 µM (C) Paraquat (PQ) bei 27 °C und

Dauerlicht. **(B)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (A) in Tage (d) mit zugehörigem Standardfehler. (B, links) beide Paarungstypen zusammengenommen (*mat-* & *mat+*): Wildtyp: 68 d ± 6,2; $\Delta PaSnf1$: 93 d ± 14,2 ($p=0,1383$); $\Delta PaClpP$: 250 d ± 47,6 ($p=0,0014$). (B, Mitte) alle Kulturen mit dem Paarungstyp „+“ (*mat+*): Wildtyp: 67 d ± 11,2; $\Delta PaSnf1$: 86 d ± 18,3 ($p=0,4455$); $\Delta PaClpP$: 127 d ± 47,4 ($p=0,2547$). (B, rechts) alle Kulturen mit dem Paarungstyp „-“ (*mat-*): Wildtyp: 69 d ± 6,8; $\Delta PaSnf1$: 106 d ± 24,8 ($p=0,1616$); $\Delta PaClpP$: 373 d ± 20,6 ($p < 0,0001$). **(D)** Mittlere Lebensspanne der Kulturen von (C) in Tage (d) ± Standardfehler. (D, links) „*mat-* & *mat+*“: Wildtyp: 68 d ± 11,1; $\Delta PaSnf1$: 58 d ± 6,3 ($p=0,4441$); $\Delta PaClpP$: 150 d ± 9,3 ($p < 0,0001$). (D, Mitte) „*mat+*“: Wildtyp: 61 d ± 19,9; $\Delta PaSnf1$: 53 d ± 7,6 ($p=0,7041$); $\Delta PaClpP$: 146 d ± 13,5 ($p=0,0077$). (D, rechts) „*mat-*“: Wildtyp: 75 d ± 11,3; $\Delta PaSnf1$: 67 d ± 11,3 ($p=0,6158$); $\Delta PaClpP$: 153 d ± 14,1 ($p=0,0025$). Alle p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student's t -test“ ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). Die angegebenen p -Werte beziehen sich auf den Wildtyp.

In Abbildung 3.20 ist zu erkennen, dass bei allen drei Stämmen sowohl die Behandlung mit 20 μM Paraquat (PQ), als auch die Behandlung mit 80 μM PQ zu einer Lebensspannen-Verlängerung führt, im Vergleich zu der Lebensspanne auf M2 ohne Paraquat (Abb. 3.11). Auch wenn die Ergebnisse nicht direkt miteinander verglichen werden können, da die Lebensspanne auf M2 ohne PQ in Rennrohren und die Lebensspanne mit PQ auf Platten durchgeführt wurde, kann doch eine deutliche Verlängerung der Lebensspanne beobachtet werden. Die *PaSnf1*-Deletionsmutante weist auf dem PQ-haltigem Medium bei beiden Konzentrationen eine ähnliche Lebensspanne auf wie der Wildtyp und zeigt im Vergleich zu diesem keine Langlebigkeit mehr (Abb. 3.20).

Interessanterweise zeigt die *PaClpP*-Deletionsmutante auf dem Medium mit 20 μM PQ eine ähnliche Lebensspanne, wie die *PaSnf1/PaClpP*-Deletionsmutante auf M2-Medium ohne PQ (Abb. 3.20 und Abb. 3.11). Auch der Paarungstyp-abhängige Unterschied ist bei $\Delta PaClpP$ auf Medium mit 20 μM PQ ebenso stark ausgeprägt wie bei der Doppelmutante auf M2 ohne PQ (Abb. 3.20 und Abb. 3.11). Diese Unterschiede der $\Delta PaClpP$ „*mat-*“- und „*mat+*“-Stämme sind bei einer Paraquat-Konzentration von 80 μM allerdings nicht mehr zu erkennen und auch die Lebensspannen-Verlängerung der *PaClpP*-Deletionsmutante ist nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei 20 μM PQ (Abb. 3.20 C,D). Dies kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass bei $\Delta PaClpP$ bei 80 μM PQ der Schwellenwert der Hormesis bereits überschritten ist und der oxidative Stress schädlich geworden ist. Der Wildtyp hingegen zeigt keine deutlichen Unterschiede in der Lebensspanne zwischen 20 μM und 80 μM PQ. Die *PaSnf1*-Deletionsmutante weist eine ähnliche mittlere Lebensspanne auf wie der Wildtyp, doch zeigt diese Deletionsmutante eine verkürzte maximale Lebensspanne auf M2 mit 80 μM PQ. Dies bedeutet, dass bei diesen beiden Stämmen ($\Delta PaSnf1$ und Wildtyp) der maximal positive Effekt durch Mitohormesis erreicht ist, da eine Erhöhung der Konzentration (von 20 auf 80 μM PQ) keinen zusätzlichen positiven Effekt erzielen konnte (Abb. 3.20).

Zusammengenommen zeigt die Analyse Lebensspanne auf Glycerin-haltigem M2-Medium, dass die $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme eine stark eingeschränkte Mitochondrien-Funktion aufweisen. Außerdem legen die Daten dieser vorliegenden Arbeit nahe, dass der positive Effekt des

rmp1-1-Allels mit der mitochondrialen Atmung, bzw. der mitochondrialen Funktion in Verbindung zu stehen scheint, da sowohl der Wildtyp auf Glycerin-haltigem Medium, als auch $\Delta PaClpP$ unter Paraquat-Stress, starke Paarungstyp-abhängige Unterschiede aufweisen, während auf M2-N-Medium keiner der untersuchten Stämme diesen Effekt zeigen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass das gleichzeitige Fehlen von PaCLPP und PaSNF1 in Zusammenhang mit RMP1-1 durch eine synergistische Wirkung zu einer extremen Lebensspannen-Verlängerung führt. Diese Lebensspannen-Verlängerung scheint mit einem gesteigerten mitochondrialem Stress in Verbindung zu stehen.

4. Diskussion

Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, einen genaueren Einblick in die Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease für den Energiemetabolismus in *P. anserina* zu erhalten. Frühere Untersuchungen dieser Protease zeigten überraschenderweise, dass eine Deletion von *PaClpXP* oder auch nur der proteolytischen Untereinheit *PaClpP* zu einer Verlängerung der gesunden Lebensspanne führt (Fischer *et al.*, 2013). Die Komplementation mit dem humanen Homolog konnte die hohe evolutionäre Konservierung dieser Protease zeigen (Fischer *et al.*, 2013). Erste Analysen bewiesen einen Zusammenhang zwischen der Lebensspannenverlängerung und einem erhöhten autophagischen Umsatz (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Doch wie die Autophagie im *PaClpP*-Deletionsstamm reguliert wird war noch nicht geklärt. Auch die Frage, ob die Autophagie alleine für diesen Phänotyp verantwortlich ist, oder aber ob vielleicht noch andere kompensatorische Wege eingeleitet sind, war bislang unklar. Zudem war die genaue biologische Funktion der PaCLPXP noch weitgehend ungeklärt. Um die biologische Rolle dieser Protease aufzudecken, wurde bereits eine Substratanalyse von Fischer *et al.* (2015) durchgeführt. Bei diesen Substratanalysen zeigte sich, dass PaCLPP eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus einnimmt, da viele Substrate in den Metabolismus, der Glykolyse, dem Citratzyklus oder der Elektronentransportkette involviert sind (Fischer *et al.*, 2015). Doch wie diese Substrate und Interaktionspartner durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst sind, war noch nicht geklärt. Diese Bereiche sollten durch die hier durchgeführten Untersuchungen besser beleuchtet werden und die Befunde lieferten interessante Ansätze zur biologischen Funktion dieser mitochondrialen Protease PaCLPXP.

4.1 Identifizierung von Substraten und mögliche biologische Rolle der mitochondrialen Protease PaCLPP

Die Co-Immünpräzipitation des „*Substrat-trapping-Assay*“ wurde mit einer katalytisch inaktiven Variante der humanen CLPP in *P. anserina* durchgeführt, da die katalytische Inaktivierung der PaCLPP zu einer Veränderung der Größe dieser Protease führte und eine beeinträchtigte Funktion nicht ausgeschlossen werden konnte (Fischer *et al.*, 2015). Einige Limitierungen dieser Methode zur Substrat-Identifizierung wurden bereits im Abschnitt 3.1 beschrieben (siehe S. 65-66). In dieser vorliegenden Doktorarbeit wurde daher eine zusätzliche Methode zur Identifizierung von möglichen Substraten angewandt.

Eine weitere Methode um mögliche Substrate zu identifizieren, ist die Behandlung mit Cycloheximid und eine anschließende Proteom-Analyse der Proteinextrakte. Dieses Experiment wurde in einer Kooperation mit Herrn Prof. Georg Auburger (Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie,

ZNN; Klinik für Neurologie; Experimentelle Neurologie; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) und Dr. Ilka Wittig (Funktionelle Proteomics, ZBC, Fachbereich Medizin; Universitätsklinikum Frankfurt am Main) durchgeführt. Hierbei übernahm Frau Dr. Wittig die massenspektrometrische Analyse und Auswertung, während Herr Prof. Auburger maßgeblich an der Planung und Koordination des Experimentes beteiligt war. Durch Cycloheximid wird die Proteinsynthese verhindert, so dass der natürliche Umsatz der Proteine, also der ständige Abbau und die Neusynthese verhindert wird. In der Theorie sollten daher nur die Proteine angereichert werden, die ansonsten von der PaCLPP abgebaut werden. Nur sieben der angereicherten Proteine in den Stämmen mit Cycloheximid-Behandlung konnten auch in den Proben ohne Cycloheximid-Behandlung (siehe Anhang, Tabelle 8.1) angereichert vorgefunden werden. Diese Unterschiede zwischen den Proben der Cycloheximid-Behandlung und der Kontrolle ist ein deutlicher Hinweis, dass Cycloheximid von *P. anserina* aufgenommen wurde und wirksam ist. Ansonsten hätten sich die betroffenen Proteine durch diese Behandlung nicht verändert. In Abbildung 4.1 sind die putativen Substrate schematische zusammengefasst.

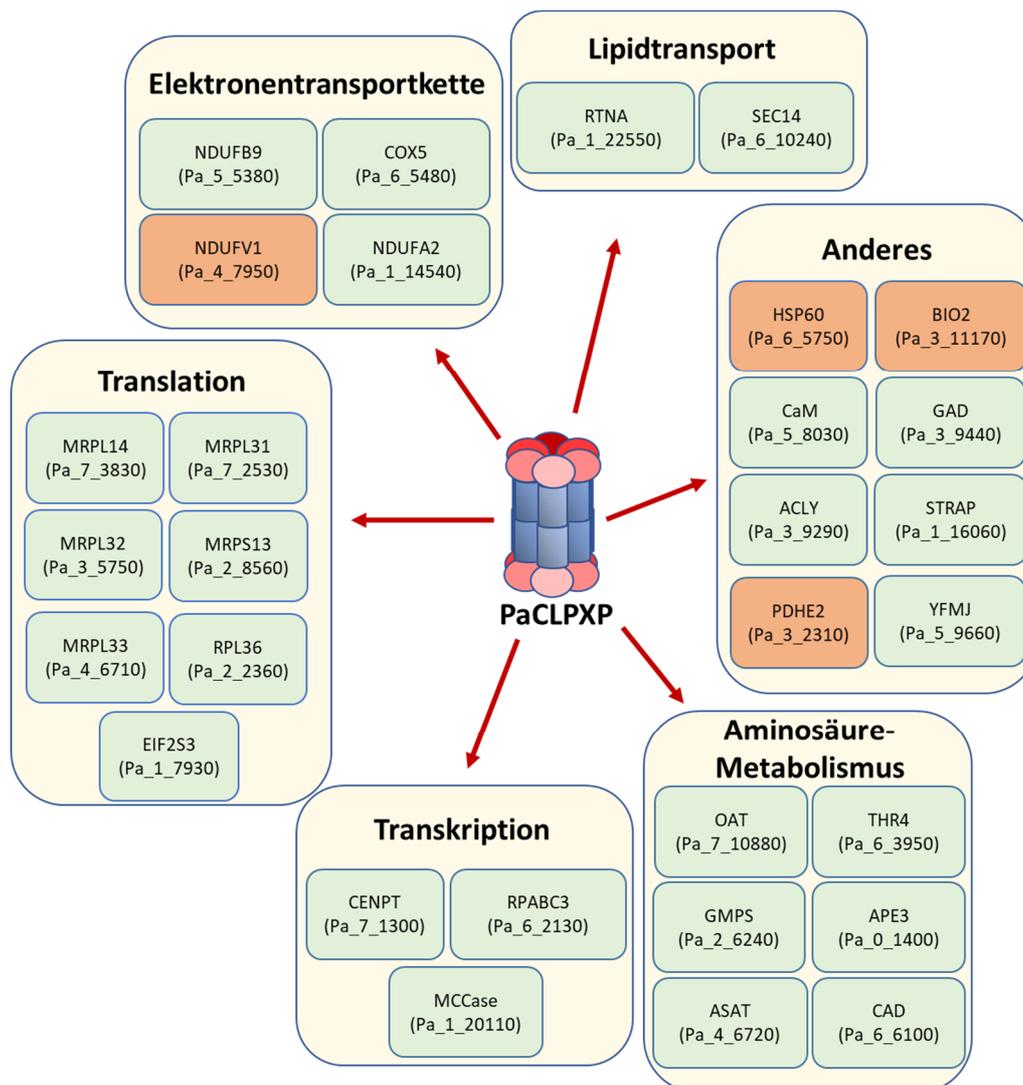


Abbildung 4.1: Übersicht aller putativen Substrate von PaCLPP.

Zusammenfassende Darstellung aller putativen PaCLPP-Substraten, die während des Cycloheximid-Assays (Tabelle 3.1 und 8.2) angereichert vorlagen. Angegeben sind die Gen-Namen und die dazugehörigen Pa_IDs. Die

verschiedenen Substrate wurden in verschiedene Kategorien und Stoffwechselwegen zusammengefasst. Substrate welche bereits von Fischer *et al.*, (2015) identifiziert wurden, wurden durch ein orangenes Kästchen gekennzeichnet. Alle anderen, neu hinzugekommenen potentiellen Substrate sind in einem grünen Kästchen dargestellt.

Bei dieser Analyse kam auffällig zum Vorschein, dass ein Retikulum-ähnliches Protein (Pa_1_22550) durch die Behandlung mit Cycloheximid um mehr als das 500-fache in $\Delta PaClpP$ angereichert war im Vergleich zum Wildtyp. Diese Proteingruppe ist im Endoplasmatischen Retikulum (ER) anzutreffen und wird dort unter anderem für die Membrankrümmungen und die Bildung von Vesikeln benötigt. Zudem konnte bereits in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass Retikulum-ähnliche Proteine auch eine wichtige Rolle im Lipidaustausch zwischen dem ER und den Mitochondrien spielen (Voss *et al.*, 2012). Auch konnte in Zellkulturen mit humanen Neuroblastom- und Melanom-Zelllinien beobachtet werden, dass zum Beispiel das Retikulum Protein-1C die mitochondriale Struktur und Funktion kontrolliert, indem es einen Einfluss auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase ausübt (Reali *et al.*, 2015). Dies deutet darauf hin, dass diese Proteingruppe auch eine wichtige Rolle für die mitochondriale Dynamik, Struktur und Funktion ausübt. Eine Hochregulation dieses Proteins könnte demnach einen verbesserten Austausch der Membranen und einen gesteigerten Vesikel-Transport zur Folge haben. Dies wiederum könnte sich positiv auf die generelle Membran-Verteilung und auf die mitochondriale Funktion auswirken. Welche genauen Auswirkungen diese extreme Hochregulation des Retikulum-ähnlichen Proteins bewirkt, kann in diesem Stadium noch nicht beurteilt werden.

Viele der nach der Cycloheximid-Behandlung angereicherten Proteine sind ribosomale Untereinheiten, bzw. Komponenten von ribosomalen Untereinheiten (Tabelle 3.1; Abb. 4.1). Auch die nächsten beiden identifizierten Proteine, die signifikant um über das 100-fache angereichert sind, sind das mitochondriale ribosomale Protein L14 (Pa_7_3830) und das mitochondriale ribosomale Protein L32 (Pa_3_5750). Dies legt nahe, dass PaCLPP auch in der Regulation der Translation eine wichtige Rolle spielt. Dabei ist unklar, ob PaCLPP die Translation über die Qualitätskontrolle oder über den geregelten Abbau der ribosomalen Untereinheiten beeinflusst. Also entweder über die Menge an funktionsfähigen Ribosomen, oder durch die Qualität der Ribosomen, durch einen schnelleren Umsatz geschädigter Komponenten. Es ist bereits bekannt, dass Ribosomen bei Nährstoffmangel abgebaut werden (Davis *et al.*, 1986). Möglicherweise ist für diese Regulation die CLP-Protease verantwortlich. Einen weiteren Hinweis auf diese Funktion liefern Ergebnisse aus *Clpp*-defizienten Mäusen (Szczepanowska *et al.*, 2016). Hier konnte gezeigt werden, dass bei Fehlen von CLPP die Menge an vollständig zusammengesetzten mitochondrialen Ribosomen abnimmt (Szczepanowska *et al.*, 2016). Auch in der Maus wurden bei einer Substratanalyse mehrere Proteine identifiziert, die an der mitochondrialen Translation beteiligt sind (Szczepanowska *et al.*, 2016). Möglicherweise könnte CLPP auch für den Austausch von bestimmten Komponenten der Ribosomen verantwortlich sein. Eine ähnliche Funktion konnte bereits für den Komplex I der Elektronentransportkette gezeigt werden

(Szczepanowska *et al.*, 2020). Durch einen derartigen Austausch könnte möglicherweise die mitochondriale Translation bei Störungen konstant aufrechterhalten werden. Auch bei einem „Substrat-trapping-Assay“ in *E. coli* konnten 6 verschiedene ribosomale Untereinheiten als mögliche Substrate von CLPP identifiziert werden (Flynn *et al.*, 2003). Des Weiteren wurden ribosomale Untereinheiten auch in *Arabidopsis thaliana* als putative Substrate identifiziert (Petereit *et al.*, 2020). Da in verschiedenen Organismen nachgewiesen werden konnte, dass CLPP eine entscheidende Rolle in der Zusammensetzung der mitochondrialen Ribosomen einnimmt, könnte dies möglicherweise auch der Grund für die Langlebigkeit in *P. anserina* darstellen. In *C. elegans* wurde nachgewiesen, dass ein Ungleichgewicht der mitochondrial- und kernkodierten Proteine in den Mitochondrien ein Mechanismus für Langlebigkeit sein kann (Houtkooper *et al.*, 2013). Da der genaue Einfluss von CLPP auf die Ribosomen jedoch noch unklar ist, kann nicht beurteilt werden, ob dies auch auf *P. anserina* zutrifft.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante mit einem gesteigerten autophagischen Umsatz in Zusammenhang steht (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Auch konnte die Langlebigkeit revertiert werden, wenn die Autophagie zum Beispiel durch die Deletion von *PaAtg1* inhibiert wird (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Auch hier könnte die Autophagie als ein Mechanismus fungieren, bei dem defekte Ribosomen oder fehlerhafte Proteine, synthetisiert von ineffizienten Ribosomen, abgebaut werden.

Insgesamt waren vier der in $\Delta PaClpP$ signifikant angereicherten Proteine auch durch das „Substrat-trapping-Assay“ von Fischer *et al.* (2015) identifiziert worden. Hierbei handelt es sich um die Biotinsynthase2 (BIO2, Pa_3_11170), ein Vorläuferprotein des Hitzeschock-Proteins 60 (HSP60, Pa_6_5750), eine Komponente der Pyruvat-Dehydrogenase E2 (PDHE2, Pa_3_2310) und einen Bestandteil der 51 kDa-Untereinheit der mitochondrialen NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NDUFV1, Pa_4_7950), des Komplex I der Elektronentransportkette. Da diese vier Proteine durch unterschiedliche Methoden getrennt voneinander als potenzielle Substrate identifiziert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass sie wirklich Substrate der PaCLPXP-Protease sind.

Frühere Untersuchungen zum Beispiel in Säugerzellen (C2C12-Maus-Myoblasten und HEK293T-Zellen) zeigten, dass CLPP an der „mitochondrial unfolded protein response“ (UPR^{mt}) beteiligt ist. Dies geschieht unter anderem durch die Regulation der *hsp60* Expression (Al-Furoukh *et al.*, 2015). Auch in anderen Organismen, wie in *C. elegans*, konnte die Rolle von CLPP an der UPR^{mt}, durch die Regulierung von HSP60, nachgewiesen werden (Haynes *et al.*, 2007). Diese Ergebnisse beweisen erneut die evolutionäre Konservierung der CLP-Proteasen. Dass HSP60 nun zum zweiten Mal als mögliches Substrat in *P. anserina* nachgewiesen werden konnte, eröffnet die Möglichkeit, dass CLPP auch in *P. anserina* an der UPR^{mt} beteiligt ist. Möglicherweise können die Zellen der *PaClpP*-Deletionsmutante den Stress durch die Akkumulation fehlgefalteter Proteine in der mitochondrialen

Matrix nicht mehr richtig wahrnehmen und die Stressantwort ist verzögert. Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen ein erhöhtes Stressniveau aufweisen und entsprechende kompensatorische Schritte einleiten. Dadurch würde der Stress in *P. anserina* möglicherweise hormetisch wirken.

Die UPR^{mt} ist nicht der einzige Mechanismus, bei dem die Wichtigkeit der CLP-Protease nachgewiesen wurde. Auch bei der Qualitätskontrolle verschiedener Proteine scheint CLPXP involviert zu sein. Hierbei ist interessant, dass NDUFV1 (Untereinheit des Komplex I der Atmungskette) zum wiederholten Mal als Substrat von PaCLPP identifiziert wurde. Auch in Menschen, Mäusen, Pilzen (*P. anserina*) und Pflanzen konnte gezeigt werden, dass CLPXP für den Austausch von Komplex I-Untereinheiten wichtig ist und damit die Funktionalität dieses Komplexes aufrechterhält (Szczepanowska *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020b; Petereit *et al.*, 2020; Szczepanowska *et al.*, 2020). In *Arabidopsis thaliana* wurde beschrieben, dass der Austausch neuer Komplex I-Untereinheiten durch den Verlust von CLPP2 (CLPP Homolog in *A. thaliana*) gestört ist (Petereit *et al.*, 2020). In Mäusen wurde währenddessen kürzlich berichtet, dass das Fehlen von CLPP für die Zelle von Vorteil sein kann, wenn der mitochondriale Stress zu hoch wird. Ist zum Beispiel die mitochondriale Translation gestört, ist das Fehlen von CLPP vorteilhaft, da so der Austausch von Komplex I-Untereinheiten langsamer vonstattengeht und die Atmungskette länger aufrechterhalten werden kann (Szczepanowska *et al.*, 2020). Diese Beobachtungen in der Maus könnten auch die Ergebnisse in *P. anserina* zum Teil erklären. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass $\Delta PaClpP$ eine schlechtere Komplex I- und Komplex II-Atmung hat (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Dennoch ist die *PaClpP*-Deletionsmutante bis zu einem gewissen Grad auf die Atmung über Komplex I angewiesen. Dies legen die Wuchsexperimente auf Rotenon-haltigem Medium nahe (Siehe Abb. 3.18 A). Auch der generell niedrigere Sauerstoffverbrauch korreliert mit dieser Hypothese (Abb. 3.18 B), da die Deletionsmutante eine beeinträchtigte Elektronentransportkette hat und aufgrund dessen weniger Sauerstoff verbraucht werden könnte. Zusätzlich zeigte die Lebensspanne auf Glycerin-haltigem Medium eine starke Beeinträchtigung der Mitochondrien-Funktion bei $\Delta PaClpP$ (Abb. 3.19), was diese Annahme ebenfalls untermauert, da durch den langsameren, bzw. fehlenden Austausch der Komplex I-Untereinheiten bei zum Beispiel Translationsproblemen, die Funktion ebendieses Komplexes beeinträchtigt ist.

Die Beteiligung an der Qualitätskontrolle von Komplex I scheint nicht die einzige Aufgabe von PaCLPXP zu sein. Ein weiterer wichtiger Hinweis auf die biologische Funktion von PaCLPP ist, dass die Protease den Energiemetabolismus, nicht nur durch die Qualitätskontrolle von Komplex I, beeinflussen, bzw. regulieren könnte. Viele potentielle Substrate von PaCLPP sind im Metabolismus wie dem Citratzyklus, der Glykolyse und anderen metabolischen Wegen zu finden (Tab. 3.1) (Fischer *et al.*, 2015). Auch in anderen Organismen, wie *E. coli* und in Säugetierzellen konnten Substrate von

CLPP identifiziert werden, welche am Energiemetabolismus beteiligt sind (Flynn *et al.*, 2003; Szczepanowska *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2020b; Petereit *et al.*, 2020).

Um einen genaueren Einblick in die Regulation der Metabolite zu erhalten, wurde eine Metabolom-Analyse durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass die meisten metabolischen Wege durch das Fehlen von PaCLPP verändert sind (Abb. 3.5). Vor allem die Metabolite des Citratzyklus, der Glykolyse, der Aminosäuresynthese und die Menge an Nukleotiden sind in der *PaClpP*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp verändert (Abb. 3.5; Abb. 4.2). Dadurch bestätigte sich, dass der Metabolismus in der *PaClpP*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtyp beeinflusst ist. Die Auswirkungen des Fehlens von PaCLPP ist bei jungen (5 Tage alten) Kulturen am stärksten ausgeprägt. Die meisten Tendenzen, also ob die Metabolite im Vergleich zum Wildtyp angereichert oder verringert sind, sind bei 20 Tagen nach wie vor zu beobachten. Diese Änderungen sind jedoch meist nicht mehr signifikant und im Vergleich zu denen, die bei den 5 Tage alten Kulturen beobachtet wurden, geringer. Dies zeigt, dass die meisten Auswirkungen auf den Metabolismus dauerhaft auftreten und nicht nur vorübergehend sind. Einige wenige Konsequenzen des Fehlens von PaCLPP verstärken sich allerdings auch im Laufe der Alterung. Zum Beispiel die Verringerung von Ornithin. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass die Ornithin-Aminotransferase, die bei der Proteom-Analyse als mögliches Substrat identifiziert wurde (Tab. 3.1), tatsächlich von PaCLPP beeinflusst bzw. reguliert wird.

Interessanterweise kann sowohl bei den ersten Metaboliten des Citratzyklus (Citrat/Isocitrat und Aconitat) als auch bei den ersten Metaboliten der Glykolyse (Hexose, Hexose-6-Phosphat und Hexose-1,6-Bisphosphat) eine signifikante Anreicherung beobachtet werden. Die Menge der darauffolgenden Metabolite bleibt anschließend entweder unverändert (α -Ketoglutarat), oder ist signifikant vermindert (2-/3-Phosphoglycerat). Wie genau die zuständigen Proteine für diese Abläufe betroffen sind, ist noch unklar. Es gibt mehrere Möglichkeiten dies zu erklären. Entweder sind die Proteine zur Metabolisierung der nachfolgenden, verminderten Intermediate in ihrer Aktivität eingeschränkt, sodass die angereicherten Proteine aufgrund eines Rückstaus in ihrer Menge verändert sind. Oder aber die Proteine, die für die Entstehung dieser Metabolite verantwortlich sind, sind aktiver und deswegen gibt es eine Anreicherung. Die Proteom-Analyse liefert hierbei keine Anhaltspunkte. Die betroffenen Proteine waren nicht unter den signifikant veränderten Komponenten anzutreffen, weder bei den angereicherten noch bei den verringerten Polypeptiden (Siehe Anhang Tab. 8.1 und 8.2). In CLPP-defizienten Muskelzellen konnte eine Verringerung der Aconitase-Aktivität um 25 % gezeigt werden (Deepa *et al.*, 2016). Initiale Aconitase 2-Aktivitätsmessungen in *P. anserina* zeigten keine solche Reduktion der Aconitase-Aktivität und eine gleichbleibende Protein-Menge (Siehe Anhang, Abb. 8.6 A-C). Allerdings gab es bei der Messung der Aktivität erhebliche Schwankungen, sodass diese Methode keine eindeutigen Ergebnisse lieferte.

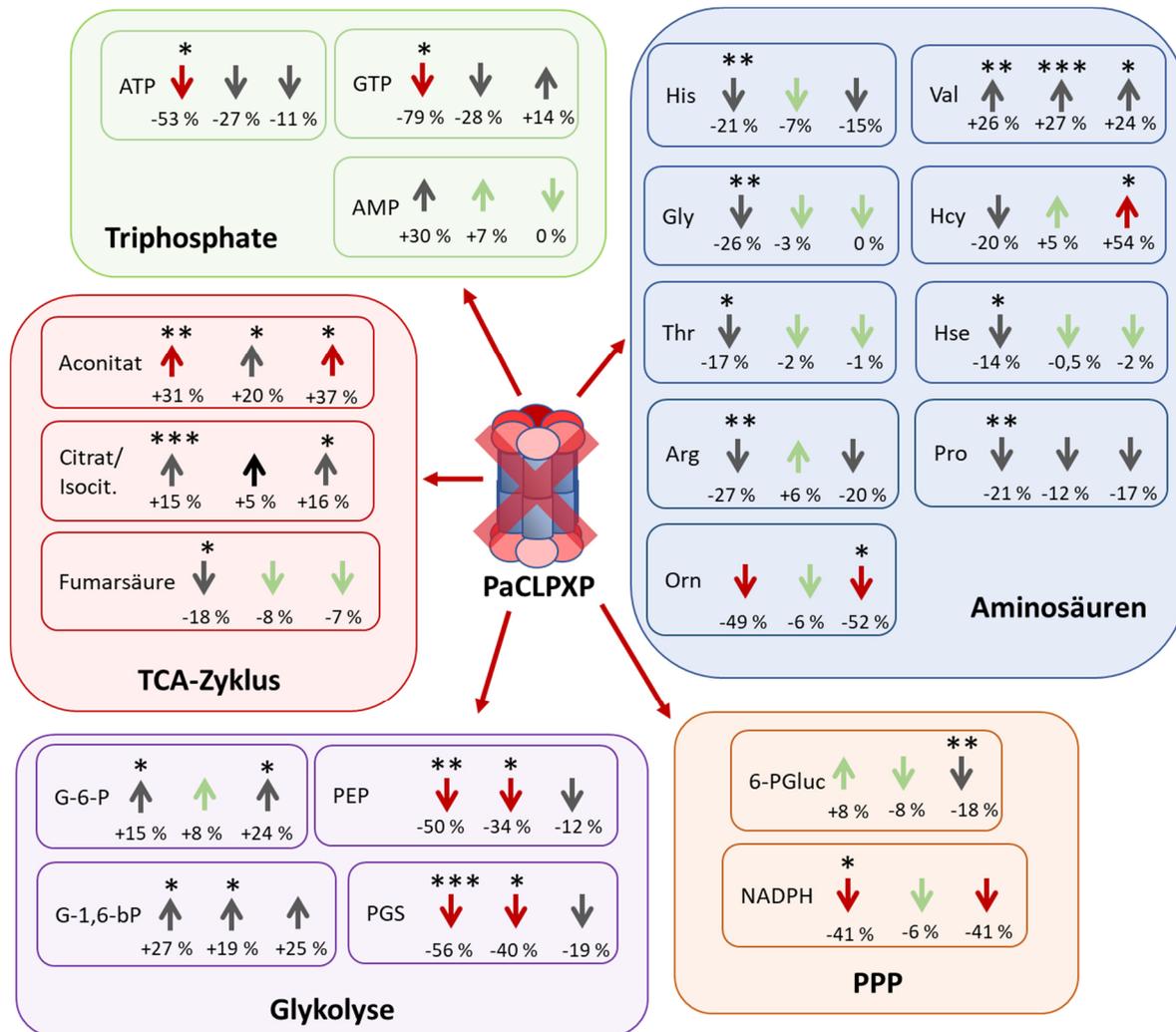


Abbildung 4.2: Übersicht aller signifikant veränderten Metabolite in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp.

Zusammenfassende Darstellung aller signifikant veränderten Metabolite in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp aller drei Altersstadien (5 Tage = linker Pfeil; 12 Tage = mittlerer Pfeil; 20 Tage = rechter Pfeil). Zur Visualisierung des AMP/ATP-Verhältnisses wurden die Tendenzen von AMP ebenfalls dargestellt, obwohl diese Veränderungen nicht signifikant sind. Verringerungen wurden mit einem nach unten gerichteten Pfeil dargestellt, Anreicherungen mit einem nach oben gerichteten Pfeil. Veränderungen von 0–10 % sind mit einem grünen Pfeil, von 10–30 % mit einem dunkel-grauen Pfeil und Veränderungen über 30 % mit einem roten Pfeil abgebildet. Signifikanzen sind jeweils über den Pfeilen angegeben. Alle *p*-Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s *t*-test“ ermittelt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Abkürzungen: ATP = Adenosintri-phosphat; AMP = Adeninmonophosphat; GTP = Guanosintri-phosphat; His = Histidin; Val = Valin; Gly = Glycin; Hcy = Homocystein; Hse = Homoserin; Thr = Threonin; Arg = Arginin; Pro = Prolin; Orn = Ornithin; Isocit. = Isocitrat; G-6-P = Glukose-6-Phosphat; G-1,6-bP = Glucose-1,6-bisphosphat; PGS = 2- oder 3-Phosphoglycerat; PEP = Phosphoenolpyruvat; 6-Pgluc = 6-Phosphogluconat; TCA-Zyklus = Tricarbonsäurezyklus (Citratzyklus); PPP = Pentosephosphatweg.

Ein interessanter Befund betrifft auch die Menge an Nukleotiden. Die größten Veränderungen werden bei den Nukleotid-Triphosphaten Guanosintri-phosphat (GTP) und ATP in 5 Tage alten $\Delta PaClpP$ -Stämmen beobachtet. Hier sind die Mengen deutlich verringert, allerdings ist nur die Verringerung von ATP signifikant (Abb. 3.5 und Abb. 4.2). Gleichzeitig ist die Menge von AMP in der Deletionsmutante erhöht. Dieses verschobene AMP/ATP-Verhältnis ist ein starkes Indiz dafür, dass zumindest in den jungen Stämmen der Deletionsmutante die AMPK aktiver sein könnte. Die Bindung von AMP oder auch

ADP an der regulatorischen γ -Untereinheit begünstigt die aktivierende Phosphorylierung der katalytischen α -Untereinheit (Ross *et al.*, 2016a). Dies könnte die erhöhte Autophagie-Rate in $\Delta PaClpP$ erklären, die von Knuppertz und Osiewacz (2017) beschrieben wurde, da die AMPK als Hauptregulator der Autophagie bei Energiestress gilt. Die Autophagie kann von der AMPK entweder direkt durch die Phosphorylierung von ATG1 reguliert werden, oder indirekt durch die Phosphorylierung anderer Kinasen, die an der Autophagie-Regulation beteiligten sind (Gwinn *et al.*, 2008; Mao und Klionsky, 2011; Holczer *et al.*, 2020).

Zusammenfassend kann demnach gesagt werden, dass sowohl die Proteom-Analyse als auch die Metabolom-Analyse und der „Substrat-trapping-Assay“ von Fischer *et al.* (2015) zeigen, dass PaCLPP einen starken Einfluss auf den Energiemetabolismus hat. Insbesondere sind die Glykolyse, der Citratzyklus und die Elektronentransportkette betroffen. Auch für die mitochondriale Translation scheint PaCLPP von Bedeutung zu sein, da bei der Proteom-Analyse viele Untereinheiten von mitochondrialen Ribosomen identifiziert werden konnten.

4.2 Relevanz der Autophagie für die Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante

Acetyl-CoA ist ein zentrales Intermediat des Energiemetabolismus. Die Signalwege zur Metabolisierung von Acetyl-CoA (Glykolyse und Citratzyklus) werden durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst. Somit ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Menge an Acetyl-CoA durch das Fehlen von CLPP verändert ist. In der Maus konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Acetyl-CoA Autophagie *induziert* (Eisenberg *et al.*, 2014; Mariño *et al.*, 2014). Bei der Metabolom-Analyse von *P. anserina* war die Messung von Acetyl-CoA nicht eindeutig. Die Mengen waren so gering, dass mehrere Messungen der Proben nötig waren, um dieses Metabolit nachzuweisen und auch dann waren die Messwerte an der Nachweisgrenze. Möglicherweise könnte ein Anstieg des Acetyl-CoA-Gehalts zur Verringerung der Autophagie führen und demnach die Lebensspanne der *PaClpP*-Deletionsmutante revertieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine gesteigerte Autophagie für die verlängerte Lebensspanne wichtig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017).

Acetyl-CoA entsteht über den Abbau von Aminosäuren, Fettsäuren und Zuckern. So auch zum Beispiel über den Abbau von verzweigt-kettigen Aminosäuren („branched-chain amino acid“) wie Leucin (Vorapreeda *et al.*, 2012) oder dem Ester der Buttersäure, Natrium-Butyrat (Leschelle *et al.*, 2000). Durch die Zugabe von Leucin zum Medium sollte der Acetyl-CoA-Spiegel angehoben und die Autophagie negativ beeinflusst werden. In Zellkulturen mit verschiedenen menschlichen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Leucin die Autophagie durch einen erhöhten Acetyl-CoA-Gehalt und dadurch durch die Acetylierung der mTORC1-Komponente RAPTOR regulieren kann (Son *et al.*, 2019; Son *et al.*, 2020). In *P. anserina* konnte die zusätzliche Behandlung mit Leucin nur in 5 Tage alten

Wildtyp-Stämmen leicht die Autophagie senken, allerdings nicht in den *PaClpP*-Deletionsstämmen. Zusätzlich führt die Zugabe dieser Aminosäure zu einer Lebensspannen-Verlängerung bei $\Delta PaClpP$ (Abb. 3.2 B). In der Metabolom-Analyse wurde gezeigt, dass in der *PaClpP*-Deletionsmutante sowohl bei 5 als auch bei 20 Tage alten Kulturen tendenziell mehr Leucin vorhanden ist als im Wildtyp desselben Alters. Möglicherweise führt dieser erhöhte Leucin-Gehalt zu einer erhöhten mTOR-Aktivität. Allerdings könnte durch das verschobene AMP/ATP-Verhältnis in $\Delta PaClpP$ diese mTOR-Aktivität durch eine aktivere AMPK inhibiert werden, sodass die Autophagie durch Leucin nicht beeinflusst wird. Es ist bereits bekannt, dass mTOR direkt von AMPK inhibiert werden kann (Bolster *et al.*, 2002; Reiter *et al.*, 2005). Eine gesteigerte AMPK-Aktivität könnte möglicherweise sogar die gesteigerte Autophagie in $\Delta PaClpP$ verursachen. Ein weiterer Erklärungsansatz wäre, dass durch das zusätzlich hinzugegebene Leucin der Acetyl-CoA-Gehalt nicht manipuliert werden kann, da Leucin eventuell für andere Synthesewege verwendet wird. Für Leucin konnte im Muskel von Säugetieren gezeigt werden, dass diese Aminosäure regulatorische Funktionen ausübt (Harper *et al.*, 1984). Eine davon ist, dass Leucin die Proteinbiosynthese anregen kann (Buse und Reid, 1975; Hong und Layman, 1984).

In Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass Butyrat als zusätzliche Energie-Quelle genutzt werden und so die Autophagie inhibieren kann (Donohoe *et al.*, 2011). Allerdings ist auch gezeigt, dass Butyrat Autophagie induzieren kann (Tang *et al.*, 2011; Lee und Lee, 2012; Pant *et al.*, 2017). Diese Autophagie-Induktion durch Natrium-Butyrat erfolgt meist durch die Inhibierung von mTOR (Tang *et al.*, 2011; Qiao *et al.*, 2020). In *P. anserina* zeigt die Zugabe von schon geringen Mengen an Natrium-Butyrat zum Medium einen negativen Effekt auf die Autophagie sowohl im Wildtyp als auch in der *PaClpP*-Deletionsmutante. Zudem führt die Zugabe von Butyrat zu einer Lebensspannenverkürzung bei beiden Stämmen. Dies ist ein erneuter Hinweis darauf, dass Autophagie für die Lebensspannenverlängerung von $\Delta PaClpP$ wichtig ist, da die Lebensspanne der Deletionsmutante schon mit 5 mM Butyrat wieder der Lebensspanne des Wildtyps ähnelt. Die bisherigen Ergebnisse zur *PaClpP*-Deletionsmutante implizieren, dass die Autophagie tatsächlich eine gewichtige Rolle für die Langlebigkeit einnimmt. Das zu Gunsten von AMP verschobene AMP/ATP-Verhältnis in $\Delta PaClpP$ legt zudem nahe, dass die AMPK involviert ist.

4.3 Bedeutung von PaSNF1 für die *PaClpP*-Deletionsmutante

4.3.1 Erstellung einer *PaSnf1*-Deletionsmutante und die Auswirkungen von PaSNF1 auf das Wachstum und die Entwicklung von *P. anserina*

Die AMPK ist ein wichtiger Regulator der Energiehomöostase und kontrolliert die wichtigsten Stoffwechselwege zur Aufrechterhaltung des Metabolismus unter verschiedenen Stresssituationen, wie Energiestress in Form eines abfallenden ATP-Gehalts. In verschiedenen Organismen konnte gezeigt werden, dass unter Energiestress die AMPK spezifische Enzyme phosphoryliert, um die ATP-Generierung zu erhöhen und den ATP-Verbrauch zu senken. Dazu inhibiert sie zum Beispiel die Lipidsynthese, die Gluconeogenese oder das Zellwachstum (Carling *et al.*, 1987; Hardie *et al.*, 1999; Mihaylova *et al.*, 2011), während ATP-generierende Abläufe wie die Fettsäure-Oxidation, Glykolyse und Autophagie unter diesen Begebenheiten von dieser Kinase induziert werden (Bando *et al.*, 2005; Egan *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2011; O'Neill *et al.*, 2014).

In *P. anserina* wurde parallel zu dieser Arbeit bereits die Rolle der PaSNF1 bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Stressantwort beschrieben (Li *et al.*, 2020). Li *et al.* (2020) beschrieben, ebenso wie in dieser vorliegenden Arbeit einen Rückgang der Wachstumsrate und der Fertilität. Li *et al.* (2020) legten den Schwerpunkt ihrer Analysen auf die Biomasse-Produktion, Stressantworten und der Regulation des Lignocelluloseabbaus und nicht auf die Bedeutung von PaSNF1 für die mitochondriale Funktion und die Alterung von *P. anserina*. In der hier vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die *PaSnf1*-Deletionsmutante zwar eine verringerte Wachstumsrate aufweist, wie auch bei Li *et al.* (2020), doch außerdem weist die *PaSnf1*-Deletionsmutante eine verlängerte Lebensspanne im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.9) auf.

Bei Li *et al.* (2020) wurde beobachtet, dass eine Kreuzung zweier *PaSnf1*-Deletionsmutanten zwar Fruchtkörper ausbilden kann, diese allerdings keine Sporen enthalten (Li *et al.*, 2020). In der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich bei der Kreuzung zweier $\Delta PaSnf1$ -Stämme mit unterschiedlichen Paarungstypen, dass $\Delta PaSnf1$ sehr wohl Sporen bilden kann, die Sporenentwicklung allerdings verzögert ist und sich die Sporenform von der Sporenform einer Kreuzung zweier Wildtypstämme unterscheidet (Abb. 3.8). Der größte Unterschied zu Li *et al.* (2020) besteht wohl in den unterschiedlichen Ausgangsstämmen dieser Analysen. Während Li *et al.* (2020) den Wildtyp-Stamm „S“ benutzten, wurde für die Analysen und für die Generierung der Deletionsmutante in dieser Arbeit jeweils der Wildtyp-Stamm „s“ (Rizet, 1953) als Ausgangsstamm verwendet. Dies sind zwei unterschiedliche Wildtyp-Stämme. Außerdem wurden für die meisten Experimente dieser Arbeit Konfrontationskreuzungen angesetzt, während bei Li *et al.* (2020) die Fruchtkörper dadurch erhalten wurden, dass die zu kreuzenden Stämme auf einer Platte angesetzt, nach dem Erreichen eines bestimmten Alters mit Wasser überschichtet und für eine festgelegte Zeit inkubiert wurden. Dieses

Verfahren ähnelt einer Spermatisierung, während zur Sporenisolation in dieser Doktorarbeit die Fruchtkörper von Konfrontationskreuzungen verwendet wurden. Diese Unterschiede scheinen einen großen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Experimente zu haben.

Ein weiterer Unterschied der Ergebnisse zwischen Li et al. (2020) und dieser Arbeit betrifft die Reaktion auf Hitzestress. Bei Li et al. (2020) wurde in *P. anserina* eine Hitze-Sensitivität beobachtet. In dieser vorliegenden Arbeit scheint dies allerdings nicht der Fall zu sein. Die *PaSnf1*-Deletionsmutante zeigt sowohl bei 32, als auch bei 35 °C eine ähnliche Lebensspanne wie der Wildtyp (Abb.3.12), ist demnach nicht sensitiver gegenüber Hitzestress. Auch die *PaClpP*-Deletionsmutante ist bei 32 °C noch immer langlebiger, und bei 35 °C weist sie eine ähnliche Lebensspanne auf wie der Wildtyp-Kontrollstamm. Nur die *PaSnf1/PaClpP*-Doppelmutante ist bei 35 °C kurzlebiger als der Wildtyp-Stamm. In *Pestalotiopsis microspora* wurde ebenfalls beschrieben, dass dieser filamentöse Pilz (*P. microspora*) sensitiv gegenüber Hitzestress wird, wenn PmSNF1 fehlt, da AMPK auch in der Zellwandbiosynthese eine wichtige Rolle spielt und der Pilz durch Schäden in der Zellwand anfälliger gegenüber Hitzestress wird (Wang et al., 2018). Die Unterschiede der Effekte von höheren Temperaturen auf die unterschiedlichen *Snf1*-Deletionsmutanten in *P. anserina* (oder auch in *P. microspora*) könnten dadurch erklärt werden, dass die *P. anserina*-Stämme in dieser vorliegenden Arbeit bis auf die ersten 4 Tage der Anzucht (2 Tage Keimung auf BMM mit Ammonium-Acetat und 2 Tage zum Anwachsen auf M2-Medium im Rennrohr) konstant auf der höheren Temperatur inkubiert wurden, während bei Li et al. (2020) die *PaSnf1*-Deletionsmutante nur für 2 Stunden bei 45 °C inkubiert und anschließend für weitere drei Tage bei 27 °C angezogen wurden. Auch bei dem *P. microspora*-Stamm wurde die Deletionsmutante nur für 2 Stunden dem Hitzestress ausgesetzt und anschließend wieder bei der für diesen Pilz optimalen Temperatur inkubiert wurden (Wang et al., 2018). Der Phänotyp der *PaClpP*-Deletionsmutante unterscheidet sich nicht von früheren Ergebnissen. Auch in früheren Arbeiten konnte beobachtet werden, dass die *PaClpP*-Deletionsmutante bei Hitzestress nicht mehr langlebig ist (Fischer et al., 2013; Fischer, 2015).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das Fehlen von PaSNF1 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle einen negativen Einfluss auf die Autophagie in jungen Stämmen hat. Allerdings scheint PaSNF1 nicht wichtig für den Anstieg des autophagischen Flusses während des Alterns zu sein (Abb. 3.14). Eine $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Doppelmutante weist eine ähnliche Lebensspanne wie die *PaSnf1*-Deletionsmutante auf, was bedeutet, dass die Lebensspannenverlängerung von $\Delta PaSnf1$ Autophagie-unabhängig ist (Abb. 3.14). Bei dieser Analyse fiel auf, dass die *PaAtg1*-Deletionsmutante eine ähnliche Lebensspanne aufweist wie der Wildtyp, obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die Deletion von *PaAtg1* zu einer verkürzten Lebensspanne führt (Knuppertz et al., 2014). In der Analyse dieser vorliegenden Arbeit wurden allerdings große, dikaryotische Sporen verwendet. Die Kulturen mussten aufgrund der Fruchtkörperbildung alle 7 Tage umgesetzt werden. In den vorherigen Arbeiten wurden

monokaryotische Nachkommen verwendet, wodurch die Stämme in Rennrohren angezogen werden konnten. All diese Unterschiede können einen Einfluss auf das Ergebnis der Lebensspanne ausüben. Außerdem wurden die Sporen der *PaAtg1*-Deletionmutante nach ihrer Phleomycin-Resistenz, der Unfähigkeit der Fruchtkörperbildung und der Pigmentierung des Myzels selektiert. $\Delta PaAtg1$ bildet ein sehr viel helleres Myzel aus als der Wildtyp, auch wird weniger, bis gar kein Luftmyzel gebildet (siehe Anhang Abb. 8.7 A,D). Wenn das *PaAtg1*-Endogen vorliegt, ist das Myzel dunkel und der Stamm ist in der Lage Fruchtkörper zu bilden. Da allerdings nur die Sporen der Doppelmutante jeweils im Southern-Blot mit Hilfe einer Hybridisierungssonde gegen die Phleomycin-Resistenzkassette untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass heterokaryotische *PaAtg1*-Deletionsstämme mit einer endogenen Kopie des *PaAtg1*-Gens verwendet worden sind. Alle Stämme mit einer *PaAtg1*-Deletion konnten aufgrund der Fertilitätsprobleme nur aus einer Kreuzung mit dem Wildtyp gewonnen werden.

4.3.2 Gleichzeitige Deletion von *PaClpP* und *PaSnf1* führt zu einer extremen Lebensspannen-Verlängerung

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass PaSNF1 nicht für die Lebensspannenverlängerung der *PaClpP*-Deletionsmutante verantwortlich ist. Es scheint im Gegenteil so zu sein, dass die Lebensspanne von $\Delta PaClpP$ durch PaSNF1 begrenzt wird, da das Fehlen dieser Kinase zu einer zusätzlichen, extremen Verlängerung führt. Des Weiteren wurde beobachtet, dass diese Lebensspannenverlängerung mit dem Paarungstyp „*mat*-“ gekoppelt ist, während die Stämme mit dem Paarungstyp „*mat*+“ nur noch eine geringe Lebensspannen-Verlängerung im Vergleich zu $\Delta PaClpP$ mit demselben Paarungstyp zeigen. Bei einem genaueren Blick auf die Paarungstypen der unterschiedlichen Stämme ist aufgefallen, dass es auch erkennbare Unterschiede innerhalb der $\Delta PaClpP$ -Kulturen und der $\Delta PaSnf1$ -Kulturen gibt. Auch hier sind die Stämme mit dem Paarungstyp „*mat*+“ kurzlebiger als die Stämme mit dem Paarungstyp „*mat*-“. Dabei sind die Kulturen von $\Delta PaClpP$ auch mit dem Paarungstyp „*mat*+“ nach wie vor deutlich langlebiger als der Wildtyp. Bei $\Delta PaSfn1$ ist nur der Stamm mit dem Paarungstyp „*mat*-“ langlebig im Vergleich zum Wildtyp, während die Stämme mit dem Paarungstyp „*mat*+“ keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp des gleichen Paarungstyps aufweisen.

Diese Unterschiede zwischen den Paarungstypen innerhalb eines Stammes wurde schon früher in *P. anserina* beobachtet. Dabei gibt es Stämme, bei denen die „*mat*+“-Isolate langlebig sind und andere Stämme, bei denen die „*mat*-“-Isolate langlebig sind (Belcour *et al.*, 1991; Contamine *et al.*, 1996; Contamine *et al.*, 2004; Sellem *et al.*, 2005; Adam *et al.*, 2012). Die Paarungstyp-abhängigen Unterschiede bei den Lebensspannen wurden mit zwei unterschiedlichen Allelen von *rmp1* in Verbindung gebracht, wobei *rmp1-1* mit dem Paarungstyp-Locus „*mat*-“ und *rmp1-2* mit dem Paarungstyp-Locus „*mat*+“ vererbt wird (Contamine *et al.*, 2004). Hierbei sorgt eine natürlich

aufgetretene Mutation bei *rmp1-2* für ein vorzeitiges Stoppcodon, welches zur Folge hat, dass RMP1-2 18 Aminosäuren kürzer ist als RMP1-1 (Contamine *et al.*, 2004). Da eine Deletion von *rmp1-2* letal ist, aber dennoch bei den beiden Allelen die unterschiedlichen Phänotypen auftreten, scheint die Mutation von *rmp1-2* nicht zum vollständigen Verlust der Funktion dieses Proteins zu führen (Contamine *et al.*, 2004).

RMP1 kommt nur in filamentösen Pilzen vor, doch besitzt es eine SLS1-Domäne, was vermuten lässt, dass RMP1 eine ähnliche Funktion wie SLS1 in der Hefe ausführt. Auch SLS1 ist, wie RMP1 ein Mitochondrien-gebundenes Protein und ist in den mitochondrialen Metabolismus involviert (Rouillard *et al.*, 1996; Contamine *et al.*, 2004). Des Weiteren wird vermutet, dass das SLS1-Protein an der mitochondrialen Translation beteiligt ist, wobei unklar ist, ob SLS1 mit der Polymerase interagiert und diese in die Nähe der Translations-Maschinerie bringt, oder aber ob SLS1 mit der Translations-Maschinerie interagiert (Bryan *et al.*, 2002).

In Zusammenhang mit bestimmten Mutationen verschiedener anderer Gene scheint es von Vorteil zu sein, wenn das *rmp1-2*-Allel vorliegt, wie zum Beispiel bei der Deletion von *oxa1* (Sellem *et al.*, 2005). OXA1 ist in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert und eine wichtige Komponente der Insertionsmaschinerie von Membranproteinen (Stoldt *et al.*, 2012). So ist es unter anderem für den Transport von Komplex I-Untereinheiten aus der Matrix in die innere mitochondriale Membran verantwortlich (Herrmann und Neupert, 2003; Kuhn *et al.*, 2003). Durch das Fehlen von OXA1 in *P. anserina* ist die Zusammensetzung des Komplex I der Atmungskette gestört. Die Deletionsmutante zeigt in der Folge eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Atmung (Sellem *et al.*, 2005). Wenn nun in diesem Stamm das *rmp1-2*-Allel vorliegt, kann eine geringere COX- und Komplex I -Aktivität und eine stärkere AOX-Aktivität nachgewiesen werden (Sellem *et al.*, 2005). Dies erlaubt es dem *PaOxa1*-Deletionsstamm möglicherweise das Atmungsdefizit zu kompensieren (Sellem *et al.*, 2005). Bei *P. anserina*-Stämmen mit fehlender oder funktionsloser AAA⁺ Serin-Protease LON (*PaLON1*) hingegen wurde beschrieben, dass das *rmp1-1*-Allel von Vorteil ist (Adam *et al.*, 2012). Da sowohl die CLPP- als auch die LON-Protease in verschiedenen Organismen in der mitochondrialen Qualitätskontrolle eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise ergänzende Funktionen ausführen (Luce und Osiewacz, 2009; Pryde *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2021) ist es nicht überraschend, dass auch bei der *PaClpP*-Deletionsmutante das *rmp1-1*-Allel einen positiven Effekt auf die Lebensspanne dieses Stammes ausübt. Die Frage ist nun, wie es zu dieser extremen Lebensspannen-Verlängerung der *PaSnf1/PaClpP*-Doppelmutante mit dem *rmp1-1*-Allel kommt.

Da für die *PaClpP*-Deletionsmutante Autophagie eine wichtige Rolle für die Langlebigkeit spielt (Knuppertz und Osiewacz, 2017), wurde auch die Autophagie in der *PaSnf1/PaClpP*-Doppelmutante untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Autophagie in der Doppelmutante verringert ist und sie daher nicht für die Langlebigkeit verantwortlich ist (Abb. 3.14). Die Autophagie kann zwar noch ablaufen, doch ist sie in 20 Tage alten Kulturen signifikant verringert im Vergleich zum Wildtyp. Die

durch Stickstoff-Mangel induzierte Autophagie wird hingegen völlig unterdrückt, wenn PaSNF1 fehlt (Abb. 3.15).

4.3.3 PaSNF1 reguliert die mitochondriale Dynamik in *P. anserina*

Das Fehlen von PaSNF1 beeinflusst die Mitochondrien-Morphologie. Auch 20 Tage alte $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämme zeigen überwiegend filamentöse Mitochondrien, während der Wildtyp und der $\Delta PaClpP$ -Stamm überwiegend fragmentierte Mitochondrien aufweisen (Abb. 3.16). Auch in anderen Organismen wurde gezeigt, dass die AMPK an der Regulation der mitochondrialen Fusion und Fission beteiligt ist (Weir *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2020). So wurde unter anderem beobachtet, dass die AMPK in *C. elegans* die Langlebigkeit durch Kalorien-Restriktion fördert, indem sie die Aufrechterhaltung und Regulierung der mitochondrialen Netzwerkhomöostase bewerkstelligt (Weir *et al.*, 2017). Auch in Kardiomyozyten wurde ein Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Dynamik und der AMPK beschrieben (Zhang *et al.*, 2018). In diesem Fall war die mitochondriale Fusion durch die Aktivierung eines AMPK-OPA1-Signalwegs betroffen (Zhang *et al.*, 2018). Doch nicht nur eine Regulation der Fusion durch OPA1 konnte beobachtet werden, auch die Regulation der mitochondrialen Fission wurde durch die Aktivierung eines AMPK-MFF-DRP1-Signalwegs (MFF = „mitochondrial fission factor“; DRP1 = „dynamin-related protein 1“) in Menschen mit dem Myelodysplastischen Syndrom gezeigt (Zheng *et al.*, 2018).

Unter dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) wird eine Gruppe von Erkrankungen des Knochenmarks zusammengefasst, welche auf eine Stammzellstörung zurückzuführen ist (Schmitt-Graeff *et al.*, 2000). Der abnorme Stammzellklon verfügt über Differenzierungs- und Reifungsdefekte, welche die Bildung von funktionierenden Blutzellen einschränken (Heimpel und Aul, 1998). Zudem besitzen sie häufig einen Wachstumsvorteil gegenüber den anderen Zellklonen, was wiederum zur Proliferation führen könnte (Heimpel und Aul, 1998). Die betroffenen Zellen weisen sich unter anderem durch eine erhöhte Apoptoserate aus (Greenberg, 1998; Schmitt-Graeff *et al.*, 2000). Häufig entwickelt sich im Verlaufe der Krankheit bei den betroffenen Personen eine akute myeloische Leukämie (Schmalzing *et al.*, 2017).

Die Interaktion zwischen der AMPK und DRP1 wurde auch in Mäusen genauer untersucht (Wu *et al.*, 2020). Hierbei wurde eine AMPK-abhängige Phosphorylierung von DRP1 nachgewiesen, welche die Translokation von DRP1 zu den Mitochondrien inhibiert (Wu *et al.*, 2020). Auch in menschlichen USO2-Zelllinien und in embryonalen Mäuse-Fibroblasten wurde gezeigt, dass AMPK für die mitochondriale Fission durch DRP1 bei Energiestress benötigt wird (Toyama *et al.*, 2016). Möglicherweise ist die AMPK auch in *P. anserina* für die mitochondriale Fission wichtig und durch das Fehlen dieser Kinase kann erst zu spät auf die Änderungen durch die Alterung reagiert werden.

Interessanterweise war die Menge des mitochondrialen Fissions-Faktors PaDNM1 (DNM1 = Dynamin-1; Homolog von DRP1 in *P. anserina*) in *P. anserina* sowohl im Gesamtprotein von 20 Tage

alten Kulturen als auch in den mitochondrialen Proteinextrakten von Kulturen desselben Alters in allen drei Deletionsmutanten tendenziell gesteigert (Abb. 3.17). Allerdings ist es möglich, dass dies nicht mit einer höheren Aktivität dieser GTPase einhergeht. Die großen Abweichungen bei den Western-Blot-Analysen mit mitochondrialen Proteinextrakten von 20 Tage alten Kulturen könnten dadurch erklärt werden, dass DNM1 nur in der GTP-gebundenen Form an die äußere mitochondriale Membran transloziert werden kann (Mears *et al.*, 2011). Daher könnte während der Isolation der Mitochondrien PaDNM1 durch das Fehlen von GTP verloren gehen. Möglicherweise könnte durch Zugabe von GTP zu den Puffern während der Mitochondrien-Isolation die Bindung von GTP stabilisiert und die Abweichung, bzw. der Standardfehler verkleinert und die tatsächlichen, möglicherweise signifikanten Unterschiede sichtbar gemacht werden. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte und den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten hat die AMPK auch in *P. anserina* einen bedeutenden Einfluss auf die Regulation der Mitochondrien-Dynamik. Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob diese Kinase überwiegend die Fission oder Fusion reguliert. Möglicherweise reguliert sie auch beide Prozesse und sorgt so für die Adaption an sich ändernde Umweltbedingungen.

4.3.4 Das Fehlen von PaCLPP und/oder von PaSNF1 führt zu einer beeinträchtigten mitochondrialen Funktion

Für alle drei Deletionsmutanten ($\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) wurde nachgewiesen, dass die Atmung über Komplex I für das Wachstum der Stämme wichtig, aber nicht ausschlaggebend ist, da die Deletionsmutanten auf Rotenon-haltigem Medium (Komplex I-Inhibitor) zwar schlechter wachsen können als die Wildtyp-Kontrolle, aber dennoch wachsen (Abb. 3.18). In Mäusen wurde bereits beobachtet, dass die Inhibierung von Komplex I durch Rotenon den Glukose Verbrauch und die Glykolyse erhöht und die AMPK-Aktivität induziert (Hou *et al.*, 2018). Dies zeigt, dass die AMPK bei einer Inhibierung von Komplex I gebraucht wird. In menschlichen U2OS Osteosarkom-Zellen sorgt die AMPK bei der Inhibierung von Komplex I oder Komplex III für die Fragmentierung der Mitochondrien als Anpassung an den entstehenden Energiestress (Toyama *et al.*, 2016). Möglicherweise führt also das Fehlen der AMPK α -Untereinheit in *P. anserina* bei der Inhibierung des Komplex I durch Rotenon zu dieser Verschlechterung des Wachstums, da der Stamm nicht mehr in der Lage ist, sich an die Gegebenheiten anzupassen. Der Umstand, dass die Doppelmutante einen noch stärkeren Effekt zeigt als die beiden Einzelmutanten, legt nahe, dass zwei unterschiedliche Gründe für die Verminderung des Wachstums zuständig sind, da der Effekt durch das gleichzeitige Fehlen von PaSNF1 und von PaCLPP verstärkt wird.

Die Verkürzung der Lebensspanne auf M2-Medium mit Glycerin statt Dextrin als Kohlenstoffquelle zeigt, dass alle drei Deletionsmutante eine beeinträchtigte Mitochondrien-Funktion

aufweisen (Abb. 3.19). Glycerin kann nicht über die Glykolyse verstoffwechselt werden, sodass die Stämme auf die mitochondriale Funktion angewiesen sind. Auffällig ist, dass der Wildtyp auf diesem Medium starke Paarungstyp-abhängige Unterschiede aufzeigt, also unter Bedingungen, bei denen die mitochondriale Funktion und dadurch auch möglicherweise der mitochondriale Stress erhöht ist. Unter diesen Bedingungen ist, ähnlich wie bei der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$, der Wildtyp-Stamm mit dem Paarungstyp „mat-“ langlebiger als der Stamm mit dem Paarungstyp „mat+“. Trotz der starken Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion in den Deletionsmutanten ist interessanterweise nur der generelle Sauerstoffverbrauch von $\Delta PaClpP$ tendenziell niedriger als bei dem Wildtyp-Kontrollstamm. Auch frühere Studien konnten eine beeinträchtigte Funktion der Atmungskette in $\Delta PaClpP$ beweisen (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Der Sauerstoffverbrauch von $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ hingegen ist sogar tendenziell erhöht in allen drei Altersstadien. Dabei kann nur die Doppelmutante, ähnlich wie $\Delta PaClpP$, die Atmung über die COX über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten. $\Delta PaSnf1$ zeigt eine ähnliche Atmung über die COX und AOX wie die Wildtyp-Kontrolle (Abb. 3.18).

Diese Befunde zeigen, dass unter mitochondrialem Stress, bzw. unter Bedingungen, bei denen der Stamm auf die mitochondriale Funktion angewiesen ist, das *rmp1-1*-Allel für einen positiven Effekt auf die Lebensspanne und das Wachstum von *P. anserina* verantwortlich ist. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Lebensspannen-Analysen auf M2-Medium mit 20 oder 80 μM Paraquat durchgeführt. Hierdurch sollte der mitochondriale Stress erhöht werden. Alle analysierten Stämme zeigen im Vergleich zu normalem M2-Medium eine Lebensspannen-Verlängerung, doch nur bei $\Delta PaClpP$ ist ein Paarungstyp-abhängiger Unterschied bei 20 μM Paraquat zu beobachten (Abb. 3.20). Auch hier ist der Stamm mit *rmp1-1* langlebiger als der Stamm mit *rmp1-2*. Dieser Effekt ist bei 80 μM Paraquat bereits nicht mehr zu sehen. Dies lässt darauf schließen, dass die positiven Effekte von *rmp1-1* nur bei leichtem mitochondrialen Stress zu beobachten sind. Dass weder der Wildtyp noch $\Delta PaSnf1$ solche Unterschiede aufweisen, könnte daran liegen, dass $\Delta PaClpP$ auch ohne Paraquat einem stärkeren mitochondrialen Stress ausgesetzt ist als der Wildtyp oder $\Delta PaSnf1$. Ein Hinweis darauf ist der reduzierte Sauerstoffverbrauch von $\Delta PaClpXP$ über die Atmungsketten-Komplexe (Knuppertz und Osiewacz, 2017). Auch die erhöhte Autophagie der *PaClpP*-Deletionsmutante könnte dadurch erklärt werden, da frühere Studien zeigten, dass mitochondrialer Stress zu einer Induktion der Autophagie führt (Kramer *et al.*, 2016). Dass die Paarungstyp-abhängigen Unterschiede bei 80 μM Paraquat nicht mehr auftreten, könnte daran liegen, dass bei dieser Konzentration der mitochondriale Stress möglicherweise bereits zu stark ist, als dass *rmp1-1* noch einen positiven Effekt ausüben könnte.

4.4 Das Fehlen von PaCLPP und PaSNF1 sorgt zusammen mit RMP1-1 durch eine synergistische Wirkung für eine extreme Lebensspannen-Verlängerung

Die Erkenntnisse dieser Arbeit laufen darauf hinaus, dass die extreme Lebensspannen-Verlängerung von $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ durch ein Zusammenspiel mit RMP1-1 bewerkstelligt wird. RMP1 besitzt eine SLS1-Domäne, welche bereits in der Hefe beschrieben wurde. Das SLS1-Protein in der Hefe ist an der Translationsmaschinerie beteiligt (Bryan *et al.*, 2002). Möglicherweise nimmt die AMPK in $\Delta PaClpP$ die eingeschränkte mitochondriale Funktion durch den Abfall des ATP-Gehalts wahr. Durch eine Verstärkung der mitochondrialen Tätigkeit könnte sie dem entgegensteuern, was wiederum zu einem noch stärkeren mitochondrialen Stress führt. Dieser Stress könnte in Folge dessen zu stark werden, als dass RMP1-1 einen positiven Effekt auf die Lebensspanne ausüben könnte. Wenn nun zusätzlich PaSNF1 fehlt, würde eben dieser Stress minimiert werden. Auch wenn der Abfall des Energiestatus wahrscheinlich verstärkt wird, führt möglicherweise die gleichzeitige Deletion von $PaClpP$ und $PaSnf1$ zu einer Entlastung der Mitochondrien, sodass RMP1-1 durch eine bessere Translation zu diesem positiven Effekt auf die Lebensspanne der Doppelmutante führt. In Tabelle 4.1 sind die möglichen Auswirkungen der Deletionen und der unterschiedlichen *rmp1*-Allele auf die mitochondriale Translation, auf den mitochondrialen Stress und die Lebensspanne zusammengefasst.

Tabelle 4.1: Übersicht der möglichen Auswirkungen der $PaClpP$ -, $PaSnf1$ -Deletionen und den unterschiedlichen *rmp1*-Allelen. Zusammengefasst sind die möglichen Auswirkungen auf die mitochondriale Translation, auf den mitochondrialen Stress und die Lebensspanne mit dem *rmp1-1*- oder dem *rmp1-2*-Allel unter Standard-Bedingungen (auf M2-Festmedium bei 27 °C und Dauerlicht). Die Angaben zur mitochondrialen Translation und dem mitochondrialen Stress sind spekulativ, während die Lebensspanne und die Wachsrates den Daten entnommen wurden (Abb. 3.10, 3.11 und Anhang Abb. 8.3) Ein „+“ bedeutet eine Verbesserung im Vergleich zum Wildtyp, ein „-“ eine Verschlechterung. Bei „+/-“ ist die Situation Wildtyp-ähnlich. Die extreme Lebensspannen-Verlängerung von $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ mit dem *rmp1-1*-Allel wurde mit einem dreifachen „+“ („+++“) dargestellt, die starke Lebensspannen-Verlängerung von $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp mit einem doppelten „+“ („++“).

<i>rmp1</i> -Allel		$\Delta PaClpP$	$\Delta PaSnf1$	$\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$
<i>rmp1-1</i>	Mitochondriale Translation	-	+	+
	Mitochondrialer Stress	+	-	+/-
	Wachsrates	+/-	-	-
	Lebensspanne	++	+	+++
<i>rmp1-2</i>	Mitochondriale Translation	-	+/-	+/-
	Mitochondrialer Stress	+	-	+
	Wachsrates	+/-	-	-
	Lebensspanne	++	+/-	++

In Mäusen konnte bereits beobachtet werden, dass die Deletion von *ClpP* zu einem langsameren Austausch der Komplex I-Untereinheiten führt (Szczepanowska *et al.*, 2020). Dies wiederum steht in Zusammenhang mit einer langsameren mitochondrialen Translation durch den Verlust von CLPP, wobei dieser Effekt auf eine verzögerte Reifung der mitochondrialen Ribosomen zurückzuführen ist (Szczepanowska *et al.*, 2020). Dieser verlangsamte Austausch der Komplex I-Untereinheiten kann unter bestimmten Bedingungen von Vorteil sein, zum Beispiel bei erhöhtem mitochondrialen Stress, da Komplex I in seiner Funktion zwar eingeschränkt, aber dennoch funktionsfähig ist. Auch in anderen Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Verlust von CLPP bei hohem mitochondrialen proteostatischen Stress von Vorteil sein kann (Seiferling *et al.*, 2016). Unter diesen Bedingungen entwickeln die Tiere eine hochprogressive Kardiomyopathie aufgrund einer schweren Dysregulation der mitochondrialen Proteinsynthese. Doch durch das Fehlen von CLPP kann die mitochondriale Proteinsynthese teilweise wiederhergestellt werden (Seiferling *et al.*, 2016). Dies deutet tatsächlich auf einen erhöhten mitochondrialen Stress in CLPP-defizienten Zellen hin, welcher allerdings durch das Fehlen von CLPP zum Vorteil für den Organismus wird, da die mitochondriale Translation zwar langsamer, aber dafür genauer vonstattengehen kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Lebensspannen-Verlängerung von $\Delta PaClpP$ durch einen erhöhten mitochondrialen Stress verursacht wird. Dieser Stress würde demnach durch Hormesis einen positiven Effekt auf die *PaClpP*-Deletionsmutante ausüben. Auch die erhöhte Autophagie-Rate in dieser Mutante könnte durch diesen erhöhten mitochondrialen Stress erklärt werden. Hierbei begrenzt die Anwesenheit von PaSNF1 das Potential dieser Lebensspannen-Verlängerung durch eine zusätzliche Steigerung dieses mitochondrialen Stresses. Durch die gleichzeitige Deletion von *PaClpP* und *PaSnf1* und durch die Anwesenheit von RMP1-1, welches für eine bessere, bzw. effizientere Translationsmaschinerie in den Mitochondrien sorgt, wird die Lebensspanne dieser Doppelmutante extrem verlängert im Vergleich zu den *P. anserina* Wildtyp- und den jeweiligen *PaClpP*- und *PaSnf1*-Deletionsstämmen.

5. Ausblick

In dieser vorliegenden Arbeit konnten eine Reihe neuer Einblicke in die biologische Rolle von PaCLPXP erhalten werden und neue Erkenntnisse in der Regulierung der Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante aufgedeckt werden. Es bleiben aber eine Reihe von Fragen ungeklärt und bieten weitere interessante Perspektiven und Forschungsansätze.

Das Retikulum-ähnliche Protein beispielsweise, das bei der Proteom-Analyse mit Cycloheximid behandelten Stämmen in $\Delta PaClpP$ extrem angereichert (um das 500-fache) vorliegt, lässt weitere Fragen offen. So wäre zum Beispiel interessant, ob eine veränderte Lipid-Verteilung in der *PaClpP*-Deletionsmutante vorliegt, und wie diese Umverteilung die Mitochondrien-Funktion beeinflusst. Oder ob der Vesikel-Transport in dieser Deletionsmutante verändert ist und welche Auswirkungen diese Änderungen auch auf andere Komponenten der Zelle haben.

Ebenso konnte noch nicht gänzlich geklärt werden, wie genau der Energiemetabolismus durch das Fehlen von PaCLPP beeinflusst ist. Hierzu wären nähere Analysen der potentiellen Substrate der betroffenen Wege unumgänglich.

Interessant wäre es auch zu erforschen ob, bzw. wie PaCLPP die mitochondriale Translation beeinflusst und ob diese Beeinflussung der Schlüsselfaktor ist, an dem RMP1-1 ansetzt und einen positiven Effekt auf die Lebensspanne ausübt wenn PaCLPP fehlt. Oder ob $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ ein Problem mit den Komplexen der Atmungskette haben und der Einfluss von RMP1-1 sich auf die Stabilität dieser Komplexe bezieht. Im Allgemeinen bietet dieser ausgeprägte Effekt von RMP1-1 auf $\Delta PaClpP$ und auf die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante ein ganz neues Feld an Möglichkeiten. Interessant wäre zum Beispiel, welchen Einfluss RMP1-1 auch auf andere Mutanten mit einer veränderten mitochondrialen Funktion hat. Hängt dieser positive Effekt auf die Lebensspanne tatsächlich mit einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion zusammen, oder spielen andere Faktoren, wie zum Beispiel tatsächlich die mitochondriale Translation eine übergeordnete Rolle?

Da Autophagie für die $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante keine allzu große Rolle für die Langlebigkeit spielt, wäre es interessant, in wie weit PaSNF1 die Autophagie in *P. anserina* reguliert und wie wichtig diese Regulation für das Wachstum und die Entwicklung des Stammes ist. Hierfür könnten zum Beispiel die konservierten Phosphorylierungsstellen von PaATG1 durch Punktmutationen deletiert werden, sodass die AMPK zwar noch voll funktionsfähig vorliegt, aber PaATG1 von PaSNF1 nicht mehr direkt phosphoryliert und damit nicht mehr aktivieren kann. Ist die AMPK gar nicht so wichtig für die Regulation der Autophagie in *P. anserina*? Möglicherweise ist auch PaCLPXP direkt durch eine noch unbekannt Signaltransduktion an der Autophagie-Regulation beteiligt. Dies würde einen Spannenden neuen Aspekt der biologischen Rolle von PaCLPXP beleuchten.

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen genaueren Einblick in die Rolle von PaCLPP für den Energiemetabolismus von *P. anserina* zu erhalten und mögliche Komponenten zu identifizieren, welche wichtig für die Langlebigkeit der *PaClpP*-Deletionsmutante sind. Folgende neue Erkenntnisse konnten hierbei gewonnen werden:

1. Die Substrat-Analyse durch eine Cycloheximid-Behandlung und anschließender Proteom-Analyse legte erfolgreich eine Reihe potentieller bisher nicht bekannter Substrate von PaCLPP offen. Interessanterweise waren unter den identifizierten Proteinen viele ribosomale Untereinheiten und Komponenten verschiedener Stoffwechselwege des Energiemetabolismus zu finden. Am auffälligsten unter diesen Substraten war die extreme Anreicherung eines Retikulum-ähnlichen Proteins, das einen neuen Aspekt der möglichen molekularbiologischen Rolle von PaCLPP in *P. anserina* andeutet.
2. Durch die Zugabe von Butyrat zum Medium, konnte erfolgreich die Autophagie sowohl im *P. anserina* Wildtyp als auch in der *PaClpP*-Deletionsmutante reduziert werden. Diese Verminderung der Autophagie sorgt bei $\Delta PaClpP$ für eine Verkürzung der Lebensspanne. Dieser Effekt ist spezifisch für die *PaClpP*-Deletionsmutante, während die Auswirkung von Butyrat auf den Wildtyp nur marginal ist. Dieses Ergebnis untermauert frühere Analysen dieser Deletionsmutante, welche besagen, dass die Langlebigkeit von $\Delta PaClpP$ Autophagie abhängig ist (Knuppertz und Osiewacz, 2017).
3. Die Metabolom-Analyse von $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp zeigt, dass das Fehlen der PaCLPP zu Veränderungen in der Menge der Metaboliten der Glykolyse und des Citratzyklus kommt. Außerdem sind die Mengen der meisten Aminosäuren und der Nukleotide betroffen. Diese Analyse beweist, dass das Fehlen dieser mitochondrialen Protease weitreichende Folgen für die ganze Zelle hat. Durch die signifikante Verringerung von ATP und die Anreicherung von AMP in jungen $\Delta PaClpP$ -Stämmen und durch den Umstand der gesteigerten Autophagie in dieser Mutante, fiel das Augenmerk auf die AMPK. Dieses veränderte AMP/ATP-Verhältnis ist ein Indiz für eine gesteigerte AMPK-Aktivität und könnte auch den Umstand der gesteigerten Autophagie in $\Delta PaClpP$ erklären.
4. Das Gen codierend für die katalytische α -Untereinheit der AMPK (*PaSnf1*) konnte erfolgreich in *P. anserina* deletiert werden. Das Fehlen von PaSNF1 führt zu einer reduzierten Wachstumsrate, einer beeinträchtigten weiblichen Fertilität und einer verzögerten Sporenreife. Es konnte gezeigt werden, dass die Autophagie infolge einer *PaSnf1*-Deletion nicht gänzlich unterdrückt wird, PaSNF1 allerdings für die Stress-induzierte Autophagie notwendig ist. Überraschenderweise führt die Abwesenheit von PaSNF1 zu einer verlängerten Lebensspanne im Vergleich zum

Wildtyp. Die meisten Effekte infolge einer *PaSnf1*-Deletion konnten durch die Einbringung eines FLAG::PaSNF1-Konstrukts komplementiert werden.

5. Eine gleichzeitige *PaSnf1* und *PaClpP*-Deletion führt zu einer unerwarteten, extremen Lebensspannenverlängerung, die die Verlängerung der Lebensspanne bei der *PaClpP*-Deletionsmutante noch übertrifft. Interessanterweise geht dieser Phänotyp nicht mit einer erhöhten Autophagie einher. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass das Fehlen von PaSNF1 sowohl in $\Delta PaSnf1$ als auch in $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ zu einer veränderten Mitochondrien-Morphologie im Alter führt. Die Abwesenheit von PaSNF1 verursacht, dass die Stämme auch im Alter (20d) noch überwiegend filamentöse Mitochondrien aufweisen. Zudem zeigen die drei analysierten Deletionsstämme ($\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$) massive Einschränkungen wenn sie auf die mitochondriale Funktion angewiesen sind.
6. Auffallend war, dass bei $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und bei $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ die Stämme mit dem Paarungstyp „mat-“ langlebiger sind als die Stämme mit dem Paarungstyp „mat+“. Dieser Effekt ist bei der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante am stärksten ausgeprägt. Weitere Untersuchungen dazu ergaben, dass die Paarungstypen immer dann eine Rolle spielen, wenn die Stämme mitochondrialem Stress ausgesetzt, oder aber auf die mitochondriale Funktion angewiesen sind. Verantwortlich für diese Unterschiede sind zwei *rmp1*-Allele, die mit den unterschiedlichen Paarungstyp-Loci gekoppelt sind und mit dem jeweiligen Paarungstyp-Locus vererbt werden (*rmp1-1* mit „mat-“; *rmp1-2* mit „mat+“).

Insgesamt lässt sich auf der Grundlage dieser Ergebnisse folgendes Schlussfazit formulieren, welches gleichzeitig gute Perspektiven für zukünftige Untersuchungen liefert:

Die gleichzeitige Deletion von *PaClpP* und *PaSnf1* führt zusammen mit RMP1-1 durch eine synergistische Wirkung, möglicherweise durch eine verbesserte mitochondriale Ribosomen-Zusammensetzung und einer daraus resultierenden verbesserten mitochondrialen Translation, zu einer extrem verlängerten Lebensspanne der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante, welche die Lebensspannenverlängerung von $\Delta PaClpP$ noch übertrifft.

7. Literaturverzeichnis

- Adam C, Picard M, Dequard-Chablat M, Sellem CH, Denmat SH, Contamine V (2012) Biological roles of the *Podospora anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. PLoS ONE 7: e38138.
- Agarraberes FA, Dice JF (2001a) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. J Cell Sci 114: 2491-2499.
- Agarraberes FA, Dice JF (2001b) Protein translocation across membranes. Biochim Biophys Acta 1513: 1-24.
- Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit Rev Biotechnol 30: 161-175.
- Al-Furoukh N, Ianni A, Nolte H, Hölper S, Krüger M, Wanrooij S, Braun T (2015) ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}) in mammalian cells. Biochim Biophys Acta 1853: 2580-2591.
- Albert B, Sellem CH (2002) Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging. Curr Genet 40: 365-373.
- Arlt H, Steglich G, Perryman R, Guiard B, Neupert W, Langer T (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. Embo j 17: 4837-4847.
- Arlt H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. Cell 85: 875-885.
- Aubin-Tam ME, Olivares AO, Sauer RT, Baker TA, Lang MJ (2011) Single-molecule protein unfolding and translocation by an ATP-fueled proteolytic machine. Cell 145: 257-267.
- Bando H, Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Mishima S, Shimizu C, Yoshioka N, Bucala R, Koike T (2005) Phosphorylation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose 2,6-bisphosphatase/PFKFB3 family of glycolytic regulators in human cancer. Clin Cancer Res 11: 5784-5792.
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. Mol Cell Biol 28: 5747-5763.
- Barrientos A (2002) In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. Methods 26: 307-316.
- Bas L, Papinski D, Licheva M, Torggler R, Rohringer S, Schuschnig M, Kraft C (2018) Reconstitution reveals Ykt6 as the autophagosomal SNARE in autophagosome-vacuole fusion. J Cell Biol 217: 3656-3669.
- Bauckman KA, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU (2015) Selective autophagy: xenophagy. Methods 75: 120-127.
- Bazopoulou D, Knoefler D, Zheng Y, Ulrich K, Oleson BJ, Xie L, Kim M, Kaufmann A, Lee YT, Dou Y, Chen Y, Quan S, Jakob U (2019) Developmental ROS individualizes organismal stress resistance and lifespan. Nature 576: 301-305.
- Belcour L, Begel O, Picard-Bennoun M (1991) A site-specific deletion in mitochondrial DNA of *Podospora* is under the control of nuclear genes. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 3579-3583.
- Bennett BD, Redford KE, Gralnick JA (2018) Survival of anaerobic Fe²⁺ stress requires the ClpXP protease. J Bacteriol 200: e00671-00617.
- Bereiter-Hahn J, Vöth M (1994a) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. Microsc Res Tech 27: 198-219.
- Bereiter-Hahn J, Vöth M (1994b) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. Microsc Res Tech 27: 198-219.
- Besse A, Brezavar D, Hanson J, Larson A, Bonnen PE (2020) LONP1 *de novo* dominant mutation causes mitochondrial encephalopathy with loss of LONP1 chaperone activity and excessive LONP1 proteolytic activity. Mitochondrion 51: 68-78.

- Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS (2002) AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J Biol Chem* 277: 23977-23980.
- Bonawitz ND, Rodeheffer MS, Shadel GS (2006) 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.
- Borghouts C, Werner A, Elthon T, Osiewacz HD (2001) Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol Cell Biol* 21: 390-399.
- Botham A, Coyaud E, Nirmalanandhan VS, Gronda M, Hurren R, Maclean N, St-Germain J, Mirali S, Laurent E, Raught B, Schimmer A (2019) Global interactome mapping of mitochondrial intermembrane space proteases identifies a novel function for HTRA2. *Proteomics* 19: e1900139.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Bragado P, Armesilla A, Silva A, Porras A (2007) Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 12: 1733-1742.
- Brand MD (1997) Regulation analysis of energy metabolism. *J Exp Biol* 200: 193-202.
- Bryan AC, Rodeheffer MS, Wearn CM, Shadel GS (2002) Slp1p is a membrane-bound regulator of transcription-coupled processes involved in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene expression. *Genetics* 160: 75-82.
- Buetler TM, Krauskopf A, Ruegg UT (2004) Role of superoxide as a signaling molecule. *News Physiol Sci* 19: 120-123.
- Buse MG, Reid SS (1975) Leucine. A possible regulator of protein turnover in muscle. *J Clin Invest* 56: 1250-1261.
- Calabrese EJ (2002) Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status. *Mutat Res* 511: 181-189.
- Camberg JL, Hoskins JR, Wickner S (2011) The interplay of ClpXP with the cell division machinery in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 193: 1911-1918.
- Campisi J (2013) Aging, cellular senescence, and cancer. *Annu Rev Physiol* 75: 685-705.
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG (1987) A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett* 223: 217-222.
- Celenza JL, Eng FJ, Carlson M (1989) Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol Cell Biol* 9: 5045-5054.
- Chao X, Wang H, Jaeschke H, Ding WX (2018) Role and mechanisms of autophagy in acetaminophen-induced liver injury. *Liver Int* 38: 1363-1374.
- Chaveron MK, Ghigo JM, d'Enfert C (2000) A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28: E97.
- Chen Z, Lei C, Wang C, Li N, Srivastava M, Tang M, Zhang H, Choi JM, Jung SY, Qin J, Chen J (2019) Global phosphoproteomic analysis reveals ARMC10 as an AMPK substrate that regulates mitochondrial dynamics. *Nat Commun* 10: 104.
- Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin HK, Dotan ZA, Niki M, Koutcher JA, Scher HI, Ludwig T, Gerald W, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP (2005) Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* 436: 725-730.
- Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR (2004) Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 279: 15719-15722.
- Cheong H, Nair U, Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg1 kinase complex is involved in the regulation of protein recruitment to initiate sequestering vesicle formation for nonspecific autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 19: 668-681.
- Cheung PC, Salt IP, Davies SP, Hardie DG, Carling D (2000) Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J* 346 Pt 3: 659-669.

- Chirico WJ, Waters MG, Blobel G (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810.
- Clark LC, Jr., Wolf R, Granger D, Taylor Z (1953) Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J Appl Physiol* 6: 189-193.
- Cochemé HM, Murphy MP (2008) Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem* 283: 1786-1798.
- Cohen SE, McKnight BM, Golden SS (2018) Roles for ClpXP in regulating the circadian clock in *Synechococcus elongatus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: E7805-e7813.
- Collado M, Gil J, Efeyan A, Guerra C, Schuhmacher AJ, Barradas M, Benguría A, Zaballos A, Flores JM, Barbacid M, Beach D, Serrano M (2005) Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature* 436: 642.
- Contamine V, Lecellier G, Belcour L, Picard M (1996) Premature death in *Podospora anserina*: sporadic accumulation of the deleted mitochondrial genome, translational parameters and innocuity of the mating types. *Genetics* 144: 541-555.
- Contamine V, Zickler D, Picard M (2004) The *Podospora rmp1* gene implicated in nucleus-mitochondria cross-talk encodes an essential protein whose subcellular location is developmentally regulated. *Genetics* 166: 135-150.
- Corry PM, Robinson S, Getz S (1977) Hyperthermic effects on DNA repair mechanisms. *Radiology* 123: 475-482.
- Culotta VC (2000) Superoxide dismutase, oxidative stress, and cell metabolism. *Curr Top Cell Regul* 36: 117-132.
- D'hondt C, Ponsaerts R, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B (2009) Reduced intercellular communication and altered morphology of bovine corneal endothelial cells with prolonged time in cell culture. *Curr Eye Res* 34: 454-465.
- Das D, Bandyopadhyay D, Bhattacharjee M, Banerjee RK (1997) Hydroxyl radical is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Radic Biol Med* 23: 8-18.
- Davies SP, Helps NR, Cohen PT, Hardie DG (1995) 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2 α and native bovine protein phosphatase-2A $_c$. *FEBS Lett* 377: 421-425.
- Davis BD, Luger SM, Tai PC (1986) Role of ribosome degradation in the death of starved *Escherichia coli* cells. *J Bacteriol* 166: 439-445.
- de Kloet SR (1966) Ribonucleic acid synthesis in yeast. The effect of cycloheximide on the synthesis of ribonucleic acid in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochem J* 99: 566-581.
- de Vries S, Grivell LA (1988) Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH-Q $_6$ oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 176: 377-384.
- De Vries S, Van Witzenburg R, Grivell LA, Marres CA (1992) Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 203: 587-592.
- de Waal EJ, Vreeling-Sindelárová H, Schellens JP, Houtkooper JM, James J (1986) Quantitative changes in the lysosomal vacuolar system of rat hepatocytes during short-term starvation. A morphometric analysis with special reference to macro- and microautophagy. *Cell Tissue Res* 243: 641-648.
- Debuchy R, Coppin E (1992) The mating types of *Podospora anserina*: functional analysis and sequence of the fertilization domains. *Mol Gen Genet* 233: 113-121.
- Deepa SS, Bhaskaran S, Ranjit R, Qaisar R, Nair BC, Liu Y, Walsh ME, Fok WC, Van Remmen H (2016) Down-regulation of the mitochondrial matrix peptidase ClpP in muscle cells causes mitochondrial dysfunction and decreases cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 91: 281-292.
- Deldicque L, Theisen D, Francaux M (2005) Regulation of mTOR by amino acids and resistance exercise in skeletal muscle. *Eur J Appl Physiol* 94: 1-10.
- Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An essential role for

- senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-733.
- Deshaies RJ, Koch BD, Werner-Washburne M, Craig EA, Schekman R (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 800-805.
- Deshwal S, Fiedler KU, Langer T (2020) Mitochondrial proteases: Multifaceted regulators of mitochondrial plasticity. *Annu Rev Biochem* 89: 501-528.
- Dice JF (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15: 305-309.
- Dice JF (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3: 295-299.
- Dice JF, Chiang HL (1989) Peptide signals for protein degradation within lysosomes. *Biochem Soc Symp* 55: 45-55.
- Dietrich J, Schmitt P, Zieger M, Preve B, Rolland J-L, Chaabihi H, Gueguen Y (2002) PCR performance of the highly thermostable proof-reading B-type DNA polymerase from *Pyrococcus abyssi*. *FEMS Microbiol Lett* 217: 89-94.
- Dilberger B, Baumanns S, Schmitt F, Schmiedl T, Hardt M, Wenzel U, Eckert GP (2019) Mitochondrial oxidative stress impairs energy metabolism and reduces stress resistance and longevity of *C. elegans*. *Oxid Med Cell Longev* 2019: 6840540.
- Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, Bunger MK, Bultman SJ (2011) The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab* 13: 517-526.
- Dröse S, Hanley PJ, Brandt U (2009) Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III. *Biochim Biophys Acta* 1790: 558-565.
- Duchen MR (2000) Mitochondria and Ca²⁺ in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28: 339-348.
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 331: 456-461.
- Eisenberg T, Schroeder S, Andryushkova A, Pendl T, Kuttner V, Bhukel A, Marino G, Pietrocola F, Harger A, Zimmermann A, Moustafa T, Sprenger A, Jany E, Buttner S, Carmona-Gutierrez D, Ruckenstein C, Ring J, Reichelt W, Schimmel K, Leeb T, Moser C, Schatz S, Kamolz LP, Magnes C, Sinner F, Sedej S, Frohlich KU, Juhasz G, Pieber TR, Dengjel J, Sigrist SJ, Kroemer G, Madeo F (2014) Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite Acetyl-Coenzyme A stimulates autophagy and prolongs lifespan. *Cell Metab* 19: 431-444.
- Ennis HL (1966) Synthesis of ribonucleic acid in L cells during inhibition of protein synthesis by cycloheximide. *Mol Pharmacol* 2: 543-557.
- Ennis HL, Lubin M (1964) Cycloheximide: Aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* 146: 1474-1476.
- Ernster L, Schatz G (1981) Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91: 227s-255s.
- Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, Da Silva C, Jaillon O, Porcel BM, Couloux A, Aury JM, Ségurens B, Poulain J, Anthouard V, Grossetete S, Khalili H, Coppin E, Déquard-Chablat M, Picard M, Contamine V, Arnais S, Bourdais A, Berteaux-Lecellier V, Gautheret D, de Vries RP, Battaglia E, Coutinho PM, Danchin EG, Henrissat B, Khoury RE, Sainsard-Chanet A, Boivin A, Pinan-Lucarré B, Sellem CH, Debuchy R, Wincker P, Weissenbach J, Silar P (2008) The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospora anserina*. *Genome Biol* 9: R77.
- Esser K (1974) "*Podospora anserina*," in *Handbook of Genetics*, ed. R.C. King. (New York: Plenum Press), 531-551.
- Esser K, Tudzynski P (1980) "Senescence in fungi," in *Senescence in Plants*, ed. K.V. Thimann. (Boca Raton: CRC Press), 67-83.
- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24: 24-41.

- Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ (2015) How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* 25: 354-363.
- Fischer F (2015) Untersuchungen zur molekularen Funktion und biologischen Rolle der mitochondrialen CLPXP-Protease in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Fischer F, Langer JD, Osiewacz HD (2015) Identification of potential mitochondrial CLPXP protease interactors and substrates suggests its central role in energy metabolism. *Sci Rep* 5: 18375.
- Fischer F, Weil A, Hamann A, Osiewacz HD (2013) Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal *ClpP* deletion strain. *Nat Commun* 4: 1397.
- Flynn JM, Neher SB, Kim YI, Sauer RT, Baker TA (2003) Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol Cell* 11: 671-683.
- Fogarty S, Hawley SA, Green KA, Saner N, Mustard KJ, Hardie DG (2010) Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β activates AMPK without forming a stable complex: synergistic effects of Ca^{2+} and AMP. *Biochem J* 426: 109-118.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending healthy life span - from yeast to humans. *Science* 328: 321-326.
- Fu SL, Dean RT (1997) Structural characterization of the products of hydroxyl-radical damage to leucine and their detection on proteins. *Biochem J* 324 (Pt 1): 41-48.
- Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X (2009) ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem* 284: 12297-12305.
- Geng J, Klionsky DJ (2008) The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Rep* 9: 859-864.
- Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E (2012) Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β). *J Biol Chem* 287: 38625-38636.
- Gómez-Sánchez R, Rose J, Guimarães R, Mari M, Papinski D, Rieter E, Geerts WJ, Hardenberg R, Kraft C, Ungermann C, Reggiori F (2018) Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J Cell Biol* 217: 2743-2763.
- Gonzalo S (2010) Epigenetic alterations in aging. *J Appl Physiol* 109: 586-597.
- Gracy RW, Talent JM, Zvaigzne AI (1998) Molecular wear and tear leads to terminal marking and the unstable isoforms of aging. *J Exp Zool* 282: 18-27.
- Granot Z, Kobiler O, Melamed-Book N, Eimerl S, Bahat A, Lu B, Braun S, Maurizi MR, Suzuki CK, Oppenheim AB, Orly J (2007) Turnover of mitochondrial steroidogenic acute regulatory (StAR) protein by Lon protease: the unexpected effect of proteasome inhibitors. *Mol Endocrinol* 21: 2164-2177.
- Greenberg PL (1998) Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk Res* 22: 1123-1136.
- Grief J (2007) Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Dissertation, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Grimaud R, Kessel M, Beuron F, Steven AC, Maurizi MR (1998) Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J Biol Chem* 273: 12476-12481.
- Groeger G, Quiney C, Cotter TG (2009) Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 11: 2655-2671.
- Gustafsson CM, Falkenberg M, Larsson NG (2016) Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 85: 133-160.
- Gutiérrez ME, García AF, Africa de Madariaga M, Sagrista ML, Casadó FJ, Mora M (2003) Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci* 72: 2337-2360.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214-226.

- Haidle CW, Storck R (1966) Inhibition by cycloheximide of protein and RNA synthesis in *Mucor rouxii*. *Biochem Biophys Res Commun* 22: 175-180.
- Hamann A, Krause K, Werner A, Osiewacz HD (2005) A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Curr Genet* 48: 270-275.
- Hamczyk MR, Nevado RM, Baretino A, Fuster V, Andrés V (2020) Biological versus chronological aging: JACC Focus Seminar. *J Am Coll Cardiol* 75: 919-930.
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282: 37298-37302.
- Hansen J, Gregersen N, Bross P (2005) Differential degradation of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by the protein quality control proteases Lon and ClpXP. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 1160-1170.
- Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ (2011) AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem Sci* 36: 470-477.
- Hardie DG, Ross FA, Hawley SA (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 251-262.
- Hardie DG, Salt IP, Hawley SA, Davies SP (1999) AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem J* 338 (Pt 3): 717-722.
- 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.
- Harman D (2001) Aging: overview. *Ann N Y Acad Sci* 928: 1-21.
- Harper AE, Miller RH, Block KP (1984) Branched-chain amino acid metabolism. *Annu Rev Nutr* 4: 409-454.
- Harrison DE, Astle CM, Delaittre JA (1978) Loss of proliferative capacity in immunohemopoietic stem cells caused by serial transplantation rather than aging. *J Exp Med* 147: 1526-1531.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG (2005) Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metab* 2: 9-19.
- Hawley SA, Selbert MA, Goldstein EG, Edelman AM, Carling D, Hardie DG (1995) 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca^{2+} /calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem* 270: 27186-27191.
- Hayflick L (1965) The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621.
- Haynes CM, Petrova K, Benedetti C, Yang Y, Ron D (2007) ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev Cell* 13: 467-480.
- Heimpel H, Aul C (1998) Myelodysplastische Syndrome. *Myelodysplastic syndromes*. *J Lab Med* 22: 199-206.
- Heinz D, Krotova E, Hamann A, Osiewacz HD (2021) Simultaneous ablation of the catalytic AMPK α -subunit SNF1 and mitochondrial matrix protease CLPP results in pronounced lifespan extension. *Front Cell Dev Biol* 9: 616520.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich KU, Wissing S, Büttner S, Fehr M, Sigrist S, Madeo F (2004) Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol* 164: 501-507.
- Herrmann JM, Neupert W (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* 55: 219-225.
- Herzig S, Shaw RJ (2018) AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 121-135.
- Holczer M, Hajdu B, Lorincz T, Szarka A, Banhegyi G, Kapuy O (2020) Fine-tuning of AMPK-ULK1-mTORC1 regulatory triangle is crucial for autophagy oscillation. *Sci Rep* 10: 17803.

- Homma T, Fujii J (2015) Application of glutathione as anti-oxidative and anti-aging drugs. *Curr Drug Metab* 16: 560-571.
- Hong SO, Layman DK (1984) Effects of leucine on in vitro protein synthesis and degradation in rat skeletal muscles. *J Nutr* 114: 1204-1212.
- Hou W-L, Yin J, Alimujiang M, Yu X-Y, Ai L-G, Bao Y-q, Liu F, Jia W-P (2018) Inhibition of mitochondrial complex I improves glucose metabolism independently of AMPK activation. *J Cell Mol Med* 22: 1316-1328.
- Houtkooper RH, Mouchiroud L, Ryu D, Moullan N, Katsyuba E, Knott G, Williams RW, Auwerx J (2013) Mitonuclear protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* 497: 451-457.
- Howell JJ, Ricoult SJ, Ben-Sahra I, Manning BD (2013) A growing role for mTOR in promoting anabolic metabolism. *Biochem Soc Trans* 41: 906-912.
- Huang M, Zhao Y, Feng L, Zhu L, Zhan L, Chen X (2020a) Role of the ClpX from *Corynebacterium crenatum* involved in stress responses and energy metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 5505-5517.
- Huang S, Petereit J, Millar AH (2020b) Loss of conserved mitochondrial CLPP and its functions lead to different phenotypes in plants and other organisms. *Plant Signal Behav* 15: 1831789.
- Huq S, Palmer JM (1978) Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett* 95: 217-220.
- Ide H, Murayama H, Sakamoto S, Makino K, Honda K, Nakamuta H, Sasaki M, Sugimoto N (1995) On the mechanism of preferential incorporation of dAMP at abasic sites in translesional DNA synthesis. Role of proofreading activity of DNA polymerase and thermodynamic characterization of model template-primers containing an abasic site. *Nucleic Acids Res* 23: 123-129.
- Inoki K, Kim J, Guan KL (2012) AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 52: 381-400.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL (2003) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115: 577-590.
- Issa AR, Sun J, Petitgas C, Mesquita A, Dulac A, Robin M, Mollereau B, Jenny A, Chérif-Zahar B, Birman S (2018) The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the *Drosophila* brain. *Autophagy* 14: 1898-1910.
- Jacinto TA, Meireles GS, Dias AT, Aires R, Porto ML, Gava AL, Vasquez EC, Pereira TMC, Campagnaro BP, Meyrelles SS (2018) Increased ROS production and DNA damage in monocytes are biomarkers of aging and atherosclerosis. *Biol Res* 51: 33.
- Jadiya P, Tomar D (2020) Mitochondrial protein quality control mechanisms. *Genes (Basel)* 11.
- Johansen T, Lamark T (2011) Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7: 279-296.
- Joshi SA, Hersch GL, Baker TA, Sauer RT (2004) Communication between ClpX and ClpP during substrate processing and degradation. *Nat Struct Mol Biol* 11: 404-411.
- Jun J-I, Lau LF (2010) The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol* 12: 676-685.
- Kadoguchi T, Shimada K, Miyazaki T, Kitamura K, Kunimoto M, Aikawa T, Sugita Y, Ouchi S, Shiozawa T, Yokoyama-Nishitani M, Fukao K, Miyosawa K, Isoda K, Daida H (2020) Promotion of oxidative stress is associated with mitochondrial dysfunction and muscle atrophy in aging mice. *Geriatr Gerontol Int* 20: 78-84.
- Kaeberlein M, Powers RW, 3rd, Steffen KK, Westman EA, Hu D, Dang N, Kerr EO, Kirkland KT, Fields S, Kennedy BK (2005) Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310: 1193-1196.
- Kang S, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES (2013) A novel role for the mitochondrial HTRA2/OMI protease in aging. *Autophagy* 9: 420-421.
- Katayama Y, Gottesman S, Pumphrey J, Rudikoff S, Clark WP, Maurizi MR (1988) The two-component, ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 263: 15226-15236.

- Kazak L, Reyes A, Holt IJ (2012) Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 659-671.
- Keyer K, Gort AS, Imlay JA (1995) Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 177: 6782-6790.
- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13: 132-141.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J (2002) Telomeres, aging and cancer: in search of a happy ending. *Oncogene* 21: 503-511.
- Kimber MS, Yu AY, Borg M, Leung E, Chan HS, Houry WA (2010) Structural and theoretical studies indicate that the cylindrical protease ClpP samples extended and compact conformations. *Structure* 18: 798-808.
- Kirchner P, Bourdenx M, Madrigal-Matute J, Tiano S, Diaz A, Bartholdy BA, Will B, Cuervo AM (2019) Proteome-wide analysis of chaperone-mediated autophagy targeting motifs. *PLoS Biol* 17: e3000301.
- Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233-238.
- Knuppertz L, Hamann A, Pampaloni F, Stelzer E, Osiewacz HD (2014) Identification of autophagy as a longevity-assurance mechanism in the aging model *Podospora anserina*. *Autophagy* 10: 822-834.
- Knuppertz L, Osiewacz HD (2017) Autophagy compensates impaired energy metabolism in CLXP-deficient *Podospora anserina* strains and extends healthspan. *Aging Cell* 16: 704-715.
- Köfinger J, Ragusa MJ, Lee IH, Hummer G, Hurley JH (2015) Solution structure of the Atg1 complex: implications for the architecture of the phagophore assembly site. *Structure* 23: 809-818.
- Kohda TA, Tanaka K, Konomi M, Sato M, Osumi M, Yamamoto M (2007) Fission yeast autophagy induced by nitrogen starvation generates a nitrogen source that drives adaptation processes. *Genes Cells* 12: 155-170.
- Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42: 221-242.
- Koppenol WH (1993) The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med* 15: 645-651.
- Kramer P, Jung AT, Hamann A, Osiewacz HD (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.
- Krotova E (2020) Untersuchungen zur Bedeutung der AMPK- α -Untereinheit für Alterungsprozesse des filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina*. Bachelorarbeit, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Kück U, Osiewacz HD, Schmidt U, Kappelhoff B, Schulte E, Stahl U, Esser K (1985) The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 9: 373-382.
- Kück U, Stahl U, Esser K (1981) Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 3: 151-156.
- Kuhn A, Stuart R, Henry R, Dalbey RE (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol* 13: 510-516.
- Kunstmann B, Osiewacz HD (2009) The S-adenosylmethionine dependent O-methyltransferase PaMTH1: a longevity assurance factor protecting *Podospora anserina* against oxidative stress. *Aging (Albany, NY)* 1: 328-334.
- Lambowitz AM, Sabourin JR, Bertrand H, Nickels R, McIntosh L (1989) Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Cell Biol* 9: 1362-1364.
- Laplante M, Sabatini DM (2009) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19: R1046-1052.
- Laplante M, Sabatini DM (2012) mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274-293.
- Lecellier G, Silar P (1994) Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25: 122-123.

- Lee H, Yoon Y (2018) Mitochondrial membrane dynamics - Functional positioning of OPA1. *Antioxidants (Basel)* 7.
- Lee JS, Lee GM (2012) Effect of sodium butyrate on autophagy and apoptosis in chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Prog* 28: 349-357.
- Lee YG, Kim HW, Nam Y, Shin KJ, Lee YJ, Park DH, Rhee HW, Seo JK, Chae YC (2021) LONP1 and ClpP cooperatively regulate mitochondrial proteostasis for cancer cell survival. *Oncogenesis* 10: 18.
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8: 3-5.
- Leonhard K, Herrmann JM, Stuart RA, Mannhaupt G, Neupert W, Langer T (1996) AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria. *Embo j* 15: 4218-4229.
- Leschelle X, Delpal S, Gubern M, Blotti re HM, Blachier F (2000) Butyrate metabolism upstream and downstream acetyl-CoA synthesis and growth control of human colon carcinoma cells. *Eur J Biochem* 267: 6435-6442.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463-477.
- Li WW, Li J, Bao JK (2012) Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* 69: 1125-1136.
- Li Y, Yan P, Lu X, Qiu Y, Liang S, Liu G, Li S, Mou L, Xie N (2020) Involvement of *PaSNF1* in fungal development, tterigmatocystin biosynthesis, and lignocellulosic degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Front Microbiol* 11: 1038.
- Lill R, Hoffmann B, Molik S, Pierik AJ, Rietzschel N, Stehling O, Uzarska MA, Webert H, Wilbrecht C, M hlenhoff U (2012) The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823: 1491-1508.
- Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443: 787-795.
- Liu J, Yan W, Zhao X, Jia Q, Wang J, Zhang H, Liu C, He K, Sun Z (2019) Sirt3 attenuates post-infarction cardiac injury via inhibiting mitochondrial fission and normalization of AMPK-Drp1 pathways. *Cell Signal* 53: 1-13.
- Liu K, Ologbenla A, Houry WA (2014) Dynamics of the ClpP serine protease: a model for self-compartmentalized proteases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49: 400-412.
- Liu X, Mao K, Yu AY, Omairi-Nasser A, Austin J, 2nd, Glick BS, Yip CK, Klionsky DJ (2016) The Atg17-Atg31-Atg29 complex coordinates with Atg11 to recruit the Vam7 SNARE and mediate autophagosome-vacuole fusion. *Curr Biol* 26: 150-160.
- Loewith R, Jacinto E, Wullschleger S, Lorberg A, Crespo JL, Bonenfant D, Oppliger W, Jenoe P, Hall MN (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10: 457-468.
- Lombard DB, Chua KF, Mostoslavsky R, Franco S, Gostissa M, Alt FW (2005) DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120: 497-512.
- L pez-Ot n C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G (2013) The hallmarks of aging. *Cell* 153: 1194-1217.
- Lorin S, Dufour E, Boulay J, Begel O, Marsy S, Sainsard-Chanet A (2001) Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol Microbiol* 42: 1259-1267.
- Luce K, Osiewacz HD (2009) Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat Cell Biol* 11: 852-858.
- Luce K, Weil AC, Osiewacz HD (2010) Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. *Adv Exp Med Biol* 694: 108-125.
- Mao K, Chew LH, Inoue-Aono Y, Cheong H, Nair U, Popelka H, Yip CK, Klionsky DJ (2013) Atg29 phosphorylation regulates coordination of the Atg17-Atg31-Atg29 complex with the Atg11 scaffold during autophagy initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E2875-2884.

- Mao K, Klionsky DJ (2011) AMPK activates autophagy by phosphorylating ULK1. *Circ Res* 108: 787-788.
- Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M, Zamzami N, Scoazec M, Durand S, Enot DP, Fernandez AF, Martins I, Kepp O, Senovilla L, Bauvy C, Morselli E, Vacchelli E, Bennetzen M, Magnes C, Sinner F, Pieber T, Lopez-Otin C, Maiuri MC, Codogno P, Andersen JS, Hill JA, Madeo F, Kroemer G (2014) Regulation of autophagy by cytosolic Acetyl-Coenzyme A. *Mol Cell* 53: 710-725.
- Martin J, Masri J, Bernath A, Nishimura RN, Gera J (2008) Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 578-583.
- Martin WF, Garg S, Zimorski V (2015) Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370: 20140330.
- Masoro EJ (1998) Hormesis and the antiaging action of dietary restriction. *Exp Gerontol* 33: 61-66.
- McCarthy S, Somayajulu M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S (2004) Paraquat induces oxidative stress and neuronal cell death; neuroprotection by water-soluble Coenzyme Q₁₀. *Toxicol Appl Pharmacol* 201: 21-31.
- McCartney RR, Rubenstein EM, Schmidt MC (2005) Snf1 kinase complexes with different beta subunits display stress-dependent preferences for the three Snf1-activating kinases. *Curr Genet* 47: 335-344.
- Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE (2011) Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* 18: 20-26.
- Mercer CA, Kaliappan A, Dennis PB (2009) A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy* 5: 649-662.
- Michel A, Agerer F, Hauck CR, Herrmann M, Ullrich J, Hacker J, Ohlsen K (2006) Global regulatory impact of ClpP protease of *Staphylococcus aureus* on regulons involved in virulence, oxidative stress response, autolysis, and DNA repair. *J Bacteriol* 188: 5783-5796.
- Mihaylova MM, Vasquez DS, Ravnskjaer K, Denechaud PD, Yu RT, Alvarez JG, Downes M, Evans RM, Montminy M, Shaw RJ (2011) Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell* 145: 607-621.
- Mizushima N (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* 21: 2861-2873.
- Molière N, Turgay K (2009) Chaperone-protease systems in regulation and protein quality control in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 160: 637-644.
- Moore AL, Siedow JN (1991) The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1059: 121-140.
- Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, Liu P, Mostoslavsky G, Franco S, Murphy MM, Mills KD, Patel P, Hsu JT, Hong AL, Ford E, Cheng H-L, Kennedy C, Nunez N, Bronson R, Frendewey D, Auerbach W, Valenzuela D, Karow M, Hottiger MO, Hursting S, Barrett JC, Guarente L, Mulligan R, Demple B, Yancopoulos GD, Alt FW (2006) Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124: 315-329.
- Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT (2011) Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol* 31: 3531-3545.
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13.
- Nayak V, Zhao K, Wyce A, Schwartz MF, Lo WS, Berger SL, Marmorstein R (2006) Structure and dimerization of the kinase domain from yeast Snf1, a member of the Snf1/AMPK protein family. *Structure* 14: 477-485.
- Neher SB, Villén J, Oakes EC, Bakalarski CE, Sauer RT, Gygi SP, Baker TA (2006) Proteomic profiling of ClpXP substrates after DNA damage reveals extensive instability within SOS regulon. *Mol Cell* 22: 193-204.
- Nelson DL, Cox MM, Häcker B (2009) *Lehninger Biochemie*. Berlin ; Heidelberg: Springer.
- Nimmo GAM, Venkatesh S, Pandey AK, Marshall CR, Hazrati LN, Blaser S, Ahmed S, Cameron J, Singh K, Ray PN, Suzuki CK, Yoon G (2019) Bi-allelic mutations of LONP1 encoding the

- mitochondrial LonP1 protease cause pyruvate dehydrogenase deficiency and profound neurodegeneration with progressive cerebellar atrophy. *Hum Mol Genet* 28: 290-306.
- Noda NN (2021) Atg2 and Atg9: Intermembrane and interleaflet lipid transporters driving autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1866: 158956.
- O'Neill HM, Lally JS, Galic S, Thomas M, Azizi PD, Fullerton MD, Smith BK, Pulinilkunnil T, Chen Z, Samaan MC, Jorgensen SB, Dyck JR, Holloway GP, Hawke TJ, van Denderen BJ, Kemp BE, Steinberg GR (2014) AMPK phosphorylation of ACC2 is required for skeletal muscle fatty acid oxidation and insulin sensitivity in mice. *Diabetologia* 57: 1693-1702.
- Oku M, Sakai Y (2018) Three distinct types of microautophagy based on membrane dynamics and molecular machineries. *Bioessays* 40: e1800008.
- Onodera J, Ohsumi Y (2005) Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 280: 31582-31586.
- Osiewacz HD (1994) A versatile shuttle cosmid vector for the efficient construction of genomic libraries and for the cloning of fungal genes. *Curr Genet* 26: 87-90.
- Osiewacz HD (2002a) Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech Ageing Dev* 123: 755-764.
- Osiewacz HD (2002b) Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res Rev* 28: 1-18.
- Osiewacz HD, Borghouts C (2000) Cellular copper homeostasis, mitochondrial DNA instabilities, and lifespan control in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Exp Gerontol* 35: 677-686.
- Osiewacz HD, Brust D, Hamann A, Kunstmann B, Luce K, Müller-Ohldach M, Scheckhuber CQ, Servos J, Strobel I (2010) Mitochondrial pathways governing stress resistance, life, and death in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Ann N Y Acad Sci* 1197: 54-66.
- Osiewacz HD, Hamann A, Zintel S (2013) Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Methods Mol Biol* 965: 439-462.
- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2007) Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol Biol Cell* 18: 627-635.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M (2003) Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22: 18-35.
- Palace VP, Khaper N, Qin Q, Singal PK (1999) Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radic Biol Med* 26: 746-761.
- Pant K, Saraya A, Venugopal SK (2017) Oxidative stress plays a key role in butyrate-mediated autophagy via Akt/mTOR pathway in hepatoma cells. *Chem Biol Interact* 273: 99-106.
- Papa S, Martino PL, Capitanio G, Gaballo A, De Rasmio D, Signorile A, Petruzzella V (2012) The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol* 942: 3-37.
- Perez-Alvarez MJ, Villa Gonzalez M, Benito-Cuesta I, Wandosell FG (2018) Role of mTORC1 controlling proteostasis after brain ischemia. *Front Neurosci* 12: 60.
- Petereit J, Duncan O, Murcha MW, Fenske R, Cincu E, Cahn J, Pruzinska A, Ivanova A, Kollipara L, Wortelkamp S, Sickmann A, Lee J, Lister R, Millar AH, Huang S (2020) Mitochondrial CLPP2 assists coordination and homeostasis of respiratory complexes. *Plant. Physiol.* 184: 148-164.
- Pryde KR, Taanman JW, Schapira AH (2016) A LON-ClpP proteolytic axis degrades complex I to extinguish ROS production in depolarized mitochondria. *Cell Rep* 17: 2522-2531.
- Przybilla J, Rohlf T, Loeffler M, Galle J (2014) Understanding epigenetic changes in aging stem cells - a computational model approach. *Aging Cell* 13: 320-328.
- Punt PJ, Oliver RP, Dingemans MA, Pouwels PH, van den Hondel CA (1987) Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124.
- Qiao CM, Sun MF, Jia XB, Shi Y, Zhang BP, Zhou ZL, Zhao LP, Cui C, Shen YQ (2020) Sodium butyrate causes α -synuclein degradation by an Atg5-dependent and PI3K/Akt/mTOR-related autophagy pathway. *Exp Cell Res* 387: 111772.
- Quirós PM, Langer T, López-Otín C (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 16: 345-359.

- Raju NB, Perkins DD (1994) Diverse programs of ascus development in pseudohomothallic species of *Neurospora*, *Gelasinospora*, and *Podospira*. *Dev Genet* 15: 104-118.
- Rattan SI (2008) Hormesis in aging. *Ageing Res Rev* 7: 63-78.
- Realì V, Mehdawy B, Nardacci R, Filomeni G, Risuglia A, Rossin F, Antonioli M, Marsella C, Fimia GM, Piacentini M, Di Sano F (2015) Reticulon protein-1C is a key component of MAMs. *Biochim Biophys Acta* 1853: 733-745.
- Reczek CR, Chandel NS (2015) ROS-dependent signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 33: 8-13.
- Rehman HU, Alharby HF, Bamagoos AA, Abdelhamid MT, Rady MM (2021) Sequenced application of glutathione as an antioxidant with an organic biostimulant improves physiological and metabolic adaptation to salinity in wheat. *Plant Physiol Biochem* 158: 43-52.
- Reiter AK, Bolster DR, Crozier SJ, Kimball SR, Jefferson LS (2005) Repression of protein synthesis and mTOR signaling in rat liver mediated by the AMPK activator aminoimidazole carboxamide ribonucleoside. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E980-988.
- Ristow M, Schmeisser K (2014) Mitohormesis: Promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS). *Dose Response* 12: 288-341.
- Rizet G (1953) Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospira anserina*. *C. R. Hebd. Seances. Acad. Sci.* 237: 838-855.
- Ross FA, Jensen TE, Hardie DG (2016a) Differential regulation by AMP and ADP of AMPK complexes containing different γ subunit isoforms. *Biochem J* 473: 189-199.
- Ross FA, MacKintosh C, Hardie DG (2016b) AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *Febs j* 283: 2987-3001.
- Rouillard JM, Dufour ME, Dujardin G, Lacroute F, Theunissen B, Mandart E (1996) *SLS1*, a new *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial metabolism, isolated as a synthetic lethal in association with an *SSM4* deletion. *Mol Gen Genet* 252: 700-708.
- Rout AK, Strub MP, Piszczek G, Tjandra N (2014) Structure of transmembrane domain of lysosome-associated membrane protein type 2a (LAMP-2A) reveals key features for substrate specificity in chaperone-mediated autophagy. *J Biol Chem* 289: 35111-35123.
- Rupp DW (1996) DNA repair mechanisms. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology 2: 2277-2294.
- Sadowski M, Suryadinata R, Tan AR, Roesley SN, Sarcevic B (2012) Protein monoubiquitination and polyubiquitination generate structural diversity to control distinct biological processes. *IUBMB Life* 64: 136-142.
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* 20: 131-139.
- Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D (2007) Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J* 403: 139-148.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Saunders RA, Stinson BM, Baker TA, Sauer RT (2020) Multistep substrate binding and engagement by the AAA+ ClpXP protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117: 28005-28013.
- Schaar CE, Dues DJ, Spielbauer KK, Machiela E, Cooper JF, Senchuk M, Hekimi S, Van Raamsdonk JM (2015) Mitochondrial and cytoplasmic ROS have opposing effects on lifespan. *PLoS Genet* 11: e1004972.
- Scheckhuber CQ, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T, Osiewacz HD (2007) Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* 9: 99-105.
- Scheckhuber CQ, Houthoofd K, Weil AC, Werner A, De VA, Vanfleteren JR, Osiewacz HD (2011a) Alternative oxidase dependent respiration leads to an increased mitochondrial content in two long-lived mutants of the ageing model *Podospira anserina*. *PLoS One* 6: e16620.
- Scheckhuber CQ, Wanger RA, Mignat CA, Osiewacz HD (2011b) Unopposed mitochondrial fission leads to severe lifespan shortening. *Cell Cycle* 10: 3105-3110.

- Schmalzing M, Aringer M, Bornhäuser M, Atta J (2017) Myelodysplastic syndrome, acute leukemia and stem cell transplantation. *Z Rheumatol* 76: 26-32.
- Schmidt MC, McCartney RR (2000) β -subunits of Snf1 kinase are required for kinase function and substrate definition. *Embo j* 19: 4936-4943.
- Schmitt-Graeff A, Mattern D, Köhler H, Hezel J, Lübbert M (2000) Myelodysplastic syndromes (MDS). Aspects of hematopathologic diagnosis. *Pathologe* 21: 1-15.
- Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO (2010) Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 6: 209-217.
- Schneider JL, Villarroya J, Diaz-Carretero A, Patel B, Urbanska AM, Thi MM, Villarroya F, Santambrogio L, Cuervo AM (2015) Loss of hepatic chaperone-mediated autophagy accelerates proteostasis failure in aging. *Aging Cell* 14: 249-264.
- Scialò F, Sriram A, Fernández-Ayala D, Gubina N, Löhmus M, Nelson G, Logan A, Cooper HM, Navas P, Enríquez JA, Murphy MP, Sanz A (2016) Mitochondrial ROS produced via reverse electron transport extend animal lifespan. *Cell Metab* 23: 725-734.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP (2004) Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell* 7: 167-178.
- Seabright AP, Fine NHF, Barlow JP, Lord SO, Musa I, Gray A, Bryant JA, Banzhaf M, Lavery GG, Hardie DG, Hodson DJ, Philp A, Lai Y-C (2020) AMPK activation induces mitophagy and promotes mitochondrial fission while activating TBK1 in a PINK1-Parkin independent manner. *FASEB J* 34: 6284-6301.
- Seglen PO, Gordon PB, Holen I (1990) Non-selective autophagy. *Semin Cell Biol* 1: 441-448.
- Seiferling D, Szczepanowska K, Becker C, Senft K, Hermans S, Maiti P, König T, Kukat A, Trifunovic A (2016) Loss of CLPP alleviates mitochondrial cardiomyopathy without affecting the mammalian UPRmt. *EMBO Rep* 17: 953-964.
- Sellem CH, Bovier E, Lorin S, Sainsard-Chanet A (2009) Mutations in two zinc-cluster proteins activate alternative respiratory and gluconeogenic pathways and restore senescence in long-lived respiratory mutants of *Podospora anserina*. *Genetics* 182: 69-78.
- Sellem CH, Lemaire C, Lorin S, Dujardin G, Sainsard-Chanet A (2005) Interaction between the *oxa1* and *rmp1* genes modulates respiratory complex assembly and life span in *Podospora anserina*. *Genetics* 169: 1379-1389.
- Seo AY, Joseph AM, Dutta D, Hwang JC, Aris JP, Leeuwenburgh C (2010) New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci* 123: 2533-2542.
- Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T (1999) Modulation of oxidative phosphorylation of human kidney 293 cells by transfection with the internal rotenone-insensitive NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1412: 56-65.
- Shanklin J, DeWitt ND, Flanagan JM (1995) The stroma of higher plant plastids contain ClpP and ClpC, functional homologs of *Escherichia coli* ClpP and ClpA: an archetypal two-component ATP-dependent protease. *Plant Cell* 7: 1713-1722.
- Sharma PK, Agrawal V, Roy N (2011) Mitochondria-mediated hormetic response in life span extension of calorie-restricted *Saccharomyces cerevisiae*. *AGE* 33: 143-154.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC (2005) The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 310: 1642-1646.
- Siegel MR, Sisler HD (1963) Inhibition of protein synthesis in vitro by cycloheximide. *Nature* 200: 675-676.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Son SM, Park SJ, Lee H, Siddiqi F, Lee JE, Menzies FM, Rubinsztein DC (2019) Leucine signals to mTORC1 via its metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metab* 29: 192-201.e197.
- Son SM, Park SJ, Stamatakou E, Vicinanza M, Menzies FM, Rubinsztein DC (2020) Leucine regulates autophagy via acetylation of the mTORC1 component raptor. *Nat Commun* 11: 3148.

- Sprangers R, Gribun A, Hwang PM, Houry WA, Kay LE (2005) Quantitative NMR spectroscopy of supramolecular complexes: dynamic side pores in ClpP are important for product release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 16678-16683.
- Stahl U, Lemke PA, Tudzynski P, Kuck U, Esser K (1978) Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 162: 341-343.
- Stallone G, Infante B, Prisciandaro C, Grandaliano G (2019) mTOR and aging: An old fashioned dress. *Int J Mol Sci* 20.
- Stapleton D, Mitchelhill KI, Gao G, Widmer J, Michell BJ, Teh T, House CM, Fernandez CS, Cox T, Witters LA, Kemp BE (1996) Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem* 271: 611-614.
- Stoldt S, Wenzel D, Hildenbeutel M, Wurm CA, Herrmann JM, Jakobs S (2012) The inner-mitochondrial distribution of Oxa1 depends on the growth conditions and on the availability of substrates. *Mol Biol Cell* 23: 2292-2301.
- Stolz A, Ernst A, Dikic I (2014) Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* 16: 495-501.
- Stuart RA, Ono H, Langer T, Neupert W (1996) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Cell Struct Funct* 21: 403-406.
- Stumpferl SW, Stephan O, Osiewacz HD (2004) Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. *Eukaryot Cell* 3: 200-211.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-446.
- Susin SA, Zamzami N, Kroemer G (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim Biophys Acta* 1366: 151-165.
- Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, Ohsumi Y (2007) Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 12: 209-218.
- Szczepanowska K, Maiti P, Kukat A, Hofsetz E, Nolte H, Senft K, Becker C, Ruzzenente B, Hornig-Do HT, Wibom R, Wiesner RJ, Kruger M, Trifunovic A (2016) CLPP coordinates mitoribosomal assembly through the regulation of ERAL1 levels. *EMBO J* 35: 2566-2583.
- Szczepanowska K, Senft K, Heidler J, Herholz M, Kukat A, Hohne MN, Hofsetz E, Becker C, Kaspar S, Giese H, Zwicker K, Guerrero-Castillo S, Baumann L, Kauppila J, Rummyantseva A, Muller S, Frese CK, Brandt U, Riemer J, Wittig I, Trifunovic A (2020) A salvage pathway maintains highly functional respiratory complex I. *Nat Commun* 11: 1643.
- Szczepanowska K, Trifunovic A (2021) Mitochondrial matrix proteases: quality control and beyond. *FEBS J*: doi: 10.1111/febs.15964.
- Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119: 301-311.
- Tang Y, Chen Y, Jiang H, Nie D (2011) Short-chain fatty acids induced autophagy serves as an adaptive strategy for retarding mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 18: 602-618.
- Tapia PC (2006) Sublethal mitochondrial stress with an attendant stoichiometric augmentation of reactive oxygen species may precipitate many of the beneficial alterations in cellular physiology produced by caloric restriction, intermittent fasting, exercise and dietary phytonutrients: "Mitohormesis" for health and vitality. *Med Hypotheses* 66: 832-843.
- Taylor EB, Rutter J (2011) Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Soc Trans* 39: 1509-1513.
- Taylor RC, Dillin A (2011) Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3: a004440.
- Thornton C, Snowden MA, Carling D (1998) Identification of a novel AMP-activated protein kinase β subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem* 273: 12443-12450.

- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19: 94-102.
- Tillander V, Arvidsson Nordström E, Reilly J, Strozyk M, Van Veldhoven PP, Hunt MC, Alexson SE (2014) Acyl-CoA thioesterase 9 (ACOT9) in mouse may provide a novel link between fatty acid and amino acid metabolism in mitochondria. *Cell Mol Life Sci* 71: 933-948.
- Toyama EQ, Herzig S, Courchet J, Lewis TL, Losón OC, Hellberg K, Young NP, Chen H, Polleux F, Chan DC, Shaw RJ (2016) AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science* 351: 275-281.
- Trosko JE, Chang CC, Upham B, Wilson M (1998) Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication. *Toxicol Lett* 102-103: 71-78.
- Truscott KN, Bezawork-Geleta A, Dougan DA (2011) Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine. *IUBMB Life* 63: 955-963.
- Tuttle DL, Lewin AS, Dunn WA, Jr. (1993) Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur J Cell Biol* 60: 283-290.
- Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008a) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27: 433-446.
- Twig G, Hyde B, Shirihai OS (2008b) Mitochondrial fusion, fission and autophagy as a quality control axis: the bioenergetic view. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1092-1097.
- Uttenweiler A, Mayer A (2008) Microautophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 445: 245-259.
- Uytterhoeven V, Lauwers E, Maes I, Miskiewicz K, Melo MN, Swerts J, Kuenen S, Wittcox R, Corthout N, Marrink SJ, Munck S, Verstreken P (2015) Hsc70-4 deforms membranes to promote synaptic protein turnover by endosomal microautophagy. *Neuron* 88: 735-748.
- Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E (2017) The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 482: 426-431.
- van Dyck L, Dembowski M, Neupert W, Langer T (1998) Mcx1p, a ClpX homologue in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 438: 250-254.
- Van Raamsdonk JM (2015) Levels and location are crucial in determining the effect of ROS on lifespan. *Worm* 4: e1094607.
- Van Raamsdonk JM, Hekimi S (2010) Reactive oxygen species and aging in *Caenorhabditis elegans*: Causal or casual relationship? *Antioxid Redox Signal* 13: 1911-1953.
- Van Zant G, Liang Y (2003) The role of stem cells in aging. *Exp Hematol* 31: 659-672.
- Veal E, Day A (2011) Hydrogen peroxide as a signaling molecule. *Antioxid Redox Signal* 15: 147-151.
- Veenhuis M, Douma A, Harder W, Osumi M (1983) Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch Microbiol* 134: 193-203.
- Vorapreeda T, Thammamongtham C, Cheevadhanarak S, Laoteng K (2012) Alternative routes of Acetyl-CoA synthesis identified by comparative genomic analysis: involvement in the lipid production of oleaginous yeast and fungi. *Microbiology (Reading)* 158: 217-228.
- Voss C, Lahiri S, Young BP, Loewen CJ, Prinz WA (2012) ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* 125: 4791-4799.
- Wagner AM, Moore AL (1997) Structure and function of the plant alternative oxidase: its putative role in the oxygen defence mechanism. *Biosci Rep* 17: 319-333.
- Wanders RJ, Ruiter JP, L IJ, Waterham HR, Houten SM (2010) The enzymology of mitochondrial fatty acid beta-oxidation and its application to follow-up analysis of positive neonatal screening results. *J Inher Metab Dis* 33: 479-494.
- Wang D, Li Y, Wang H, Wei D, Akhberdi O, Liu Y, Xiang B, Hao X, Zhu X (2018) The AMP-activated protein kinase homolog Snf1 concert carbon utilization, conidia production and the biosynthesis of secondary metabolites in the Taxol-producer *Pestalotiopsis microspora*. *Genes (Basel)* 9.

- Wang J, Hartling JA, Flanagan JM (1997) The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91: 447-456.
- Warner HR (1999) Apoptosis: a two-edged sword in aging. *Ann N Y Acad Sci* 887: 1-11.
- Weil A, Luce K, Dröse S, Wittig I, Brandt U, Osiewacz HD (2011) Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* 10: 4280-4290.
- Weir CP, Robaire B (2007) Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the brown Norway rat. *J Androl* 28: 229-240.
- Weir HJ, Yao P, Huynh FK, Escoubas CC, Goncalves RL, Burkewitz K, Laboy R, Hirschey MD, Mair WB (2017) Dietary restriction and AMPK increase lifespan via mitochondrial network and peroxisome remodeling. *Cell Metab* 26: 884-896.e885.
- Weisiger RA, Fridovich I (1973) Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J Biol Chem* 248: 3582-3592.
- Winterbourn CC (1995) Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett* 82-83: 969-974.
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong SP, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M, Carling D (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase-β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* 2: 21-33.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D (2003) LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13: 2004-2008.
- Wu X, Luo J, Liu H, Cui W, Guo K, Zhao L, Bai H, Guo W, Guo H, Feng D, Qu Y (2020) Recombinant adiponectin peptide ameliorates brain injury following intracerebral hemorrhage by suppressing astrocyte-derived inflammation via the inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Transl Stroke Res* 11: 924-939.
- Xiao B, Heath R, Saiu P, Leiper FC, Leone P, Jing C, Walker PA, Haire L, Eccleston JF, Davis CT, Martin SR, Carling D, Gamblin SJ (2007) Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449: 496-500.
- Xu P, Damschroder D, Zhang M, Ryall KA, Adler PN, Saucerman JJ, Wessells RJ, Yan Z (2019a) Atg2, Atg9 and Atg18 in mitochondrial integrity, cardiac function and healthspan in *Drosophila*. *J Mol Cell Cardiol* 127: 116-124.
- Xu Y, Zhou P, Cheng S, Lu Q, Nowak K, Hopp AK, Li L, Shi X, Zhou Z, Gao W, Li D, He H, Liu X, Ding J, Hottiger MO, Shao F (2019b) A bacterial effector reveals the V-ATPase-ATG16L1 axis that initiates xenophagy. *Cell* 178: 552-566.e520.
- Yan Y, Zhou XE, Xu HE, Melcher K (2018) Structure and physiological regulation of AMPK. *Int J Mol Sci* 19.
- Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ (2006) Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol Biol Cell* 17: 5094-5104.
- Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12: 814-822.
- Yi C, Tong J, Lu P, Wang Y, Zhang J, Sun C, Yuan K, Xue R, Zou B, Li N, Xiao S, Dai C, Huang Y, Xu L, Li L, Chen S, Miao D, Deng H, Li H, Yu L (2017) Formation of a Snf1-Mec1-Atg1 module on mitochondria governs energy deprivation-induced autophagy by regulating mitochondrial respiration. *Dev Cell* 41: 59-71 e54.
- Yi DG, Hong S, Huh WK (2018) Mitochondrial dysfunction reduces yeast replicative lifespan by elevating RAS-dependent ROS production by the ER-localized NADPH oxidase Yno1. *PLoS One* 13: e0198619.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002) Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33: 337-349.
- Zellmeier S, Schumann W, Wiegert T (2006) Involvement of Clp protease activity in modulating the *Bacillus subtilis* σ^W stress response. *Mol Microbiol* 61: 1569-1582.

- Zeng X, Neupert W, Tzagoloff A (2007) The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase. *Mol Biol Cell* 18: 617-626.
- Zhang Y, Wang Y, Xu J, Tian F, Hu S, Chen Y, Fu Z (2018) Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways. *J Pineal Res* 66: e12542.
- Zheng Q, Zhao Y, Guo J, Zhao S, Fei C, Xiao C, Wu D, Wu L, Li X, Chang C (2018) Iron overload promotes mitochondrial fragmentation in mesenchymal stromal cells from myelodysplastic syndrome patients through activation of the AMPK/MFF/Drp1 pathway. *Cell Death Dis* 9: 515.
- Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM (1998) Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev* 12: 2997-3007.
- Zintel S, Schwitalla D, Luce K, Hamann A, Osiewacz HD (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.
- Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, García-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Ayté J, Hidalgo E (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One* 3: e2842.

8. Anhang

Anhang Tabelle 8.1: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant veränderten Proteine ohne Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben sind jeweils die UniProt_IDs der einzelnen Proteine, die ID der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank (Pa_ID), der Faktor („x-fach“) mit den dazugehörigen p -Werten ($p < 0,05$) und die jeweilige UniProt-Annotierung. Die Analyse wurde jeweils mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die identifizierten Proteine sind nach der Stärke der Anreicherung sortiert. Die grau unterlegten Pa_IDs zeigen die Proteine, welche ebenfalls als potentielle Substrate und Interaktionspartner bei Fischer *et al.* (2015) identifiziert wurden. Die fettgedruckten Pa_IDs heben die Proteine hervor, welche auch mit Cycloheximid-Behandlung angereichert waren. Die fettgedruckten Pa_IDs mit einem zusätzlichen Sternchen zeigen die Proteine an, welche mit Cycloheximid-Behandlung reduziert vorlagen. Der rot unterlegte Tabellenabschnitt listet die Proteine auf, welche in $\Delta PaClpP$ signifikant vermindert vorliegen im Vergleich zum Wildtyp.

UniProt_ID	Pa_ID	x-fach $\Delta PaClpP$ vs. WT	p-Wert	UniProt-Annotierung
B2ADP0	Pa_4_1620	580,93	1,45E-07	O-methyltransferase
B2ARQ6	Pa_4_6710	531,52	4,90E-05	Ribosomal_L33 domain
B2B147	Pa_3_9280	246,36	3,71E-06	mitochondrial LSU ribosomal protein L33 precursor
B2AMZ4	Pa_6_8460	222,36	5,49E-05	Protein similar to Heterokaryon incompatibility protein 6
B2ABN3	Pa_1_20415	6,49	3,55E-02	Protein of unknown function
B2AWM1	Pa_7_7630	6,33	4,66E-02	Eukaryotic translation initiation factor 6 (TIF6)
A0A090D6B4	Pa_3_7380	5,41	2,77E-02	Acetyl-coenzyme A synthetase
B2B823	Pa_2_13050	5,33	1,79E-02	Methyltransferase-like protein 7B
B2ARN9	Pa_4_6880	5,25	2,30E-03	Putative ribosomal protein
A0A090CCG8	Pa_2_4660	3,92	1,26E-03	Protein of unknown function
B2A8Y5	Pa_1_7820	3,54	9,03E-03	Mitochondrial LSU ribosomal protein L44
B2B1C3	Pa_3_8980	3,32	2,84E-03	Protein of unknown function
B2B564	Pa_2_3640	3,06	3,15E-02	SAP domain-containing protein
B2B654	Pa_2_6760	2,87	9,53E-04	H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3
B2APU3	Pa_4_6270	2,61	1,79E-02	DUF2433 domain-containing protein
B2B7U7	Pa_2_12310	2,50	5,19E-03	Protein of unknown function
B2AAU9	Pa_1_5240	2,45	3,12E-02	EthD domain-containing protein
B2AUD5	Pa_1_18770	2,42	4,65E-02	Trafficking protein particle complex subunit
B2AL36	Pa_5_8590	2,24	8,74E-03	Vacuolar protein sorting-associated protein 7
B2B7V1	Pa_2_12350	2,21	4,81E-02	Protein of unknown function
A0A090CEV3	Pa_1_12970	2,17	2,10E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase 9.5 kDa subunit
B2B7V0	Pa_2_12340	2,13	6,79E-03	Protein of unknown function
B2AR53	Pa_4_8610	2,09	4,73E-02	Complex I-ESSS; NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 11
B2AWS7	Pa_7_8180	2,01	4,20E-02	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase
B2ASX5	Pa_6_11520	1,97	3,29E-02	Protein of unknown function
B2AT34	Pa_1_14540	1,90	1,03E-02	Putative NADH-ubiquinone oxidoreductase
B2AR06	Pa_4_9060	1,86	2,63E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1
A0A090CVB0	Pa_6_6100	1,79	4,25E-02	Aspartate carbamoyltransferase
B2B5R1	Pa_2_5510	1,78	1,70E-02	Protein of unknown function
P20682	Pa_mito_cox2	1,76	5,75E-03	Cytochrome c oxidase subunit 2 (COII)
B2AMD3	Pa_5_7600	1,74	4,34 E-02	Protein of unknown function

[Anhang]

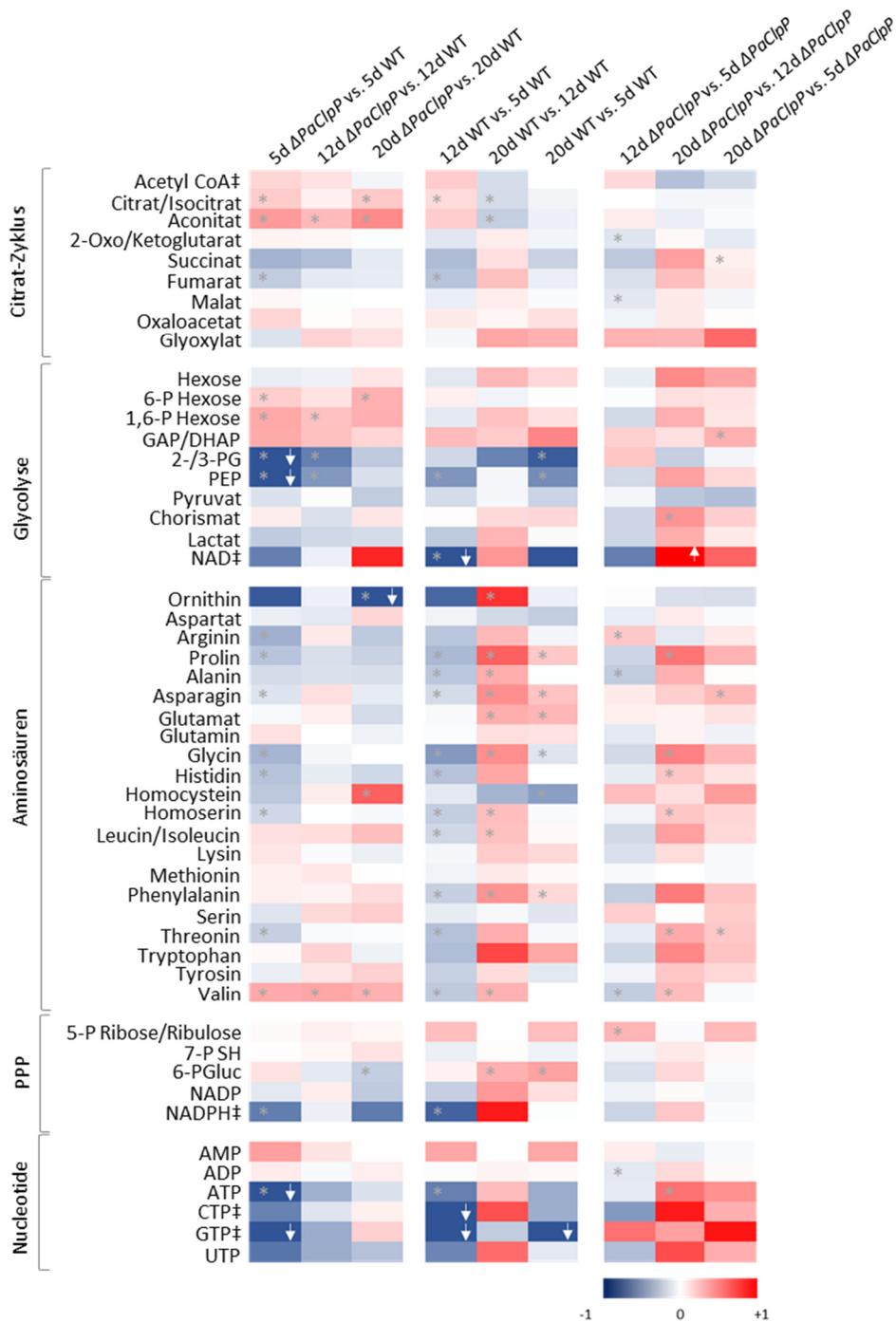
B2B6I3	Pa_2_7870	1,72	3,47E-02	Linear gramicidin synthetase
B2AXO8	Pa_7_8930	1,72	3,55E-02	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM13
B2AYP8	Pa_1_11820	1,70	3,65E-02	Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 12 kDa subunit
AOA090CDR3	Pa_2_9860	1,69	7,84E-03	P4Hc domain-containing protein
B2A9D6	Pa_1_675	1,67	2,47E-02	Small nuclear ribonucleoprotein G
B2B826	Pa_2_13080	1,66	3,89E-02	Acidic cytosolic 60S ribosomal protein RplP1
B2AVL5	Pa_7_2530	1,64	5,43E-03	54S ribosomal protein L31
B2AAD2	Pa_1_3630	1,64	2,65E-02	Cytochrome c oxidase assembly factor 3
B2AQK9	Pa_4_3850	1,64	3,60E-02	O-Methyltransferase
B2ABP6	Pa_1_20540*	1,62	2,68E-02	Valyl-tRNA synthetase
B2VL96	Pa_5_5380	1,61	3,50E-02	NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit (ComplexI- B22)
B2ADV7	Pa_4_2215	1,58	8,19E-04	Protein of unknown function
B2ARC6	Pa_4_7950	1,49	4,76E-02	Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit precursor
B2B093	Pa_3_8360	1,48	1,73E-02	Ribose-phosphate diphosphokinase
AOA090CMV1	Pa_5_9170	1,47	2,15E-02	N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein gpi1
B2B542	Pa_2_3430	1,40	3,66E-02	AdoMet-dependent rRNA methyltransferase SPB1
B2AZ56	Pa_3_4190	1,39	3,22E-02	Acyl-CoA desaturase
AOA090C9D6	Pa_1_10550	1,38	4,86E-03	Mitochondrial aminopeptidase 2 precursor
AOA090D6E8	Pa_6_5480	1,37	1,75E-02	Cytochrome c oxidase polypeptide 5 encoded by the cox5 gene
B2AXY2	Pa_1_9220	1,25	1,95E-02	RPN13_C domain-containing protein
B2B2C4	Pa_6_3630	1,21	2,18E-02	BAR domain-containing protein
B2VLC6	Pa_5_5680	0,92	3,74E-02	PaMpk2 Mitogen-activated protein kinase
B2A8U7	Pa_1_7430	0,87	2,43E-02	Phosphomannomutase
B2AUD4	Pa_1_18760	0,85	4,73E-02	26S proteasome regulatory subunit RPN10
B2AYX5	Pa_1_12550	0,83	1,92E-02	Cytochrome c & encoded by the cyc1 protein
AOA090C8X5	Pa_1_7100	0,83	2,40E-02	Putative 14-3-3 protein homolog
B2AYU3	Pa_1_12250	0,81	4,45E-02	Proteasome subunit beta type
B2B022	Pa_3_6050	0,80	2,75E-02	Uncharacterized oxidoreductase
B2B2X8	Pa_6_1760	0,80	1,41E-02	Mitotic checkpoint protein BUB3
AOA090CJV2	Pa_2_9020	0,80	1,68E-02	Nucleoside diphosphate kinase
AOA090CUQ7	Pa_6_4090	0,80	4,71E-02	Carboxymethylenebutenolidase
B2AVQ4	Pa_7_2150	0,79	4,11E-03	Small COPII coat GTPase SAR1 (coat protein complex II)
B2ABD8	Pa_1_6980	0,79	2,85E-02	Putative Prohibitin-2
B2B2Z5	Pa_6_1590	0,78	4,45E-02	Mitochondrial of Acetyl-CoA acetyltransferase
B2B7R5	Pa_2_11990	0,76	4,75E-02	Protein disulfide-isomerase precursor
B2AXA0	Pa_7_9830	0,75	4,10E-03	Putative cysteine synthase
B2AAV4	Pa_1_5290	0,75	4,06E-02	Disulfide-isomerase
B2VL99	Pa_5_5410	0,74	4,40E-02	Histone H2B
AOA090CDE8	/	0,73	3,09 E-02	Inorganic diphosphatase
Q02655	Pa_mito_cob	0,71	2,45E-02	Cytochrome b
B2AT83	Pa_1_14990	0,71	4,56E-02	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase
B2B3L2	Pa_6_6560	0,71	6,53E-03	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase
B2ANV3	Pa_7_1340	0,70	3,43 E-02	Glycoside hydrolase family 17
AOA090CIM7	Pa_4_3160	0,70	1,04E-02	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)

B2AY82	Pa_1_10200	0,67	3,53E-02	Disulfide-isomerase precursor
B2AQX6	Pa_4_9360	0,66	7,90E-03	Fructose-1,6-bisphosphatase
B2AWY5	Pa_7_8710	0,66	2,98E-02	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase
B2B2W2	Pa_6_1920	0,64	5,10E-03	Putative Mitochondrial import receptor subunit TOM20
B2ANQ0	Pa_6_9720	0,64	1,22E-02	Protein similar to YLL023C of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
A0A090D716	Pa_4_7145	0,63	6,27E-03	Putative dioxygenase
B2B3M4	Pa_6_6670	0,59	4,92E-02	Prolyl-tRNA synthetase (Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase)
B2VLI3	Pa_5_6250*	0,55	3,50E-02	Putative lectin
B2B818	Pa_2_13000	0,54	4,18E-02	Protein ECM33 precursor
B2B4B9	Pa_2_750	0,52	4,21E-02	CENP-V/GFA domain-containing protein
B2AFJ9	Pa_5_11830	0,51	4,39E-02	MACPF domain-containing protein
B2AEN0	Pa_5_2040	0,50	4,02E-02	Putative monooxygenase
B2B5E1	Pa_2_4390	0,46	8,73E-03	Putative Glycoside Hydrolase Family 72
B2B5A4	Pa_2_4030	0,45	2,05E-02	Protein similar to SnodProt1 of <i>Phaeosphaeria nodorum</i>
B2AEI8	Pa_5_2440	0,38	3,05E-02	AlcB domain-containing protein
B2AP61	Pa_7_470	0,18	2,00E-02	Protein of unknown function
B2B1G5	Pa_3_10060	0,01	4,49E-03	Heat shock protein family 70 protein
B2B591	Pa_2_3900*	0,00	2,02E-07	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit

Anhang Tabelle 8.2: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant veränderten Proteine nach 24-stündiger Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp. Angegeben sind jeweils die UniProt_IDs der einzelnen Proteine, die ID der „*P. anserina* Genome Project“-Datenbank (Pa_ID), der Faktor („x-fach“) mit den dazugehörigen *p*-Werten ($p < 0,05$) und die jeweilige UniProt-Annotierung. Die Analyse wurde jeweils mit drei biologischen Replikaten durchgeführt. Die Gesamtproteinextrakte der Stämme wurden nach 24-stündiger Behandlung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid isoliert. Die identifizierten Proteine sind nach der Stärke der Anreicherung sortiert. Die grau unterlegten Pa_IDs zeigen die Proteine, welche ebenfalls als potentielle Substrate und Interaktionspartner bei Fischer *et al.* (2015) identifiziert wurden. Die fettgedruckten Pa_IDs heben die Proteine hervor, welche auch ohne Cycloheximid-Behandlung angereichert waren. Die fettgedruckten Pa_IDs mit einem zusätzlichen Sternchen zeigen die Proteine an, welche ohne Cycloheximid-Behandlung reduziert vorlagen. Der rot unterlegte Tabellenabschnitt listet die Proteine auf, welche in $\Delta PaClpP$ signifikant vermindert vorliegen, im Vergleich zum Wildtyp.

UniProt_ID	Pa_ID	x-fach $\Delta PaClpP$ vs. WT	<i>p</i> -Wert	UniProt-Annotierung
B2AS71	Pa_1_22550	539,37	6,20E-07	Reticulon-like protein
B2AFE5	Pa_5_12970	144,09	1,37E-05	Protein of unknown function
B2AV80	Pa_7_3830	118,22	1,31E-05	Mitochondrial LSU ribosomal protein L14 precursor
A0A090CGN1	Pa_3_5750	51,94	6,65E-04	Mitochondrial SSU ribosomal protein L32 precursor
B2B5Z2	Pa_2_6240	3,41	1,39E-02	GMP synthase
B2AFW8	Pa_0_1400	3,19	2,63E-02	Peptide hydrolase/ aminopeptidase Y precursor
B2ARQ6	Pa_4_6710	2,91	1,10E-02	Ribosomal_L33 domain
B2ACX4	Pa_3_11170	2,75	6,08E-04	Biotin synthase 2
B2VL96	Pa_5_5380	2,51	4,63E-03	Complex I-B22
B2ANV7	Pa_7_1300	2,46	1,78E-02	Centromere protein T
B2AKK9	Pa_5_8030	2,08	2,73E-02	Calmodulin
B2AXK5	Pa_7_10880	1,93	2,81E-02	Ornithine aminotransferase
A0A090CVB0	Pa_6_6100	1,91	4,89E-02	Aspartate carbamoyltransferase
B2AUS3	Pa_1_20110	1,85	9,21E-04	Mitochondrial methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain precursor
B2B244	Pa_6_5480	1,81	3,26E-02	Cytochrome c oxidase polypeptide 5 encoded by the <i>cox5</i> gene
B2AND2	Pa_6_10240	1,81	3,88E-02	SEC14 cytosolic factor
B2B4T2	Pa_2_2360	1,78	1,95E-02	60S ribosomal protein Rpl36 isoform 1
B2B148	Pa_3_9290	1,73	3,58E-02	ATP citrate synthase subunit 1
A0A090CMY4	Pa_5_9660	1,68	4,27E-02	NADP-dependent oxidoreductase
B2AT34	Pa_1_14540	1,68	2,11E-02	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 2
B2A8Z7	Pa_1_7930	1,67	4,17E-02	Protein-synthesizing GTPase
A0A090CV63	Pa_6_2130	1,67	5,75E-03	DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC3
B2AVL5	Pa_7_2530	1,61	9,30E-03	Mitochondrial LSU ribosomal protein L31 precursor
B2B270	Pa_6_5750	1,59	9,97E-03	Precursor of Heat shock protein 60 (HSP60)
B2B6R1	Pa_2_8560	1,57	2,56E-02	Mitochondrial SSU ribosomal protein S13 precursor
B2B1N9	Pa_6_3950	1,55	4,02E-04	Threonine synthase
A0A090CUK0	Pa_3_8970	1,53	4,70E-02	Uncharacterized protein (cytochrome c oxidase subunit 6B family)
B2ARC6	Pa_4_7950	1,51	4,06E-02	Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 51 kDa subunit precursor
B2B163	Pa_3_9440	1,31	2,14E-02	Glutamate decarboxylase
B2B010	Pa_3_2310	1,29	1,68E-02	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex
B2ATJ3	Pa_1_16060	1,26	3,97E-02	Serine-threonine kinase receptor-associated protein
A0A090CK22	Pa_4_6720	1,22	2,08E-02	Aspartate/tyrosine/aromatic aminotransferase

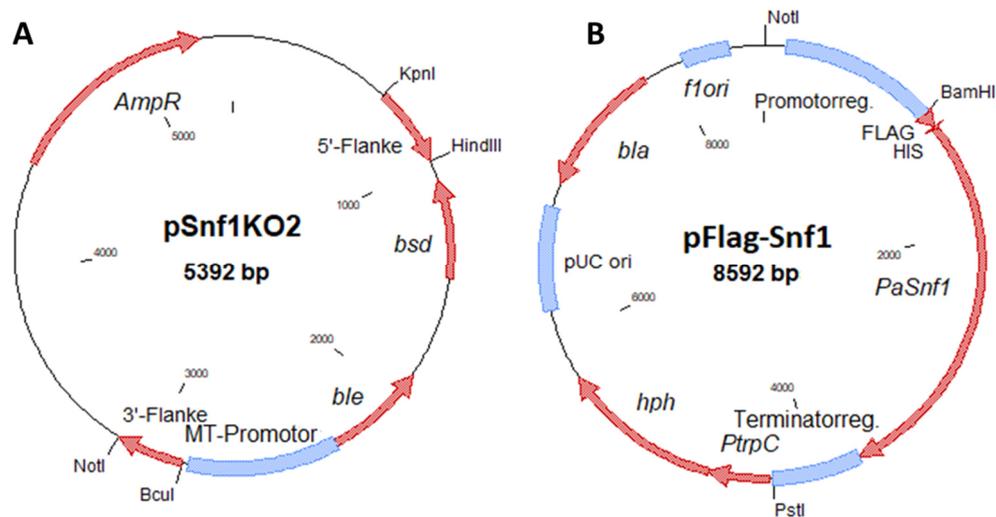
A0A090C9D6	Pa_1_10550	0,85	3,19E-02	Aminopeptidase
B2AQX7	Pa_4_9350	0,83	2,30E-02	Peroxisomal 3-keto-acyl-CoA thiolase encoded by pthik
B2B4A5	Pa_2_610	0,83	2,56E-02	Geranylgeranyl pyrophosphate synthetase involved in carotenoid biosynthesis encoded by the PaAl3 gene
B2B1X2	Pa_6_4750	0,81	4,92E-04	Mitochondrial carrier protein YHM1/SHM1
B2B532	Pa_2_3350	0,80	2,21E-02	Translocon-associated protein subunit alpha precursor
B2B1P5	Pa_6_4010	0,79	4,75E-02	ARP2/3 complex subunit
B2B4F9	Pa_2_1150	0,76	3,87E-02	Cytochrome b5
B2B7B9	Pa_2_10580	0,76	9,35E-03	Mitochondrial import receptor subunit TOM40
B2AUA5	Pa_1_18480	0,76	2,80E-02	Prefoldin subunit 5
A0A090CSU6	Pa_7_2590	0,73	4,63E-02	NADH-cytochrome b5 reductase
B2B4H1	Pa_2_1250	0,73	6,31E-03	Endoplasmic reticulum vesicle protein 25 precursor
B2AYQ9	Pa_1_11920	0,72	9,53E-03	Putative integrin beta-1-binding protein
B2AFR1	Pa_5_12340	0,71	1,68E-02	Protein of unknown function
B2ANH3	Pa_6_10810	0,68	2,41E-02	Mitochondrial ATP18 (ATP synthase J chain)
B2AKM0	Pa_5_7630	0,66	1,97E-03	Putative deaminase
B2AE91	Pa_4_9740	0,63	1,80E-02	Aminopeptidase; Peptide hydrolase
B2AZG2	Pa_3_3590	0,62	1,21E-02	Inhibitor I9 domain-containing protein
B2A8S9	Pa_1_7260	0,61	3,83E-03	SBDS domain-containing protein
B2ADM3	Pa_4_1470	0,60	1,07E-02	Protein of unknown function
A0A090D6C4	Pa_3_7830	0,60	1,25E-02	ER lumen protein-retaining receptor
B2AWJ2	Pa_7_7340	0,59	4,13E-03	Alkaline phosphatase
B2AMB4	Pa_5_7420	0,58	4,76E-02	Protein of unknown function
B2B632	Pa_2_6560	0,49	3,60E-02	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain
B2B3T5	Pa_6_7220	0,47	4,17E-02	Protein of unknown function
B2VLI3	Pa_5_6250*	0,44	4,79E-02	Putative Lectin
B2B2H6	Pa_6_3150	0,41	1,78E-02	26S proteasome regulatory subunit RPN1
B2AAQ6	Pa_1_4840	0,40	2,48E-02	Putative pyrazinamidase/nicotinamidase
B2ABP6	Pa_1_20540	0,40	1,28E-03	Valyl-tRNA synthetase
B2B591	Pa_2_3900*	0,00	1,03E-07	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit



Anhang, Abbildung 8.1: Grafische Darstellung der in $\Delta PaClpP$ identifizierten Metabolite im Vergleich zu den Metaboliten im Wildtyp. Farbcodierte „Heatmap“ mit „ x -fach $\log(2)$ “ von 5d $\Delta PaClpP$ vs. 5d Wildtyp (WT)-Stämmen, 12d $\Delta PaClpP$ vs. 12d WT, 20d $\Delta PaClpP$ vs. 20d WT, 20d WT vs. 5d WT, 20d WT vs. 12d WT, 12d WT vs. 5d WT, 20d $\Delta PaClpP$ vs. 5d $\Delta PaClpP$, 12d $\Delta PaClpP$ vs. 5d $\Delta PaClpP$ und 20d $\Delta PaClpP$ vs. 12d $\Delta PaClpP$. Es wurden jeweils 4 biologische Replikate verwendet. Felder, welche den Wert „1“ oder „-1“ über- bzw. unterschreiten, wurden zur besseren Visualisierung mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. Metabolite, welche bei der massenspektrometrischen Messung an der Nachweisgrenze lagen, wurden mit „‡“ markiert. Signifikante Unterschiede wurden mit einem grauen Stern im Feld hervorgehoben.

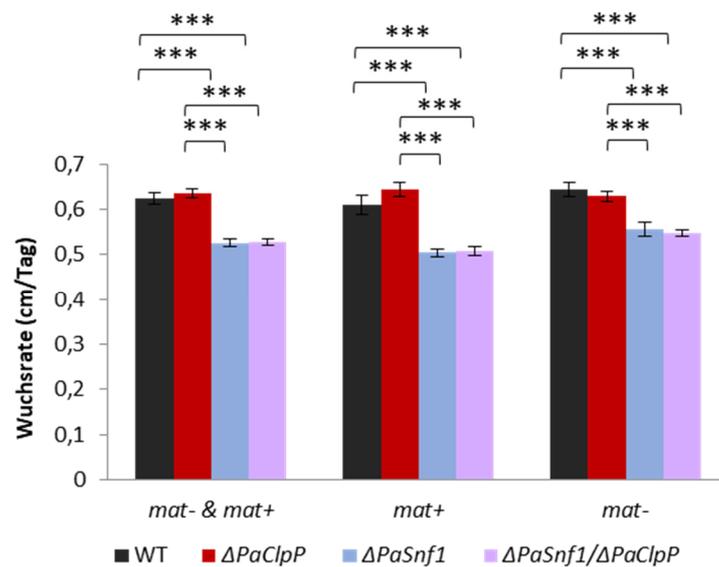
Abkürzungen: Citrat/Isocitrat: Citrat oder Isocitrat; 2-Oxo/Ketoglutarat: 2-Oxoglutarat oder 2-Ketoglutarat; 6-P Hexose: Hexose-6-Phosphat; 1/6-P Hexose: Hexose-1,6-Bisphosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; 2-/3-PG: 2- oder 3-Phosphoglycerat; PEP: Phosphoenolpyruvat; 5-P Ribose/Ribulose: Ribose 5-Phosphat oder Ribulose; 7-P SH: Sedoheptulose 7-Phosphat; 6-PGluc: 6-Phosphogluconat; PPP: Pentosephosphatweg.

p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t -test“ ermittelt. (*: $p < 0,05$ - $p < 0,001$)



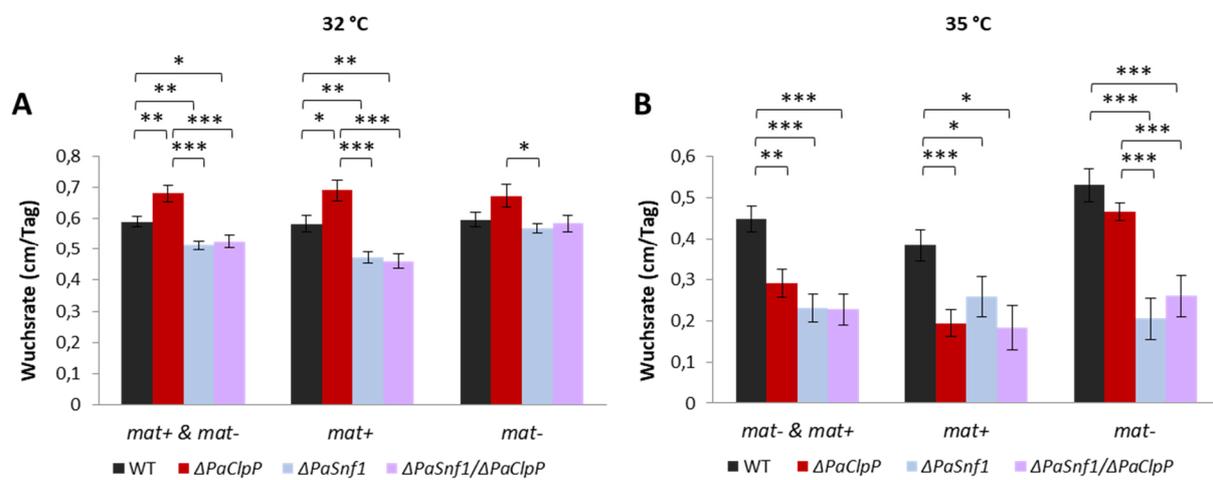
Anhang, Abbildung 8.2: Plasmidkarten pSnf1KO2 und pFlag-Snf1.

(A) Das Plasmid pSnf1KO2 ist 5392 bp groß und enthält eine *Phleomycin*- (*ble*), eine Ampicillin- und eine *Blasticidin*-Resistenzkassette (*bsd*), umgeben von den ca. 250 bp großen *PaSnf1*-Flanken. Zusätzlich enthält dieses Plasmid eine Ampicillin-Resistenzkassette (*AmpR*). Dieses Plasmid diente zur Herstellung eines Deletionscosmid. **(B)** Das Plasmid pFlag-Snf1 ist 8592 bp groß und enthält die vollständige *PaSnf1*-Sequenz, fusioniert mit einem His-Flag-Epitop am 5'-Ende der *PaSnf1*-Sequenz. Das Konstrukt ist umgeben von der *PaSnf1*-eigenen Promotorregion (Promotorreg.) und Terminatorregion (Terminat. PtpC). Zur Selektion in *P. anserina* enthält das Plasmid eine *Hygromycin*-Resistenzkassette (*hph*) unter Kontrolle des *trpC*-Promotors (*PtpC*). Zusätzlich beinhaltet es ein β -Lactamase-Gen (*bla*).



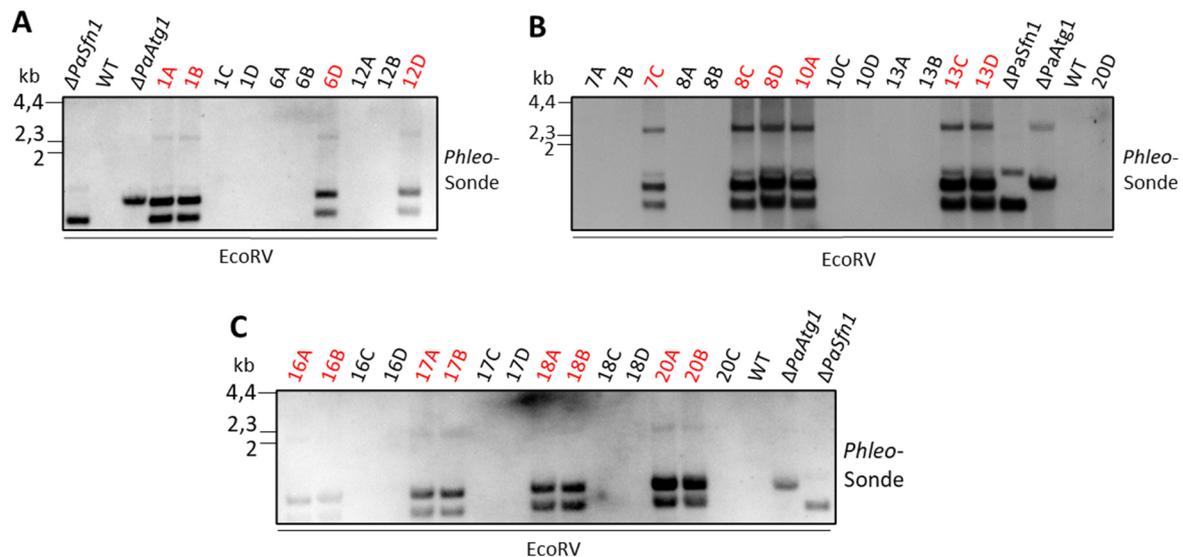
Anhang, Abbildung 8.3: Wuchsraten von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ bei 27 °C und Dauerlicht auf M2-Festmedium.

Wuchsraten in cm/Tag bei 27 °C von monokaryotischen Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ -, und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Nachkommen \pm Standardfehler. Alle angegebenen p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t -test“ bestimmt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (links) Beide Paarungstypen (mat^- & mat^+) zusammengenommen: Wildtyp $n=32$; $\Delta PaSnf1$ $n=28$, $p < 0,001$; $\Delta PaClpP$ $n=22$, $p=0,5188$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=25$, $p < 0,001$. (Mitte) Alle Nachkommen mit Paarungstyp „+“ (mat^+): Wildtyp $n=18$; $\Delta PaSnf1$ $n=16$, $p < 0,001$; $\Delta PaClpP$ $n=10$, $p=0,2641$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=13$, $p < 0,001$. (rechts) alle Nachkommen mit Paarungstyp „-“ (mat^-): Wildtyp $n=14$; $\Delta PaSnf1$ $n=12$, $p < 0,001$; $\Delta PaClpP$ $n=12$, $p=0,4857$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=12$, $p < 0,001$.



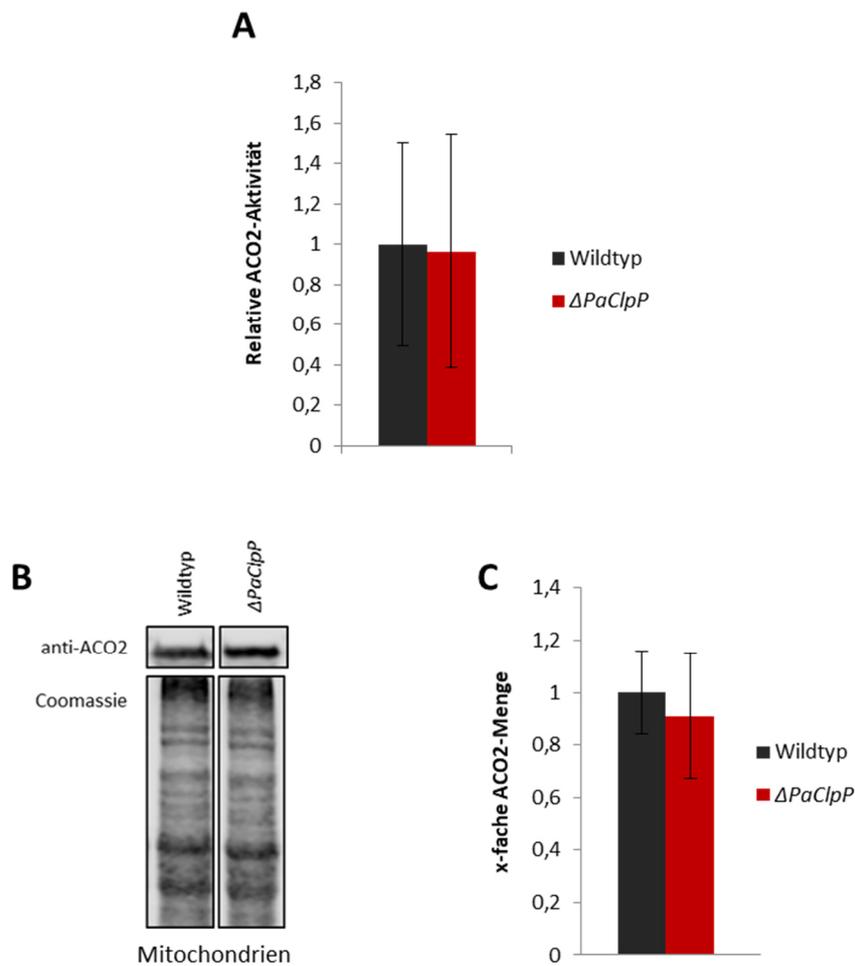
Anhang, Abbildung 8.4: Auswirkung von Hitzestress auf die Wachsraten von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

(A,B) Wachsraten in cm/Tag bei 32 °C (A) oder 35 °C (B) von monokaryotischen Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ -, und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Nachkommen \pm Standardfehler. Alle angegebenen p -Werte wurden mittels des zweiseitigen „Student’s t -test“ bestimmt (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (A, links) Beide Paarungstypen (mat^- & mat^+) zusammengenommen: Wildtyp $n=27$; $\Delta PaSnf1$ $n=24$, $p=0,0015$; $\Delta PaClpP$ $n=22$, $p=0,0037$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=25$, $p=0,0190$. (A, Mitte) Alle Nachkommen mit Paarungstyp „+“ (mat^+): Wildtyp $n=13$; $\Delta PaSnf1$ $n=14$, $p=0,0017$; $\Delta PaClpP$ $n=9$, $p=0,0178$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=12$, $p=0,0020$. (A, rechts) alle Nachkommen mit Paarungstyp „-“ (mat^-): Wildtyp $n=14$; $\Delta PaSnf1$ $n=10$, $p=0,2898$; $\Delta PaClpP$ $n=13$, $p=0,0847$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=15$, $p=0,6559$. (B, links) „ mat^- & mat^+ “: Wildtyp $n=25$; $\Delta PaSnf1$ $n=17$, $p < 0,0001$; $\Delta PaClpP$ $n=28$, $p=0,0013$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=19$, $p < 0,0001$. (B, Mitte) „ mat^+ “: Wildtyp $n=12$; $\Delta PaSnf1$ $n=7$, $p=0,0636$; $\Delta PaClpP$ $n=17$, $p=0,0008$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=8$, $p=0,0061$. (B, rechts) „ mat^- “: Wildtyp $n=13$; $\Delta PaSnf1$ $n=10$, $p < 0,0001$; $\Delta PaClpP$ $n=11$, $p=0,1818$; $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ $n=11$, $p=0,0004$.



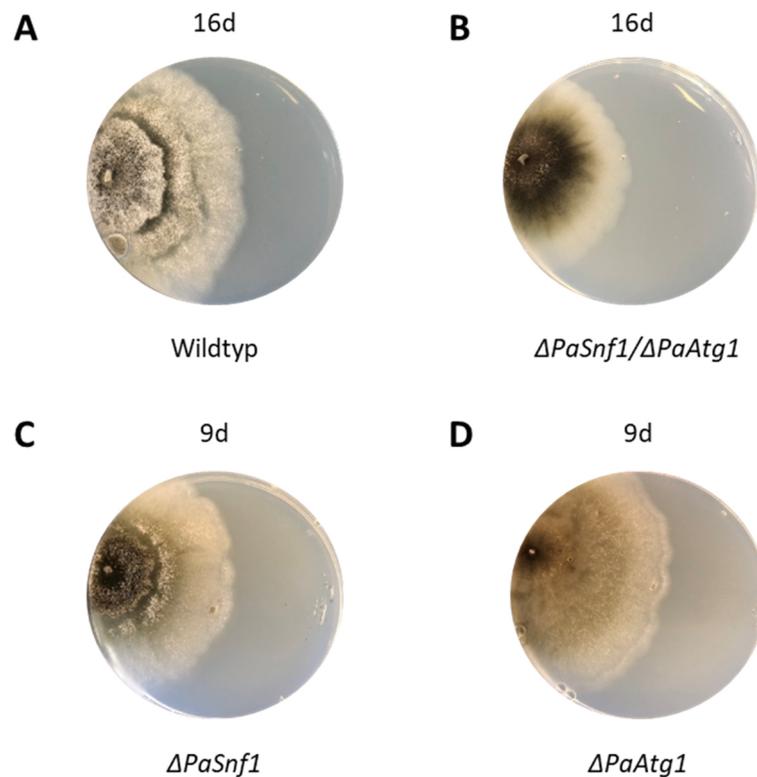
Anhang, Abbildung 8.5: Southern-Blot-Analysen der möglichen $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Stämme.

(A-C) Southern-Blot-Analysen möglicher $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Deletionsmutanten. Proben des Wildtyp-Stammes (WT) wurden als Negativ-Kontrolle und der jeweiligen Einzel-Deletionsmutanten als Positiv-Kontrolle aufgetragen. Es wurden entweder 800 ng (A) oder 1000 ng (B,C) genomischer DNA (gDNA) mit EcoRV behandelt und auf einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der gDNA auf eine Nylon-Membran konnten durch spezifische DIG-markierte Hybridisierungssonden jeweils die Phleomycin-Resistenzkassette nachgewiesen werden (*Phleo*-Sonde = Hybridisierungssonde zur Detektion der Phleomycin-Resistenzkassette). Die verwendeten Doppelmutanten wurden durch eine rote Beschriftung hervorgehoben. Die vorangestellte Zahl stellt die Nummer des isolierten Ascus dar, während die Buchstaben A-D die jeweiligen Sporen innerhalb dieses Ascus repräsentieren.



Anhang, Abbildung 8.6: Aconitase 2 (ACO2)-Aktivitätsmessungen in Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Kulturen.

(A) Aconitase-Aktivitätsmessungen mit isolierten Mitochondrien 7 Tage alter Wildtyp- (n=15) und $\Delta PaClpP$ -Kulturen (n=15). Die Messung erfolgte mit einem Aktivitäts-Assay von Abcam nach Herstellerangaben. Die Kulturen wurden zuvor für 3 Tage auf M2-Medium bei 27 °C und Dauerlicht angezogen, anschließend in CM-Flüssigmedium überführt und für weitere 2 Tage inkubiert. Die durch Ultrazentrifugation isolierten Mitochondrien wurden je 3x für 30 sec bei 50 %-iger Leistung durch Ultraschall aufgeschlossen, bevor die Konzentration bestimmt und die Aconitase-Aktivität gemessen wurde. **(B)** Western-Blot-Analysen von Mitochondrien 7 Tage alter *P. anserina* Stämme (Wildtyp: n=3; $\Delta PaClpP$: n=3). Es wurden je 50 μ g mitochondriale Proteinextrakte auf einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Aconitase 2 wurde mit einem anti-ACO2-Antikörper detektiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel diente hierbei als Ladekontrolle. **(C)** Quantifizierung der Western-Blot-Analyse von (B). Die Aconitase2-Menge wurde auf das mit Coomassie-gefärbte Gel normiert. Die relative Menge der Aconitase 2 des Wildtyps wurde als 1 definiert.



Anhang, Abbildung 8.7: Phänotypische Analysen von $\Delta PaAtg1$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$.

(A-D) Phänotypische Analyse von Wildtyp- (A), $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ - (B), $\Delta PaSnf1$ - (C) und $\Delta PaAtg1$ (D). Dikaryotische Isolate der einzelnen Stämme wurden, nach der zweitägigen Keimung auf BMM-Medium mit Ammonium-Acetat im Dunklen, auf M2-Medium Platten gesetzt und bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Alle 7 Tage wurden die Stämme auf frische Platten umgesetzt und weiter inkubiert. Nach den ersten 7 Tagen wurden die Platten der $\Delta PaAtg1$ - und $\Delta PaSnf1$ -Stämme, nach 14 Tagen die Platten der Wildtyp- und $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Stämme fotografiert. Angegeben ist das Alter zum Zeitpunkt der Aufnahme.

9. Abkürzungsverzeichnis

Dieses Abkürzungsverzeichnis beinhaltet keine Präfixe, mathematische Symbole, Abkürzungen von Aminosäuren oder Gen-Namen, mit Ausnahme von denen, welche im Haupttext erläutert werden.

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
2-/3-PG	2- oder 3-Phosphoglycerat	min	Minuten
µg	Mikrogramm	ml	Milliliter
µl	Mikroliter	mLST8	„mammalian lethal with Sec13 proteine 8“
µM	Mikromolar	mM	Millimolar
AAA	„ATPase associated with diverse cellular activities“	MPQC	„mitochondrial protein quality control“
Abb.	Abbildung	mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
abs.	absolutes	mSIN1	„mammalian stress-activated PK-interacting protein-1“
ACO2	Aconitase2	mTOR	„mammalin target of rapamycin“
ADP	Adenosindiphosphat	mTORC1	„mammalin target of rapamycin complex 1“
AID	„auto-inhibitory domain“	mTORC2	„mammalin target of rapamycin complex 2“
AK	Antikörper	n	Probenzahl
AMP	Adenosinmonophosphat	NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
AOX	Alternative Oxidase	ng	Nanogramm
APS	Ammoniumpersulfat	nm	Nanometer
ATG	„autophagy-related genes/proteins“	OD	optische Dichte
ATP	Adenosintriphosphat	OMM	„outer mitochondrial membrane“
bp	Basenpaar	Pa	<i>Podospora anserina</i>
BCIP	5-Brom-4chlor-3-indoxylphosphat	PAGE	„polyacrylamide gel electrophoresis“
ble ^R	Phleomycin-Resistenzkassette	PAS	prä-autophagosomale Struktur
BMM	Biomalz-Mais-Medium	PBS	„phosphate buffered saline“
BSA	„bovine serum albumin“	PCR	„polymerase chain reaction“
bsp.	Beispielsweise	PE	Phosphatidylethanolamin
CBM	„carbohydrate-binding module“	PEG	Polyethylenglykol
CBS	„cystathionine-β-synthase“	PEP	Phosphoenolpyruvat
CLPP	„caseinolytic peptidase P“	pH	„potentia Hydrogenii“
CLXP	„caseinolytic peptidase XP“	Phleo	Phleomycin
CM	„complete medium“	PKC-α	„protein kinase C-α“
CMA	„chaperon-mediated autophagy“ Chaperon-vermittelte Autophagie	pDNA	„plasmid-like DNA“
CoA	Coenzym A	pmol	Pikomol

COX	Cytochrom-C-Oxidase	PPN-Röhrchen	Polypropylen-Röhrchen
CSPD	„chloro-5-substituted adamantyl-1,2-dioxetane phosphate“	PPP	„pentose phosphate pathway“
d	Tage („days“)	PRAS40	„proline-rich AKT substrate 40 kDa“
DEPTOR	„DEP-domain-containing mTOR-interacting protein“	PVDF	Polyvinylidenfluorid
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat	RAPTOR	„regulatory-associated protein of mTOR“
DIG	Digoxigenin	RICTOR	„rapamycin-insensitive companion of mTOR“
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
DNM1	Dynamin-1	ROS	reaktiven Sauerstoffspezies
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	RT	Raumtemperatur
DTT	Dithiothreitol	s	Sekunden
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SDS	„sodium dodecl sulfate“
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure	SGK1	„serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1“
E _m	molarer Extinktionskoeffizient	SHAM	Salizylhydroxaminsäure
<i>et al.</i>	„ <i>et alii/et aliae/et alia</i> “	SNARE	„soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor“
EtBr	Ethidiumbromid	SNF1	„sucrose non-fermenting 1“
ER	endoplasmatisches Retikulum	SOC	„super optimal broth witch catabolite repression“
ETC	Elektronentransportkette	SOD	Superoxid Dismutasen
FAT-Domänen	(„transactivation domain-associated protein domain“)	STC	Sorbitol-Tris-Calciumchlorid
FRB-Domäne	„rapamycin binding domain“	STET	Saccharose-Tris-EDTA-Triton X-100
g	Gramm	SSC	„saline-sodium citrate“
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat	Tab.	Tabelle
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure	TAE	Tris-Acetat-EDTA
GFP	grün fluoreszierende Protein	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
GTP	Guanosintriphosphat	TCA	Tricarbonsäurezyklus
h	Stunde	TE	Tris-EDTA
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Tel2	„telomere maintenance 2“
hph ^R	Hygromycin-Resistenzkassette	TEMED	Tetramethylethylendiamin
HSC70	„heat shock cognat protein of 70 kDa“	TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS
HSP	„heat shock protein“	Tit1	„Tel2 interacting protein 1“
HTRA2	„high-temperature requirement peptidase 2“	TPS	Transformations-Phosphat-Saccharose-Puffer
Hyg	Hygromycin	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

IAA	Isoamylalkohol	U	“enzyme unit” (Enzymaktivität)
IMM	„inner mitochondrial membrane“	Upm	Umdrehungen pro Minute
IMS	„intermembrane space“	UPR ^{mt}	„mitochondrial unfolded protein response“
kb	Kilobasenpaare	UV	Ultraviolett
kDa	Kilodalton	Ü. N.	über Nacht
LB	„lysogeny broth“	v	„volume“
LKB1	„liver kinase B1“	V	Volt
M2	Medium2	w	„weight“
M2-N	Medium2 ohne Stickstoff	WT	Wildtyp
MBV	„multivesicular bodies“	z. B.	zum Beispiel
mg	Milligramm		

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Kennzeichen der Alterung.

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Elektronentransportkette und deren Lokalisation im Mitochondrium.

Abbildung 1.3: Aufbau der AMP-aktivierten Proteinkinase.

Abbildung 1.4: Aufbau und Funktionen von mTORC1 und mTORC2 bei Säugetieren.

Abbildung 1.5: Arten der Autophagie.

Abbildung 1.6: Aufbau und Funktionsweise von CLPXp.

Abbildung 3.1: Effekt von Leucin auf die Autophagie.

Abbildung 3.2: Effekt von Leucin auf die Lebensspanne und Wachstumsrate .

Abbildung 3.3: Effekt von Butyrat auf die Autophagie.

Abbildung 3.4: Effekt von Butyrat auf die Lebensspanne und Wachstumsrate des Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Stammes.

Abbildung 3.5: Grafische Darstellung der in $\Delta PaClpP$ identifizierten Metabolite im Vergleich zu den Metaboliten im Wildtyp.

Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Deletionscosmid-Herstellung.

Abbildung 3.7: Untersuchung ausgewählter potentiellen *PaSnf1*-Deletionsstämme.

Abbildung 3.8: Phänotypisierung der *PaSnf1*-Deletionsmutante.

Abbildung 3.9: Lebensspannen-Analyse der *PaSnf1*-Deletionsmutante.

Abbildung 3.10: Phänotypische Analysen der $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Doppelmutante.

Abbildung 3.11: Lebensspannen-Analyse von Wildtyp-, $\Delta PaSnf1$ -, $\Delta PaClpP$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ -Stämmen.

Abbildung 3.12: Auswirkung von Hitzestress auf die Lebensspannen von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

Abbildung 3.13: Southern-Blot-Analysen der möglichen $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP/PaSod1::Gfp$ - und $\Delta PaSnf1/PaSod1::Gfp$ -Stämme.

Abbildung 3.14: Rolle der Autophagie in den *PaSnf1*-Deletionsmutanten.

Abbildung 3.15: Lebensspannen-Analysen auf M2-N, einem Autophagie-induzierendem Medium.

Abbildung 3.16: Das Fehlen von PaSNF1 beeinflusst die Mitochondrien-Morphologie.

Abbildung 3.17: PaDNM1-Gehalt in $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

Abbildung 3.18: Mitochondriale Atmung in $\Delta PaClpP$, $\Delta PaSnf1$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

Abbildung 3.19: Die *PaSnf1*-, *PaClpP*- und *PaSnf1/PaClpP*-Deletionsstämme zeigen reduziertes Wachstum auf M2-Glycerin.

Abbildung 3.20: Paraquat-induzierter oxidativer Stress führt zu einer Lebensspannen Verlängerung.

Abbildung 4.1: Übersicht aller putativen Substrate von PaCLPP.

Abbildung 4.2: Übersicht aller signifikant veränderten Metabolite in $\Delta PaClpP$ im Vergleich zum Wildtyp.

Abbildung 8.1: Grafische Darstellung der in $\Delta PaClpP$ identifizierten Metabolite im Vergleich zu den Metaboliten im Wildtyp.

Abbildung 8.2: Plasmidkarten pSnf1KO2 und pFlag-Snf1.

Abbildung 8.3: Wachsraten von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$ bei 27 °C und Dauerlicht auf M2-Festmedium.

Abbildung 8.4: Auswirkung von Hitzestress auf die Wachsraten von $\Delta PaSnf1$, $\Delta PaClpP$ und $\Delta PaSnf1/\Delta PaClpP$.

Abbildung 8.5: Southern-Blot-Analysen der möglichen $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$ -Stämme.

Abbildung 8.6: Aconitase 2 (ACO2)-Aktivitätsmessungen in Wildtyp- und $\Delta PaClpP$ -Kulturen.

Abbildung 8.7: Phänotypische Analysen von $\Delta PaAtg1$ -, $\Delta PaSnf1$ - und $\Delta PaSnf1/\Delta PaAtg1$.

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Liste der verwendeten Gerätschaften inklusive der dazugehörigen Modell- und Herstellerangaben.

Tabelle 2.2: Verwendete Stoffe und Chemikalien mit Hersteller und Bestellnummer.

Tabelle 2.3: Verwendete Lösungen und Puffer mit Rezept und Verwendungszweck.

Tabelle 2.4: Verwendete Anzuchtmedien.

Tabelle 2.5.: Verwendete Stämme.

Tabelle 2.6: Verwendete Kits.

Tabelle 2.7: Verwendete Vektoren.

Tabelle 2.8: Verwendete Oligonukleotide.

Tabelle 2.9: Verwendete Hybridisierungssonden.

Tabelle 2.10: Verwendete Enzyme.

Tabelle 2.11: Verwendete Größenstandards.

Tabelle 2.12: verwendete Antikörper.

Tabelle 2.13: Verwendete Computerprogramme.

Tabelle 2.14: Sonstige Materialien.

Tabelle 2.15: Komponenten eines PCR-Ansatzes.

Tabelle 2.16: Reaktionsschritte der PCR.

Tabelle 2.17: Komponenten eines Restriktionsansatzes.

Tabelle 2.18: Komponenten eines Ligationsansatzes.

Tabelle 3.1: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant angereicherten Proteine nach 24-stündiger Cycloheximid Behandlung im Vergleich zum Wildtyp.

Tabelle 4.1: Übersicht der möglichen Auswirkungen der $PaClpP$ -, $PaSnf1$ -Deletionen und den unterschiedlichen $rmp1$ -Allelen.

Anhang Tabelle 8.1: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant veränderten Proteine ohne Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp.

Anhang Tabelle 8.2: Übersicht der in $\Delta PaClpP$ signifikant veränderten Proteine nach 24-stündiger Cycloheximid-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp.

Konferenzen und Publikationen

Konferenz:

„Deutsche Gesellschaft für Altersforschung/ German Association for Aging Research“ (2019)

Campus-Universität Ulm

Poster: “Role of AMPK in aging and development of *Podospora anserina*.”

Publikation:

Heinz D., Krotova E., Hamann A., Osiewacz H. D. (2021) “Simultaneous ablation of the catalytic AMPK α -subunit SNF1 and mitochondrial matrix protease CLPP results in pronounced lifespan extension”. Front Cell Dev Biol. 9: 616520. doi: 10.3389/fcell.2021.616520