

Untersuchungen
zur
molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase
in dem Ascomyceten
Podospora anserina

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Jürgen Grief
aus Hirschau

Frankfurt am Main (2007)
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. R. Wittig

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

2. Gutachter: Prof. Dr. C. Büchel

Datum der Disputation: 2. November 2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Kupfer - ein Spurenelement	1
1.2 Mitochondrien – die Schlüsselorganellen	12
1.3 <i>Podospora anserina</i> – ein Alterungsmodell	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Chemikalien und Bezugsquellen	21
2.1.3 Medien	23
2.1.4 Antibiotika	25
2.1.5 Puffer und Lösungen	25
2.1.6 Enzyme	27
2.1.7 Antikörper	28
2.1.8 verwendete Kits	28
2.1.9 verwendete DNA- und Protein-Größenstandards	28
2.1.10 verwendete Vektoren und Plasmide.....	29
2.1.11 verwendete Oligonukleotid-Primer.....	30
2.1.12 verwendete Sonden zur Nukleinsäure-Hybridisierung.....	31
2.2 Organismen	31
2.2.1 <i>Podospora anserina</i>	31
2.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
2.2.3 <i>Escherichia coli</i>	32
2.3 Methoden	32
2.3.1. <i>P. anserina</i> -spezifische Methoden:.....	32
2.3.2 <i>S. cerevisiae</i> -spezifische Methoden:.....	36
2.3.3 <i>E. coli</i> -spezifische Methoden:	37
2.3.4 allgemeine molekularbiologische Methoden.....	40
3. Ergebnisse	49
3.1 Identifizierung von direkt mit Kupfer assoziierten Proteinen in <i>P. anserina</i>	49
3.2 Identifizierung und initiale Charakterisierung der Kupfer-Chaperone für die Cytochrom c Oxidase	55
3.3 Direkte Bestimmung der Kupferkonzentration in fraktionierten Zellbestandteilen	76
3.4 Freisetzung von Matrix-Inhalten in der Seneszenz	83
4. Diskussion	92
4.1 Der Transport von Kupfer zur Cytochrome c Oxidase.....	93
4.2 Komponenten der zellulären Kupferhomöostase	100
4.3 Umverteilung von Kupfer zwischen Mitochondrien und Cytoplasma in seneszenten Kulturen.....	104

5. Zusammenfassung	112
6. zitierte Literatur	114
7. Abkürzungsverzeichnis	129
8. Abbildungsverzeichnis	130
Danksagung.....	131
Publikationsliste	132
Lebenslauf	133

1. Einleitung

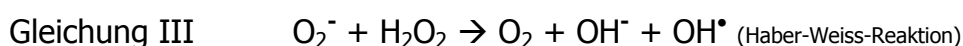
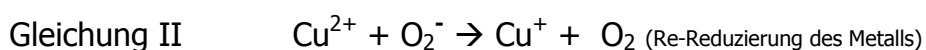
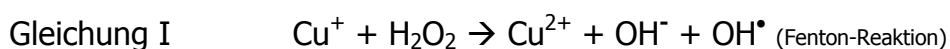
1.1 Kupfer - ein Spurenelement

Das Übergangsmetall Kupfer ist in allen biologischen Systemen ein essentielles Spurenelement. In einer Vielzahl von Enzymen wird es als Co-Faktor benötigt. Die wichtigsten Beispiele darunter sind:

- die Cytochrome c Oxidase (COX - Komplex IV) (EC 1.9.3.1) in der mitochondrialen Atmungskette
- die Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD) (EC 1.15.1.1) im Cytoplasma und im mitochondrialen Intermembranraum
- die Ferroxidase FET3 (EC 1.16.3.1) in der Plasmamembran
- die Tyrosinase (EC 1.14.18.1) im Cytoplasma

Kupfer kommt in zwei verschiedenen Oxidationsstufen sowohl als Cu^+ als auch als Cu^{2+} vor, wobei in Lösung die zweiwertige Form stabiler ist. Der Übergang zwischen beiden Formen erfolgt sehr einfach; d.h. Kupfer kann sehr einfach Elektronen aufnehmen bzw. abgeben. Dadurch wird es zum idealen Partner für Redox-Reaktionen.

Wird jedoch Sauerstoff zum Reaktionspartner, so können sehr leicht sog. „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS – engl. „reactive oxygen species“), die hoch toxisch für die Zelle sind, entstehen. ROS schädigen alle Zellbestandteile, also DNA, Proteine und Lipide. Reagiert Kupfer mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bildet sich in der sog. „Fenton-Reaktion“ (Gleichung I) die wohl gefährlichste und reaktivste ROS-Art, das Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet). Das nun oxidierte Metall wird durch Superoxid-Anionen (O_2^-) wieder reduziert (Gleichung II). In der Gesamtsumme steht eine Reaktion (Gleichung III), die Haber und Weiss bereits 1934 beschrieben haben („Haber-Weiss-Reaktion“; Haber und Weiss 1934) (zusammengefasst in Halliwell und Gutteridge 1984; Koch *et al.* 1997; Valko *et al.* 2005; Singleton und Le Brun 2006).



Einleitung

Dieses relativ einfache Beispiel zeigt deutlich, wie einfach verschiedene ROS miteinander reagieren und ineinander umgewandelt werden können, was die Gefährlichkeit von ROS deutlich unterstreicht.

Sowohl auf weitere Entstehungsmöglichkeiten für ROS und deren Rolle in Alterung und Seneszenz als auch auf die entwickelten Entgiftungsmechanismen wird später deutlicher eingegangen werden.

Aufgrund dessen ist es für die Zelle entscheidend, zu verhindern, dass Kupfer frei - und somit reaktionsbereit - vorliegt. Aus dieser Notwendigkeit heraus hat sich ein fein abgestimmtes System aus Proteinen entwickelt, das alle Aspekte des Kupferstoffwechsels abdeckt und somit dafür sorgt, dass sowohl Aufnahme, Speicherung, Verteilung, Weiterleitung und Verwendung von Kupfer stets proteingebunden erfolgen. Dieses System ist derart effektiv, dass in einer Hefezelle weniger als ein Atom Kupfer nicht-gebunden vorliegt (Rae *et al.* 1999). Der bezüglich der molekularen Kupferhomöostase am besten untersuchte Organismus ist die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*, wobei auch hier bislang viele Mechanismen nur ansatzweise verstanden und etliche Details noch völlig unklar sind. Mehrere Aspekte, wie z.B. der Transport von Kupfer zur COX (s.u.), haben sich als deutlich komplexer und komplizierter erwiesen, als ursprünglich angenommen.

Generell scheinen die Ergebnisse aus Hefe über den prinzipiellen Ablauf des Kupferhaushalts auf alle anderen Eukaryonten übertragbar zu sein, auch wenn sich deutliche Unterschiede in Detailmechanismen gezeigt haben.

In letzter Zeit sind mehrere hervorragende Übersichtartikel über das Thema „Kupferhomöostase“ in verschiedenen Organismen erschienen (Puig und Thiele 2002; Rutherford und Bird 2004; Balamurugan und Schaffner 2006; Grotz und Guerinot 2006; Pilon *et al.* 2006; Puig *et al.* 2007), was die Bedeutung und die Fortschrittsgeschwindigkeit auf diesem Feld der Wissenschaft zeigt.

In Abbildung 1 sind die in *S. cerevisiae* bislang erarbeiteten Erkenntnisse schematisch dargestellt.

Die folgenden Erläuterungen beziehen sich – soweit nicht explizit erwähnt – stets auf die Situation in *S. cerevisiae*.

Einleitung

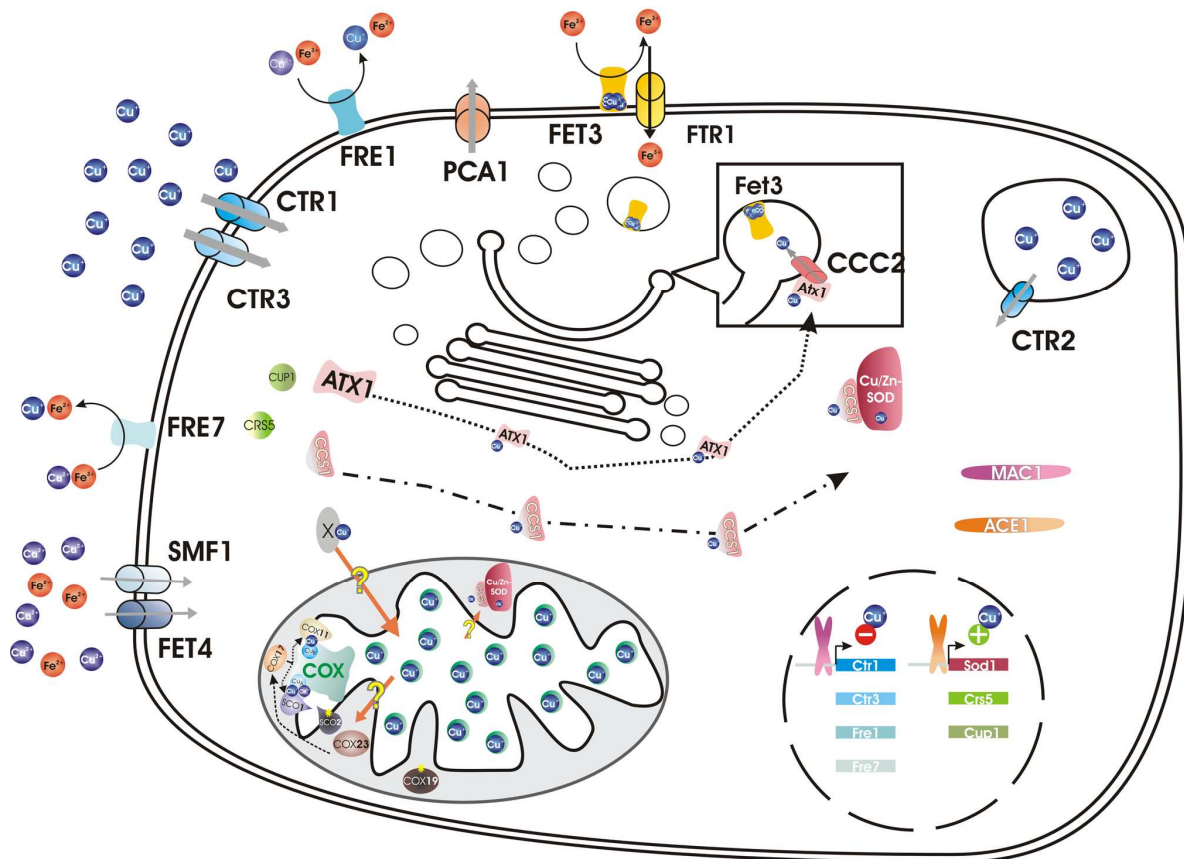


Abb. 1: Schematische Übersicht über die Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase in *S. cerevisiae*. Dargestellt sind alle bislang mit dem Kupferstoffwechsel assoziierten Proteine, die für die Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Verwendung von Kupfer zuständig sind. Nähere Erläuterungen siehe Text.

Kupfer-Transporter

Für die Aufnahme von Kupfer aus dem Aussenmedium stehen *S. cerevisiae* in der Plasmamembran jeweils zwei Kupfertransporter unterschiedlicher Affinität zur Verfügung. CTR1 und CTR3 besitzen eine hohe Affinität und Spezifität gegenüber Kupfer (Dancis *et al.* 1994; Knight *et al.* 1996), SMF1 und FET4 transportieren allgemein zweiwertige Ionen mit niedriger Affinität (Dix *et al.* 1994; Supek *et al.* 1996; Hasset *et al.* 2000). Auch wenn CTR1 und CTR3 redundant erscheinen, so unterscheiden sich beide deutlich auf Aminosäureebene (Pena *et al.* 2000) und auch in ihrer Regulation. Während beide ähnlich in der Transkription durch den Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktor MAC1 (s. u.) reguliert werden, so wird nur CTR1 auch auf Proteinebene über die Rate der Degradierung kupferabhängig reguliert (Ooi *et al.* 1996). Interessanter Weise wird in vielen häufig genutzten Laborstämmen der Bäckerhefe durch eine Insertion des Transposons Ty2 zwischen Promotor und Transkriptionsstart die Transkription von *Ctr3* vollständig verhindert (Knight *et al.*

Einleitung

1996). Die für die Aufnahme durch CTR1 bzw. CTR3 notwendige Reduktion des Kupfers von Cu^{2+} zu Cu^+ erfolgt durch membranständige Reduktasen FRE1 bzw. FRE7 (Hasset und Kosman 1995; Georgatsou *et al.* 1997; Martins *et al.* 1998). Ein CTR1 strukturell sehr ähnlicher Transporter ist CTR2, jedoch befördert dieser Kupfer aus der Vakuole in das Cytoplasma (Portnoy *et al.* 2001; Rees *et al.* 2004). Ursprünglich wurde CTR2 als Niedrigaffinitäts-Kupfertransporter in der Plasmamembran (Kampfenkel *et al.* 1995) identifiziert. Auch in *P. anserina* konnte CTR2 mittlerweile in der Vakuole lokalisiert werden (K. Masic 2007). Dies unterstreicht die Bedeutung der Vakuole als Kupferspeicher und deren Beitrag zum Kupferhaushalt der Zelle.

Nur geringfügige Mutationen in CTR2 in Hefe (ein Aminosäureaustausch am N-Terminus, Verlust der letzten 16 Aminosäuren am C-Terminus) führen zu einer Lokalisierung des Proteins in die Plasmamembran, wo es die Transporter CTR1/CTR3 vollständig ersetzen kann (Rees *et al.* 2004).

Neben den Transportern der CTR-Familie besitzt *S. cerevisiae* Transporter, die Kupfer innerhalb der Zelle in Kompartimente bzw. aus der Zelle heraus befördern. Dazu gehört das Plasmamembran-ständige PCA1, wobei hier nicht abschließend geklärt ist, inwieweit diese P-Typ ATPase tatsächlich Kupfer transportiert oder nur durch Bindung von Kupfer im C-terminalen Teil zur Entgiftung hoher Kupferkonzentrationen beiträgt (Rad *et al.* 1994; Adle *et al.* 2007). Es wird interessant zu sehen, ob PCA1 tatsächlich als eine Art „Kupferventil“ bei zu hoher cytoplasmatischer Kupferkonzentration dienen kann. Für das menschliche Homolog einer weiteren Kupfer-pumpenden ATPase vom P-Typ konnte ebendiese Funktion nachgewiesen werden (Petris *et al.* 1996). Das sog. Menke-Protein (MNK – kodiert durch *Atp7a*; Vulpe *et al.* 1993), ein Homolog zum Hefeprotein CCC2, das unter normalen Bedingungen Kupfer vom Cytosol in die Vesikel des Post-Golgi-Apparates pumpt, verändert unter hohen cytoplasmatischen Kupferkonzentrationen seine Lokalisierung und wandert in die Plasmamembran, wo es als Efflux-Pumpe für das überschüssige Kupfer wirkt (Petris *et al.* 1996). Mutationen in diesem Protein und dem sehr ähnlichen sog. Wilson-Protein (WD – kodiert durch *Atp7b*; Petrukhin *et al.* 1994) führen im Menschen zu schweren Erbkrankheiten, der Morbus Menke bzw. Morbus Wilson.

Einleitung

Das Kupfer, das durch die genannte ATPase – bezeichnet als CCC2 in Hefe (Fu *et al.* 1995; Yuan *et al.* 1995), MNK bzw. WD in Mensch (Vulpe *et al.* 1993; Petrukhin *et al.* 1994), RAN1 in *A. thaliana* (Hirayama *et al.* 1999) – aus dem Cytoplasma in die Post-Golgi-Vesikel gepumpt wird, wird dort hauptsächlich in die multi-Kupfer Eisen-Oxidase FET3 eingebaut (Yuan *et al.* 1995). Das menschliche Homolog zu FET3 ist Ceruloplasmin (Goldstein *et al.* 1979; Takahashi *et al.* 1984; de Silva *et al.* 1997; Mukhopadhyay *et al.* 1998). FET3 wird über Vesikel an die Plasmamembran transportiert und oxidiert dort extrazelluläres Eisen von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , welches dann durch ein Transportprotein (FTR1) aufgenommen werden kann (Stearman *et al.* 1996; Attieh *et al.* 1999; Singh *et al.* 2006). Zusammen bilden FET3 und FTR1 einen Hochaffinitäts-Eisenaufnahme-Komplex (Kosman 2003; Singh *et al.* 2006). Die Abhängigkeit der Funktion von FET3 und somit der hochaffinen Eisenaufnahme von Kupfer zeigt eine enge Verknüpfung dieser beiden Stoffwechselwege (Kosman 2002; Puig *et al.* 2007).

Pufferung und Speicherung von Kupfer

Wird mehr Kupfer aufgenommen bzw. strömt mehr Kupfer aus dem Aussenmilieu in die Zelle, als direkt an die Kupfer-abhängigen Enzyme weitergeben werden kann, so wird die Expression von sog. Metallothioneinen induziert (Hamer 1986). Metallothioneine sind kurze, Cystein-reiche Proteine, die sehr effektiv Kupfer und andere Metalle binden können (Richards 1989; Palmiter 1998; Davis and Cousins 2000; Coyle *et al.* 2002). Die Bindung der Metalle erfolgt über Cys-X-Cys bzw. Cys-X-X-Cys Motive und führt dazu, dass pro Metallothionein acht bis zwölf Atome des entsprechenden Metalls gebunden werden können (Kägi und Schäffer 1988; Waalkes und Göring 1990). Die Zahl der Metallothionein-Isoformen variiert zwischen den unterschiedlichen Organismen von nur einem in *P. anserina* (PaMT1 – Averbek *et al.* 2001) bis hin zu sieben in *A. thaliana* (Zhou und Goldsbrough 1994; Zhou und Goldsbrough 1995; Averbek *et al.* 2001; Cobbett und Goldsbrough 2002; Guo *et al.* 2003). In Hefe sind zwei Metallothioneine, CUP1 (Karin *et al.* 1984; Winge *et al.* 1985) und CRS5 (Culotta *et al.* 1994), bekannt, wobei CUP1 effektiver in der Bindung und Pufferung von überschüssigem Kupfer ist als CRS5 (Jensen *et al.* 1996).

Auch die Cu/Zn-SOD scheint eine gewisse Pufferkapazität für freies Kupfer zu besitzen, die über die rein für ihre Aktivität benötigte Menge hinausgeht (Culotta *et*

Einleitung

al. 1995). Inwieweit auch andere von Kupfer abhängigen Enzyme ähnliche Pufferfunktion übernehmen können, ist bislang noch nicht bekannt, aber durchaus denkbar.

Es konnte gezeigt werden, dass außer von freien Metallionen die Expression von MT auch von ROS induziert werden kann (Andrews 2000; Reinecke *et al.* 2006). Die menschliche Isoform MT2A in HeLa-Zellen kann dadurch nachweislich eine gewisse Schutzfunktion gegen in den Mitochondrien produzierte ROS ausüben (Reinecke *et al.* 2006). Eine Reaktion von isolierten Ratten-MT1 mit ROS konnte bereits früher gezeigt werden (Thornalley und Vasak 1985), was damals schon die Möglichkeit einer Funktion in der ROS-Entgiftung eröffnete. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob auch die Induktion der MT-Expression durch hohe Kupferkonzentrationen im Medium direkt über Kupfer oder über durch freies Kupfer entstehende ROS verläuft (Mattie und Freedman 2004; Song und Freedman 2005; Reinecke *et al.* 2006).

Kupfer-regulierte Transkriptionsfaktoren

Auch wenn mehrere der an der Kupferhomöostase beteiligten Komponenten über die Proteinstabilität und/oder –lokalisierung in ihrem Vorkommen und ihrer Menge reguliert werden (Petris *et al.* 2003; Bertinato und L'Abbé 2004), bleibt die Regulation der Transkription der wichtigste Weg der Zelle, auf Veränderungen in der Kupferverfügbarkeit zu reagieren. Kommt es zum Kupfermangel, werden die benötigten Komponenten der Cu-Transportsysteme induziert, bei Kupferüberschuss wiederum die Komponenten der Puffersysteme. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, haben sich im Laufe der Evolution zwei verschiedene Systeme entwickelt: in niederen Eukaryonten und (wahrscheinlich) auch Pflanzen gibt es zwei Transkriptionsfaktoren – einer der durch Kupfer aktiviert, einer der reprimiert wird – wohingegen von Insekten bis hin zu Säugern offenbar nur ein Kupfer-regulierter Transkriptionsfaktor existiert (Rutherford und Bird 2004, Balamuragan und Schaffner 2006).

In *S. cerevisiae* wurde der Kupfer-aktivierte Transkriptionsfaktor ACE1 (Thiele 1988; Buchman *et al.* 1989), der Kupfer-reprimierte Transkriptionsfaktor MAC1 (Jungmann *et al.* 1993; Labbé 1997; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1997) benannt.

Einleitung

Weitere Beispiele Kupfer-aktivierter Transkriptionsfaktoren sind AMT1 aus *C. glabrata* (Zhou und Thiele 1991) und CRF1 aus *Y. lipolytica* (Garcia *et al.* 2002). GRISEA (Osiewacz und Nuber 1996) aus *P. anserina* (s.u.) und CUF1 aus *S. pombe* (Labbé *et al.* 1999) sind bekannte Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität durch Kupfer reprimiert wird.

Beide Transkriptionsfaktoren in Hefe interagieren direkt mit Kupfer, wodurch ihre Konformation, ihre Bindung an die MREs („metal responsive elements“ – engl. „auf Metall reagierende Elemente“) der DNA und dadurch ihre Aktivität verändert wird (Fürst *et al.* 1988; Dameron *et al.* 1991; Jensen und Winge 1998; Jensen *et al.* 1998). Als Zielgene von ACE1 sind die beiden Metallothioneine CUP1 und CRS5 (Thiele 1988; Culotta *et al.* 1994) und die Cu/Zn-SOD (Gralla *et al.* 1991) bekannt; alle drei Proteine dienen der Bindung und Pufferung von freiem Kupfer (s.o.). Im Gegensatz zum von ACE1 aktivierten Schutzsystem werden durch MAC1 Gene angeschaltet, die für die Aufnahme von Kupfer entscheidend sind. Dazu gehören die beiden Hochaffinitäts-Kupfertransporter CTR1 und CTR3 und die beiden Reduktasen FRE1 und FRE7, die das zweiwertige Cu^{2+} zum für die Transporter verfügbaren einwertigen Cu^+ reduzieren (Georgatsou *et al.* 1997; Labbé *et al.* 1997; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1997; Martins *et al.* 1998). So soll der offenbar vorherrschende Kupfermangel behoben werden. Auch für den Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktor GRISEA aus *P. anserina* ist *PaCtr3* als Zielgen bekannt (Borghouts *et al.* 2002 A).

Deutlich weniger ist über die Detailmechanismen der Transkriptionsaktivierung von MTF1, dem einzigen Kupfer-regulierten Transkriptionsfaktor in höheren Eukaryonten bekannt. Viele Erkenntnisse wurden durch Forschung in der Arbeitsgruppe von Walter Schaffner an *Drosophila melanogaster* gewonnen (zusammengefasst in Lichtlen und Schaffner 2001; Balamuragan und Schaffner 2006). Durch Kupferzugabe wird mittels MTF1 die Transkription von Metallothioneinen induziert – sowohl in menschlichen Zellen als auch in *D. melanogaster* (Heuchel *et al.* 1994; Zhang *et al.* 2001; Egli *et al.* 2003). Interessanterweise konnte für MTF1 gezeigt werden, dass er auch für den Umgang mit den gegenteiligen Bedingungen, d.h. Kupfermangel, verantwortlich ist (Selvaraj *et al.* 2005). Steht den Fliegenlarven nicht ausreichend Kupfer zur Verfügung, so ist MTF1 essentiell für die Aktivierung der Expression von *Ctr1b*, das für einen Hochaffinitäts-Kupfertransporter codiert. Man spekuliert, dass die Anordnung der

Einleitung

MREs im Promotor der Zielgene und eventuelle zusätzliche Repressoren im Detail dafür verantwortlich sind, dass ein Transkriptionsfaktor beide Extreme – Mangel und Überschuss an Kupfer – bedienen kann (Selvaraj *et al.* 2005).

Für MTF1 konnte bislang keine direkte Interaktion mit Kupfer, wohl aber mit Zink, nachgewiesen werden (Dalton *et al.* 1997; Bittel *et al.* 1998). Die über die vorherrschende Kupfermenge erfolgende Regulation wäre entweder dadurch zu erklären, dass weitere Proteinfaktoren den Kontakt zwischen MTF1 und Kupfer herstellen, oder dadurch, dass Kupfer das Zink, das an den größten Teil des Metallothioneins gebunden ist, von den Metallothioneinen verdrängt und das so freigesetzte Zink mit MTF1 direkt wechselwirkt (Dalton *et al.* 1997; Bittel *et al.* 1998; Günes *et al.* 1998; Andrews 2000; Lichtlen und Schaffner 2001; Zhang *et al.* 2003; Balamaguran und Schaffner 2006). Da auch H₂O₂ MTF1 aktivieren kann, dazu aber das Vorhandensein von Zink-gesättigtem Metallothionein notwendig ist (Zhang *et al.* 2003) ist die letztgenannte Möglichkeit die favorisierte. Denkbar wäre aber ebenfalls die Regulierung der Phosphorylierung und/oder des Kernimports (Lichtlen und Schaffner 2001; Balamaguran und Schaffner 2006).

Kupfer-Transport durch Kupferchaperone

Der Transport von Kupfer zu den „Endverbrauchern“, d.h. zu den Enzymen, die Kupfer als Co-Faktor benötigen, erfolgt über sog. Kupferchaperone. Drei Transport- und Einbauwege sind dabei besonders gut untersucht:

- zur ATPase CCC2 in den Post-Golgi-Vesikeln durch ATX1
- zur Cu/Zn-SOD durch CCS1
- zur Cytochrom c Oxidase (COX) in den Mitochondrien; daran sind mindestens fünf Proteine (COX23, COX17, SCO1, SCO2, COX11), wahrscheinlich noch mehr (z.B. COX19) beteiligt

Für alle drei Stoffwechselwege ist das Ziel des Kupfers klar bekannt, aber für keinen konnte bislang der Kupferdonor detailliert ausgemacht werden; d.h. es ist nicht klar, woher die einzelnen Kupferchaperone das Kupfer bekommen. Nur die Abhängigkeit von den Kupfertransportern für die Akquirierung von Kupfer ist unbestritten (Portnoy *et al.* 2001). Dabei spielen sowohl die Transporter in der Plasmamembran (CTR1, CTR3, FET4, SMF1) und somit extrazelluläres Kupfer, aber auch CTR2, der in der

Einleitung

Vakuole gespeichertes Kupfer mobilisieren kann, eine Rolle (Portnoy *et al.* 2001; Rees *et al.* 2004).

Ursprünglich wurde ATX1 identifiziert als ein Protein, das, wenn überexprimiert, den Verlust der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase in Hefe kompensieren kann (Lin und Culotta 1995). Daher auch der Name ATX1, das für „Anti-Oxidant“ steht. Diese Funktion beruht aber nicht auf katalytischer Aktivität des Proteins, sondern vielmehr wahrscheinlich auf der Reaktion von Superoxid mit dem Cu-ATX1-Komplex (Portnoy *et al.* 1999). Diese Kupferbindung ist offenbar die Hauptaufgabe von ATX1, es transportiert das Kupfer zur ATPase CCC2 in den Post-Golgi-Vesikeln (Lin *et al.* 1997; Pufahl *et al.* 1997; Arnesano *et al.* 2001). In den Vesikeln wird Kupfer in die Eisenoxidase FET3 eingebaut, die Bestandteil des Hochaffinität-Eisenimports ist (s.o.). Die offensichtliche Bedeutung von ATX1 für den Eisenhaushalt wird auch dadurch deutlich, dass die Expression von *Atx1* durch den Eisen-regulierten Transkriptionsfaktor AFT1 reguliert wird (Lin *et al.* 1997). Die Erkennung und Übergabe des Kupfers zwischen ATX1 und seinem Zielmolekül CCC2 erfolgt wahrscheinlich durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen ATX1 und einer Domäne von CCC2, die strukturell dem ATX1-Protein sehr ähnlich ist (Arnesano *et al.* 2001; Rosenzweig 2001).

Homologe von ATX1 konnten in Pflanzen (CCH - Himmelblau *et al.* 1998), *C. elegans* (CUC-1 - Wakabayashi *et al.* 1998) und Menschen (HAH1 bzw. ATOX1 - Klomp *et al.* 1997; Hung *et al.* 1998) identifiziert werden. Da der Ausfall der menschlichen CCC2-Homologe MKD und WD (siehe oben) stark ausgeprägte klinische Folgen hat, ist die Kupferversorgung der beiden mittels ATOX1 sehr gut und genau charakterisiert (Hamza *et al.* 1999; Larin *et al.* 1999; Rosenzweig 2001; Rosenzweig 2002; Walker *et al.* 2004; Wernimont *et al.* 2004).

Das Chaperon, das Kupfer zur Cu/Zn-SOD transportiert und insertiert, wurde CCS1 (für „Copper-Chaperone for SOD“) genannt (Culotta *et al.* 1997). Es wird durch das Gen *Lys7* kodiert und wurde ursprünglich als Bestandteil des Lysin-Stoffwechsels identifiziert (Horecka *et al.* 1995; Culotta *et al.* 1997). Neben der Insertion von Kupfer in das Apo-Protein der SOD scheint CCS1 auch für die Ausbildung einer essentiellen Disulfid-Bindung zuständig zu sein (Furukawa *et al.* 2004). Seine Funktion für die Reifung der Cu/Zn-SOD erfüllt CCS1 nicht nur im Cytosol, sondern

Einleitung

auf gleiche Weise auch im mitochondrialen Intermembranraum, wo ebenfalls Cu/Zn-SOD-Protein nachgewiesen wurde (Sturtz *et al.* 1999; Field *et al.* 2003).

CCS1 ist in drei klar definierbare Domänen gegliedert (Lamb *et al.* 1999; Schmidt *et al.* 1999B; Lamb *et al.* 2000). Die erste Domäne scheint für die effektive Akquirierung von Kupfer zuständig zu sein, die zweite erkennt das Zielmolekül und die dritte vermittelt, ggf. in Zusammenarbeit mit Domäne I, den Einbau von Kupfer (Schmidt *et al.* 1999 B).

Die Domäne II, zuständig für die Erkennung der Cu/Zn-SOD, ist eben zu dieser sehr homolog. Der Austausch von nur einer Aminosäure kann auch in CCS1 enzymatische katalytische Aktivität erzeugen (Schmidt *et al.* 1999 A). Dieser Mechanismus der Zielerkennung ähnelt dem Mechanismus bei ATX1 und CCC2, wobei hier nicht die Gesamtstruktur ähnlich ist, sondern vielmehr nur die Bereiche, an denen die jeweiligen Proteine dimerisieren (Casareno *et al.* 1998; Schmidt *et al.* 1999 A; O`Halloran und Culotta 2000; Rosenzweig 2001). Sowohl CCS1 als auch die Cu/Zn-SOD sind funktionelle Dimere. Für die Übergabe und den Einbau scheint es somit zu einer Interaktion über diese Bereiche und die transiente Bildung von Heterodimeren zu kommen (Lamb *et al.* 2001; Rosenzweig 2002; Culotta *et al.* 2006).

Während für den Transport zu und den Einbau in die Cu/Zn-SOD und CCC2 nur jeweils ein Protein von Nöten ist, so scheint es sich bei der Kupferversorgung der Cytochrom c Oxidase in der inneren mitochondrialen Membran um einen viel komplizierteren Prozess zu handeln, an dem mindestens fünf Proteine (COX17, SCO1, COX11, SCO2, COX23) beteiligt sind. Zu Beginn der Forschungen an diesem Themenkomplex ging man von einer relativ einfachen Abfolge aus: COX17 nimmt Kupfer im Cytoplasma auf, transportiert es in den Intermembranraum (IMS), wo SCO1 entweder über den IMS oder die Matrix Kupfer in die COX einbaut (Glerum *et al.* 1996 A, Glerum *et al.* 1996 B). Bei dem Versuch, die offenen Fragen zu klären, wurden jedoch weniger Fragen beantwortet, als vielmehr zusätzliche Fragen aufgetan. Das Bild, das sich jetzt nach und nach ergibt, zeigt einen viel detailreicheren und komplexeren Mechanismus. Dabei scheinen einige der beteiligten Proteine offenbar Funktionen, die über den reinen Kupfertransport hinausgehen, zu besitzen (zusammengefasst in Carr und Winge 2003; Khalimonchuk und Rödel 2005; Zee und Glerum 2006; Cobine *et al.* 2006 A; Pierrel *et al.* 2007).

Einleitung

Als experimentell hinreichend abgesichert gelten bislang folgende Schritte in der Kupferversorgung der COX:

- COX 17 transferiert Kupfer spezifisch an SCO1 und COX11 (Horng *et al.* 2004).

- COX17 ist aber nicht das Chaperone, das Kupfer aus dem Cytoplasma zu den Mitochondrien bringt, denn: A) ist es auch funktionell, wenn es an der inneren mitochondrialen Membran verankert wird (Maxwell *et al.* 2004); ein Pendeln zwischen Cytosol und IMS ist also nicht essentiell B) konnte ein weiteres Protein, COX23, identifiziert werden, das wahrscheinlich im Stoffwechselweg COX17 vorgeschaltet ist (Barros *et al.* 2004; Cobine *et al.* 2006 A).

- SCO1 und COX11 sind für den Einbau von Kupfer in die sog. „Cu_A-Site“ bzw. „Cu_B-Site“ in der COX-Untereinheit II bzw. I verantwortlich (Dickinson *et al.* 2000; Lode *et al.* 2000; Carr *et al.* 2005; Khalimonchuk *et al.* 2005; Banting und Glerum 2006)

- Das Kupfer, das in der COX verbaut ist, stammt aus der mitochondrialen Matrix, nicht aus dem Cytosol (Cobine *et al.* 2004; Cobine *et al.* 2006 B; K. Jezek 2005)

Diesen relativ unumstrittenen Gegebenheiten stehen viele wichtige offene Fragen gegenüber: Wie kommt Kupfer in die mitochondriale Matrix und von dort zurück in den Intermembranraum? Welche genauen Funktionen besitzen SCO2, COX19 und COX23 (Glerum *et al.* 1996 B; Nobrega *et al.* 2002; Barros *et al.* 2004; Rigby *et al.* 2007)? Welche Bedeutung haben die offensichtlichen „Zusatzfunktionen“ von SCO1 und COX11 in der Abwehr gegen oxidative Schäden für die Kupferversorgung der COX und den generellen Zellmetabolismus (Williams *et al.* 2005; Banting und Glerum 2006; Khalimonchuk *et al.* 2007)?

Hefestämme, die eine Deletion von *Sco1* bzw. *Cox11* tragen, zeigen eine übersteigerte Empfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid (Williams *et al.* 2005; Banting und Glerum 2006; Khalimonchuk *et al.* 2007). Diese Hypersensitivität ist jedoch auf H₂O₂ beschränkt. Andere Reagenzien, die standardmäßig zur Erzeugung intrazellulären oxidativen Stress' genutzt werden (z.B. Paraquat), haben keinen Effekt (Banting und Glerum 2006). Für SCO1 wurde aufgrund von Sequenz- und Strukturähnlichkeiten bereits länger schon über eine Funktion als Redox-Sensor (Williams *et al.* 2005) bzw. Thiol-Disulfit Oxidoreduktase (McEwan *et al.* 2002) spekuliert. In der Arbeitsgruppe von D. R. Winge konnte kürzlich

Einleitung

gezeigt werden, dass beide Proteine (SCO1 und COX11) eine wichtige Funktion in der Vermeidung und Entfernung von pro-oxidativen Zwischenstufen aus COXI und Häm in der Assemblierung der COX übernehmen, die unabhängig von der Kupferbindung ist (Khalimonchuk *et al.* 2007). Die Forschungen zu diesem gesamten Themenkomplex stehen jedoch noch am Anfang.

Vor allem bei den beiden SCO-Proteinen SCO1 und SCO2 scheint es sich um sehr wichtige Schlüsselfaktoren zu handeln. In Hefe ist SCO1 essentiell für die Kupferinsertion in die COX, scheint aber auch bei der Abwehr oxidativer Schäden und Wahrnehmung des Redox-Status des IMS involviert zu sein. Die Funktion von SCO2 ist nur ansatzweise verstanden, sie scheint aber teilweise mit der von SCO1 zu überlappen (Glerum *et al.* 1996 B; Lode *et al.* 2002). Auch im Menschen finden sich zwei SCO-Proteine, wobei es sich hierbei offenbar um paraloge Proteine – d.h. sie gehen auf eine unabhängige Genverdopplung zurück und stammen nicht wie Hefe von einem gemeinsamen Vorgängerpaar ab (Papadopoulou *et al.* 1999; Leary *et al.* 2004) – handelt. Auch im Menschen ist nicht für beide Proteine deren genaue Funktion geklärt, sie scheint sich aber nicht zu überlappen; vielmehr scheinen sich beide Proteine im gewissen Maße zu unterstützen (Leary *et al.* 2004). Sicher ist nur für alle vier Proteine in Hefe und Mensch, dass sie alle Kupfer binden (Beers *et al.* 2002; Lode *et al.* 2002; Horng *et al.* 2005). Für die beiden menschlichen SCO-Proteine konnte kürzlich eine Rolle in der Kontrolle der zellulären Kupfermenge über die Rate des Kupfer-Efflux' gezeigt werden (Leary *et al.* 2007).

Zusammengenommen zeigt sich, dass beim Verständnis des Kupfertransports zur Cytochrom c Oxidase wenige Dinge klar, aber viele interessante Fragen noch offen sind; zukünftige Forschungsarbeiten werden Licht in das Dunkel bringen (müssen). Die Tatsache, dass es sich offensichtlich um einen sehr fein abgestimmten und kontrollierten Mechanismus handelt, zeigt auch die Wichtigkeit dieses Stoffwechselwegs.

1.2 Mitochondrien – die Schlüsselorganellen

Mitochondrien sind in allen Eukaryonten Organellen mit ambivalentem Charakter. Zwar produzieren sie über die Atmungskette in der inneren Membran den allergrößten Teil der Energie für die Zelle in Form von ATP, sie sind aber auch gleichzeitig hauptverantwortlich für den Tod der Zelle, da sie die Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind, die nach vorherrschender Meinung ursächlich

Einleitung

für Alterung und Tod sind (Harman 1956; Harman 1972). Auch der programmierte Zelltod, genannt „Apoptose“, wird von den Mitochondrien aus eingeleitet (zusammengefasst in Green and Reed 1998; Wang 2001; Green 2005; Kim *et al.* 2006).

Weitere Beachtung gewannen die Mitochondrien dadurch, dass in der Matrix von Hefe-Mitochondrien ein unerwartet großes Reservoir an frei zugänglichem, durch einen noch nicht näher bekannten Liganden gebundenem Kupfer gefunden wurde (Cobine *et al.* 2004). Dieser sog. „Kupfer-Pool“ konnte auch in Mäusezellen nachgewiesen werden (Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B). Es konnte gezeigt werden, dass eben dieser Kupfer-Pool offensichtlich für die Versorgung mit Kupfer sowohl der Cytochrom c Oxidase in der inneren Membran als auch der Cu/Zn-SOD im Intermembranraum genutzt wird (Cobine *et al.* 2006 B; K. Jezek 2005). Jedoch sind nur 10 – 15 % des mitochondrialen Kupfers an die genannten Kupfer-Enzyme gebunden, der Rest scheint in der Matrix zu lagern (Cobine *et al.* 2006 B). Der Beitrag dieses offensichtlichen Kupferspeichers zum Gesamtkupferhaushalt bleibt zu erforschen (s.u.).

Die Gewinnung der Energie erfolgt durch oxidative Phosphorylierung über die sog. „Elektronentransportkette“. Dort wird die Übertragung von Elektronen über vier Proteinkomplexe (Komplex I bis Komplex IV) hin auf Sauerstoff zum gleichzeitigen Aufbau eines Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran genutzt. Dieser Energiegradient wird anschließend zur Synthese von ATP aus ADP und P_i an der ATP-Synthase (Komplex V) verwendet (Saraste 1999). Die vier Standard-Komplexe der Elektronentransportkette sind:

Komplex I	NADH-Dehydrogenase
Komplex II	Succinat-Reduktase
Komplex III	Cytochrom bc ₁ -Komplex
Komplex IV	Cytochrom c Oxidase

In mehreren Organismen haben sich zu diesen Standard-Komplexen Alternativen entwickelt, um unter bestimmten Bedingungen auf Ausfälle der Standard-Proteine bzw. sich ändernde Umwelteinflüsse reagieren zu können; ein sehr gutes Beispiel für eine fein abgestimmte Mischung aus Standard- und Alternativ-Reaktionen ist die Atmungskette in dem Ascomyceten *Podospora anserina* (s.u. – Gredilla *et al.* 2006). In Abbildung 2 ist die Elektronentransportkette schematisch dargestellt.

Einleitung

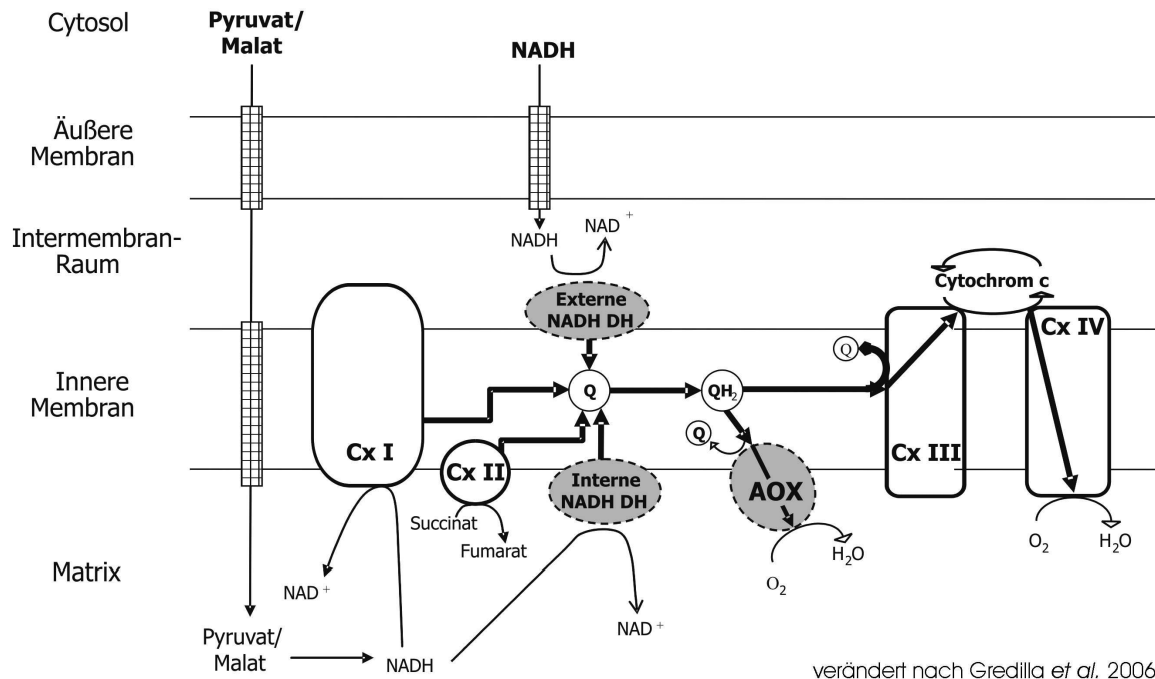


Abb. 2: Die Elektronentransportkette in *P. anserina* ist eine Mischung aus Standard- und alternativen Reaktionswegen. Die schematische Darstellung beinhaltet die vier Proteinkomplexe (Cx I bis Cx IV), über die Elektronen von NADH bzw. Succinat auf Sauerstoff übertragen werden. Weiterhin dargestellt sind die beiden alternativen NADH Dehydrogenasen (NADH DH) und die alternative Endoxidase (AOX). Nicht abgebildet ist die ATP-Synthase (Komplex V). Q : Ubiquinon. Nach Gredilla *et al.* 2006

Der Endakzeptor der Elektronen am Ende der Elektronentransportkette ist molekularer Sauerstoff, es entsteht Wasser. Die zwingend notwendige Anwesenheit von Sauerstoff bringt jedoch auch das größte Problem der Mitochondrien mit sich: werden Elektronen unkontrolliert auf Sauerstoff übertragen, so entstehen hochtoxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS), darunter vor allem Superoxid (O_2^-).

Superoxid entsteht vor allem an Komplex I und Komplex III, wobei an Komplex I das O_2^- nur auf die Matrix-Seite entlassen wird, wohingegen an Komplex III sowohl nach innen als auch nach außen in den Intermembranraum Superoxid entweicht (St-Pierre *et al.* 2002; Muller *et al.* 2004).

Von Superoxid aus können durch einfache metall-katalysierte Reaktionen weitere ROS-Arten entstehen (s.o. Gleichung I – III – Halliwell und Gutteridge 1984). Die in der Atmungskette der Mitochondrien entstehenden ROS werden als die Hauptursache für die Zellalterung angesehen (Harman 1956; Harman 1972). Um sich davor zu schützen, hat sich ein komplexes System aus antioxidativen Enzymen entwickelt (Davies 1995; Davies 2000; Landis und Tower 2005). Vorrangig in den Mitochondrien

Einleitung

aktiv ist die MnSOD in der Matrix. Aber auch die sich im Intermembranraum befindliche Cu/Zn-SOD leistet einen Beitrag zur Entgiftung der ROS (O'Brien *et al.* 2004). Da das Produkt der Disproportionierung von Superoxid durch die SOD Wasserstoffperoxid (H₂O₂) ist (Fridovich 1978), was ebenfalls zu den ROS gezählt wird und giftig für die Zelle ist, muss dieses in einem weiteren Schritt unschädlich gemacht werden. In den Mitochondrien übernehmen diese Aufgabe Glutathion-Peroxidasen, im Cytoplasma und den Peroxisomen die Katalase.

Die Mitochondrien sind nicht nur Hauptentstehungsort für ROS, sondern dadurch auch deren Hauptangriffsziel. Die entstehenden ROS schädigen die Biomoleküle in den Mitochondrien (DNA, Proteine, Lipide), wodurch die Atmungskette immer fehlerbehafteter wird, wodurch noch mehr ROS entstehen (Harman 1972; Bandy and Davison 1990). Diese als „vicious cycle“-Theorie (engl. „Teufelskreislauf“) bekannte Hypothese ist umstritten, da sowohl Beweise für als auch gegen ihre Gültigkeit experimentell erbracht werden konnten (Balaban *et al.* 2005; Kujoth *et al.* 2005; Trifunovic *et al.* 2005; Bonawitz *et al.* 2006).

ROS sind jedoch nicht nur schädlich. Immer mehr zeigt sich, dass sich auch im „normalen“ physiologischen Zustand der Zelle v.a. als Signalmolekül von Bedeutung sind (Finkel und Holbrook 2000; Finkel 2003; Linnane und Eastwood 2006; Fruehauf und Meyskens 2007).

Ein wichtiger Prozess, für dessen Kontrolle ROS eine wichtige Signalrolle spielen, ist die sog. Apoptose, eine Form des programmierten Zelltods (zusammengefasst in Steller 1995; Meier *et al.* 2000; McCarthy 2003).

Apoptose wurde ursprünglich in Pflanzen entdeckt. Der Name leitet sich vom griechischen Wort *απόπτωσης* (apo = weg; ptosis = Fall) ab und beschreibt den Mechanismus, der zum Fall der Blätter im Herbst durch kontrolliertes Absterben von bestimmten Zellen führt. Aber auch in Metazoen konnte diesem molekularen Prozess des kontrollierten Absterbens sehr bald eine wichtige Rolle in Entwicklungsprozessen zugewiesen werden (Kerr *et al.* 1972; Danial und Korsmeyer 2004). Im Jahr 1990 konnte gezeigt werden, dass ein tumor erzeugendes Gen Apoptose verhindert (McDonnell *et al.* 1990).

Das Gegenstück zur Apoptose ist Nekrose, die nicht-kontrollierte Form des Zelltods. Seit der Zusammenhang zwischen Apoptose und Krebs in menschlichen Zellen gezeigt werden konnten, ist die Apoptose-Forschung ein sich sehr schnell entwickelndes und sich verbreiterndes Feld. Es zeigt sich ein sehr detailliert

Einleitung

abgestimmtes, fein gewobenes Regulationsnetzwerk, auf das hier nicht näher eingegangen werden kann. Außer in menschlichen bzw. Säuger-Zellen konnten die Komponenten der Apoptose-Maschinerie auch in *S. cerevisiae* (Madeo *et al.* 2004) und kürzlich auch in dem Ascomyceten *Podospora anserina* (Hamann *et al.* 2005; Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht), einem Modell in der Alterungsforschung, nachgewiesen werden. Jedoch zeigen sich im Detail deutliche Unterschiede, deren Aufklärung Gegenstand aktuelle Forschungen ist. Vor allem die Verbindung mit *P. anserina* zeigt, dass apoptotische Prozesse auch bei der Seneszenz von relativ einfachen Eukaryonten eine Rolle zu spielen scheinen, d.h. dass auch hier der Zelltod geregelt abläuft.

1.3 *Podospora anserina* – ein Alterungsmodell

Der Ascomycet *Podospora anserina* wird seit mehr als 50 Jahren als Modellsystem in der Gerontologie verwendet (Rizet 1953). Im Gegensatz zu den meisten anderen Pilzen besitzt der Wildstamm von *P. anserina* eine definierte Lebensspanne von ~30 Tagen (Tudzynski und Esser 1977). Diese relative kurze Lebensspanne, die leichte Kultivierbarkeit und vor allem das Vorhandensein von langlebigen Mutanten sind die Vorzüge des Alterungsmodellsystems „*Podospora anserina*“.

Im Laufe der Untersuchungen hat sich gezeigt, dass die Lebensspanne sowohl durch genetische Einflüsse als auch Umwelteinflüsse bestimmt wird (zusammengefasst in Osiewacz 2002; Lorin *et al.* 2006; Osiewacz und Scheckhuber 2006). Den Mitochondrien kommt auch hier eine entscheidende Rolle zu. Diese Rolle wird unterschiedlich ausgefüllt, es zeigen sich drei verschiedene Wege, auf denen die Mitochondrien die Lebensspanne beeinflussen:

_____ die Morphologie: im juvenilen bzw. mittelalten Stadium liegen die Mitochondrien in länglich, filamentöser Form vor (Sellem *et al.* 2006; Scheckhuber *et al.* 2007). Im Alter jedoch fragmentieren die Mitochondrien und ändern dadurch ihr Aussehen hin zu kugelig. Unterbindet man die Teilung von Mitochondrien durch Deletion eines dafür verantwortlichen Gens (*PaDnm1*), entsteht ein verzweigtes Netzwerk aus Mitochondrien und die Lebensspanne wird drastisch (um den Faktor 11) verlängert (Scheckhuber *et al.* 2007). Trotzdem fragmentieren im finalen Stadium des Lebenszyklus' die Mitochondrien aufgrund noch unbekannter Mechanismen.

Einleitung

die Freisetzung mitochondrialer Inhalte: Kürzlich konnte der Nachweis erbracht werden, dass auch in *P. anserina* apoptotische Vorgänge in der Seneszenz eine entscheidende Rolle spielen (Hamann *et al.* 2005; Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 – zur Veröffentlichung eingereicht). Wie schon in anderen Systemen beschrieben, ist die Freisetzung von mitochondrialen Inhalten charakteristisch für Apoptose (s.o. – Green und Reed 1996; Green 2005). Bereits vor dem Nachweis von Apoptose in *P. anserina* konnten Hinweise dafür erarbeitet werden, dass Kupfer aus den Mitochondrien in das Cytoplasma entlassen wird (s.u. – Averbek *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A).

die Atmung: für die ersten gefunden langlebigen Mutanten konnte gezeigt werden, dass sie in der Standard-COX-Atmung beeinträchtigt sind (ex1 – Kück *et al.* 1985; grisea – Esser und Keller 1976; vivax - Esser und Keller 1976; $\Delta PaCox17$ – Stumpferl *et al.* 2004). Dieser eigentliche Missetand wirkt sich jedoch auf die Lebensspanne sehr positiv aus, da der Ausfall der COX in *P. anserina* eine alternative Oxidase (AOX) induziert (Dufour *et al.* 2000; Borghouts *et al.* 2001; Lorin *et al.* 2001; Stumpferl *et al.* 2004; Gredilla *et al.* 2006).

Die AOX wurde zuerst in Pflanzen, mittlerweile aber auch in Pilzen gefunden (Vanlerberghe und McIntosh 1997; Sluse und Jarmuszkiwicz 1998; Umbach und Siedow 2000). Als Co-Faktor besitzt die AOX Eisen, nicht wie die COX Kupfer. Sie ist resistent gegenüber dem COX-Inhibitor Cyanid (KCN), wird dafür aber durch SHAM gehemmt.

Da beim Elektronenfluss über die AOX Komplex III und IV der Atmungskette nicht genutzt werden, ist die Anzahl der translozierten Protonen pro Reduktionsäquivalent geringer, was zu einer geringeren Energieausbeute führt (siehe Abb. 2; Gredilla *et al.* 2006). Gleichzeitig werden aber deutlich weniger ROS gebildet, was wahrscheinlich der Grund für die durch Benutzung der AOX erfolgende Lebensverlängerung ist (Dufour *et al.* 2000; Gredilla *et al.* 2006). Diese Lebensverlängerung wird durch einen geringeren Energiefluss „erkauft“, was sich in langsamerem Wachstum und stark beeinträchtigter Fertilität äußert (Prillinger und Esser 1977; Kück *et al.* 1985; Stumpferl *et al.* 2004).

Die $\Delta PaDnm1$ -Mutante hebt sich diesbezüglich deutlich von anderen langlebigen Mutanten ab. Sie unterscheidet sich, trotz mehr als zehnfach verlängerter Lebensspanne, phänotypisch nicht vom Wildstamm. Es ist somit nicht nur die Lebensspanne sondern auch die sog. „Healthspan“, d.h. die Phase von

Einleitung

unbeeinträchtigttem wildtyp-artigem Wachstum, verlängert (Scheckhuber *et al.* 2007).

Ein wichtiger Faktor für die Funktionalität der Atmung über die COX ist die Verfügbarkeit von Kupfer. Fehlt Kupfer, so nimmt die Aktivität der COX ab und die AOX wird induziert. Dieser Zusammenhang konnte erstmals in der Mutante *grisea* gezeigt werden (Osiewacz und Nuber 1996), in der ein globales Kupferdefizit herrscht.

In dieser Mutante kann kein funktioneller Transkriptionsfaktor GRISEA gebildet werden (Osiewacz und Nuber 1996). GRISEA ist ein Ortholog zu MAC1 aus *S. cerevisiae* und wird in seiner Aktivität durch Kupfer reprimiert (Borghouts und Osiewacz 1998). Bei Kupfermangel induziert er die Expression von *PaCtr3*, das für einen hochaffinen Kupfertransporter codiert (Borghouts *et al.* 2001). Fehlt GRISEA, kann nur über niederaffine Transportsysteme die Aufnahme von Kupfer erfolgen, was zu dem Kupferdefizit und der damit verbundenen Beeinträchtigung der COX-Aktivität führt.

Nicht nur die Art der Atmung wird durch Kupfer beeinflusst, sondern auch die umfassenden Umstrukturierungen im mitochondrialen Genom, die während der Alterung von *P. anserina* erfolgen (Borghouts und Osiewacz 1998). Die Amplifikation der sog. „pDNA“ ist unter der Kontrolle des Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktors GRISEA (Borghouts *et al.* 1997).

Die Reorganisationen in der mtDNA, die mit der Amplifikation der pDNA einhergehen, werden häufig als Biomarker für Seneszenz in *P. anserina* verwendet (Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984). Bei pDNA, auch „ α -senDNA“ genannt (Cummings *et al.* 1979; Cummings *et al.* 1985), handelt es sich um das erste Intron des *CoI*-Gens, das für die erste Untereinheit der COX codiert (Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984; Cummings *et al.* 1985). Im Alter gliedert sich dieses mobile Element aus dem Chondriom aus und liegt als plasmid-ähnliches Molekül vor. (pDNA = „plasmid-like DNA“ – engl. „Plasmid-ähnliche DNA“) Es kann reintegrieren und dadurch zu intramolekularen Rekombinationen führen, die den Verlust von Teilen der mtDNA zur Folge haben (Sellem *et al.* 1993; Sainsard-Chanet *et al.* 1998). Mehrere langlebige Mutanten besitzen eine stabilisierte mtDNA (Borghouts und Osiewacz 1997; Dufour *et al.* 2000; Stumpferl *et al.* 2004; Scheckhuber *et al.* 2007) trotzdem scheint die pDNA nicht direkte Ursache, sondern vielmehr Beschleuniger des Zelltods zu sein.

Neben den eher indirekten und mittelbaren Auswirkungen auf die Alterung von *P. anserina* über Atmung und mtDNA-Stabilität scheint Kupfer auch eine direkte Rolle im Alterungsprozess zu spielen. Es konnten mehrere Hinweise darauf erarbeitet

Einleitung

werden, dass es im Alter zu einem deutlichen Anstieg der cytoplasmatischen Kupferkonzentration kommt (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A), ohne dass die genauen Folgen dieses Anstiegs bislang im Detail bekannt sind. Zum einen zeigen Transkriptanalysen indirekt eine Veränderung der cytoplasmatischen Kupfermenge an, da die Menge an Transkript von *PaMt1* deutlich ansteigt (Averbeck *et al.* 2001), wohingegen Transkript für *PaCtr3*, einem Zielgen des Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktors GRISEA, im Alter drastisch abnimmt (Borghouts *et al.* 2002 A). Dadurch kann auch ausgeschlossen werden, dass das Kupfer von außerhalb in die Zelle einströmt, es muss also zu einer Umverteilung innerhalb der Zelle kommen. Zum anderen kann die Aktivität der beiden SODs (Cu/Zn-SOD und MnSOD) als Anzeiger der cytoplasmatischen Kupfermenge verwendet werden (Borghouts *et al.* 2001). Während die Aktivität der Cu/Zn-SOD in der Seneszenz ansteigt, fällt gleichzeitig die der MnSOD deutlich ab.

Die Cu/Zn-SOD benötigt nicht nur für ihre Aktivität Kupfer, sondern kann vielmehr auch – ähnlich dem Metallothionein – als Puffer für Kupfer wirken (Culotta *et al.* 1995). Die MnSOD-Aktivität ist in der Mutante *grisea* gestört, und *PaSod2* wurde als Zielgen des Transkriptionsfaktors GRISEA postuliert (Borghouts *et al.* 2001). Neueste Ergebnisse deuten aber an, dass wohl auch in der Mutante *grisea* *PaSod2* auf basalem Niveau transkribiert wird (A. Hamann, D. Schwitalla – pers. Mitteilung). Die Regulation und das Zusammenspiel der SODs scheint somit auf komplexere Art zu erfolgen, v.a. seit auch in *P. anserina* eine dritte SOD-Isoform entdeckt wurde (A. Hamann – pers. Mitteilung).

Bereits 2001 wurde spekuliert, dass die intrazelluläre Quelle des Kupfers, das sich im Alter im Cytosol wiederfindet, die Mitochondrien sind (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A). Diese Hypothese wurde durch die Entdeckung des Kupfer-Reservoirs in der mitochondrialen Matrix (Cobine *et al.* 2004, Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B) und den Nachweis von apoptotischen Vorgängen auch in *P. anserina* (Hamann *et al.* 2005; Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht) deutlich gestärkt, blieb bislang aber noch immer zu beweisen. Dieser direkte Beweis war ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In dem Ascomyceten *Podospora anserina* konnte bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem molekularen Kupferstoffwechsel und der Kontrolle der Lebensspanne aufgezeigt werden. In dieser Arbeit sollte diese Verbindung weiter geklärt werden.

Hierzu sollte im ersten Teil untersucht werden, inwieweit sich in der Genomsequenz von *P. anserina* Homologe zu den in anderen Modelorganismen (v.a. der Hefe *S. cerevisiae*) bekannten Bestandteilen der Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase auffinden lassen. Von einigen der vorhergesagten homologen Gene sollte die Transkription nachgewiesen werden, um somit die *in silico* Daten zu untermauern und zu verifizieren. Ein besonderes Augenmerk sollte auf den Stoffwechselweg gelegt werden, der Kupfer für den Einbau in die COX bereitstellt, da die Bedeutung dieses speziellen Weges an einer $\Delta PaCox17$ -Mutante bereits verdeutlicht werden konnte (Stumpferl *et al.* 2004). Einzelne Gene dieses spezifischen Stoffwechselwegs sollten kloniert und näher charakterisiert (u.a. durch Deletion im Genom), um weitere Einblicke in die Bedeutung des mitochondrialen Kupferstoffwechsels für die Lebensspanne von *P. anserina* zu erhalten.

Im zweiten Teil sollte mit analytisch-chemischen und biochemischen Methoden versucht werden, die bereits vermuteten Veränderungen in der Verteilung von Kupfer zwischen den Kompartimenten innerhalb der Zelle während des Alterns (Averbeck *et al.* 2001, Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A) zu bestätigen. Die These, dass ein in der Matrix der Mitochondrien vorhandenes Reservoir an Kupfer verantwortlich für den Anstieg der cytoplasmatischen Kupferkonzentration im Alter ist, sollte experimentell untermauert werden. Dazu sollte in fraktionierten Zellen die Kupferkonzentration direkt mittels TXRF gemessen werden und durch die Verwendung von eGFP gezeigt werden, dass sich Matrix-Inhalte im Alter auch im Cytoplasma wieder finden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Bead-Beater™	Biospec Products
CCD-Videodensitometer	Cybertech, Mitsubishi
Elektrophorese-Kammern	
DNA	Subcell, Wide-Mini-Subcell, Bio-Rad
Protein	Mini Protean II, Bio-Rad
Elektroporator	Easyjet Prima, Peqlab
Fluoreszenzmikroskop	DM LB, Leica
Kamera	DC 500, Leica
Hybridisierungsöfen/-röhren	Amersham
PCR-Thermocycler	T1 Thermocycler, Biometra
	TGradient, Biometra
pH-Meter	Calimatic 761, Knick
Spektralphotometer	Ultrospec III, Pharmacia
Sterilbänke	CLF 460 EC; NSF 49, Clean Air
Transilluminator	TFM (M40), Cybertech
Ultrazentrifuge	Ultra Pro 80, Sorvall
Ausschwingrotor	TH 641, Sorvall
UV-Spektralphotometer	GeneQuant II, Pharmacia
UV-DNA-Vernetzer	Stratalinker 1800, Stratagene
Vakuum-Transferapparatur	Pharmacia
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus, Millipore
Zentrifugen	Biofuge Fresco, Heraeus
	5417 R, Eppendorf
	RC5B Plus, Sorvall
	Festwinkelrotoren
	SLA-1500 (GSA), Sorvall
	SS34, Sorvall

2.1.2 Chemikalien und Bezugsquellen

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth, Karlsruhe
Adenin	Roth, Karlsruhe
Adenin-Sulfat	Roth, Karlsruhe
Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Boehringer, Mannheim
APS Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Seelze
Arginin	Roth, Karlsruhe
Asparaginsäure	Roth, Karlsruhe
Biomalz	Roth, Karlsruhe
Blastizidin	Calbiochem, Darmstadt
Blocking Reagenz	Roche, Penzberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA „bovine serum albumin“ – engl.: Rinderserum-Albumin	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Casaminsäuren	Difco, Detroit (USA)
Chloramphenicol	Serva, Heidelberg

Material und Methoden

Chloroform	Roth, Karlsruhe
CsCl	Invitrogen, Karlsruhe
CSPD	Roche, Pensberg
α - ³² P-dCTP	Amersham, Freiburg
CuSO ₄	Merck, Darmstadt
dATP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dCTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
dGTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Digitonin	Roth, Karlsruhe
DMPC Dimethyl-Pyrocarbonat	Sigma-Aldrich, Seelze
dTTP	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DTT Dithiothreitol	Merck, Darmstadt
EDTA Ethylendiamintetraacetat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
FeCl ₂	Merck, Darmstadt
FeSO ₄	Merck, Darmstadt
Ficoll 400	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glass-beads (0,5 mm)	Sigma-Aldrich, Seelze
Glucanex	Novo Nordisk Ferment AG, Bagsvaerd, Dänemark
Glucose x H ₂ O	Merck, Darmstadt
Glutaminsäure	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
GTC Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich, Seelze
HCl	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Heringssperma-DNA	Serva, Heidelberg
Histidin	Roth, Karlsruhe
Hybond N	Amersham, Freiburg
Hygromycin B	Calbiochem, Darmstadt
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isoleucin	Roth, Karlsruhe
KCl	Roth, Karlsruhe
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
LiCl	Merck, Darmstadt
LiOAc	Merck, Darmstadt
Lysin	Roth, Karlsruhe
Maismehl	Aurora, Frankfurt
Maleinsäure	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Methanol	Roth, Karlsruhe
Methionin	Roth, Karlsruhe
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
MitoTracker® red CMXRos	Molecular Probes, Karlsruhe
MnCl ₂	Roth, Karlsruhe
MnSO ₄	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma-Aldrich, Seelze
- 3-[N-Morpholin]propansulfonsäure	
N-Laurosylsarkosin	Roth, Karlsruhe
NaAcetat	Roth, Karlsruhe
NaCitrat	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
NaOH	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
pefa-bloc	Roth, Karlsruhe
PEG 4000 Polyethylenglykol	Serva, Heidelberg
Pepton	Roth, Karlsruhe
Phenol	Roth, Karlsruhe
Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
Phleomycin	Calbiochem, Darmstadt
Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich, Seelzue
Ponceau S	Serva, Heidelberg
PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Röntgenfilm	Amersham, Freiburg (Hyperfilm MP)
Roti-Nanoquant	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Serin	Roth, Karlsruhe
Serva blue G	Serva, Heidelberg
Sorbit	Serva, Heidelberg
Stickstoffbasis ohne Aminosäuren	Difco, Detroit (USA)
TEMED Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, Seelze
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Threonin	Roth, Karlsruhe
TRIS Tris(hydroxymethyl)- -aminomethan	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Serva, Heidelberg
Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difca, Detroit (USA)
Tween ₂₀	Sigma-Aldrich, Seelze
Tyrosin	Roth, Karlsruhe
Uracil	Roth, Karlsruhe
Valin	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol	Serva, Heidelberg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	Merck, Darmstadt

2.1.3 Medien

P. anserina

Biomalz-Mais-Medium (BMM)

50 g/l Maismehl ü.N. bei 60°C quellen lassen,
abfiltrieren
8 g/l Biomalz
pH = 6,5 (KOH)

für Festmedium:

2% (w/v) Agar

CM-Medium

1,0 g/l KH₂PO₄
0,5 g/l KCl
0,5 g/l MgSO₄ x 7H₂O
10,0 g/l Glucose x H₂O
3,7 g/l NH₄Cl
2,0 g/l Hefeextrakt
2,0 g/l Trypton
1,0 ml/l Stammlösung

Material und Methoden

pH = 6,5 (KOH)

Stammlösung

1,0 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
1,0 g/l FeCl_2
1,0 g/l MnCl_2

stabilisierendes Transformationsmedium

3,7 g/l NH_4Cl
2 g/l Trypton
1 g/l Casaminsäure
1 g/l Hefeextrakt
10 g/l Glucose
342,3 g/l Saccharose
20 ml/l Stammlösung 1
20 ml/l Stammlösung 2
pH = 6,0 (KOH)

Stammlösung 1

0,075 g/l KH_2PO_4
0,025 g/l KCl
0,027 g/l MgSO_4

Stammlösung 2

0,05 g/l MnSO_4
0,05 g/l FeSO_4
0,05 g/l CuSO_4
0,05 g/l ZnSO_4

für Festmedium:

1,2 % (w/v) Agar

für Überschichtungsmedium:

0,5 % (w/v) Agar

S. cerevisiae

YPAD

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Pepton
20 g/l Glucose
40 mg/l Adenin-Sulfat
pH = 5,8 (HCl)

YPG

10 g/l Hefeextrakt
20 g/l Pepton
15 ml/l Glycerin
pH = 6,3 (HCl)

SD-Medium

6,7 g/l Stickstoffbasis ohne Aminosäuren
182,2 g/l Sorbit
20 g/l Glucose*
100 ml/l „Drop-Out“-Lösung*
pH = 5,8 (NaOH)

* nach dem Abkühlen auf $<60^\circ\text{C}$ zugeben

Material und Methoden

für Festmedium:

2 % (w/v) Agar

“Drop-Out“-Lösung

0,2 g/l Adenin	0,5 g/l Phenylalanin
0,2 g/l Arginin	0,4 g/l Serin
1,0 g/l Asparaginsäure	2,0 g/l Threonin
1,0 g/l Glutaminsäure	0,2 g/l Tryptophan
0,2 g/l Histidin	0,3 g/l Tyrosin
0,3 g/l Isoleucin	0,2 g/l Uracil
0,3 g/l Lysin	1,5 g/l Valin
0,2 g/l Methionin	

E. coli

LB-Medium

10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
5 g/l NaCl
pH = 7,2 (NaOH)

für Festmedium:

1,2 % (w/v) Agar

SOC-Medium

2 g/l Trypton
0,5 g/l Hefeextrakt
0,05 g/l NaCl
1,86 g/l KCl
10 ml/l 1M Glukose*
10 ml/l 2M MgCl₂*
pH = 7,0 (HCl)

* nach dem Abkühlen auf <60°C zugeben

2.1.4 Antibiotika

Angegeben ist die eingesetzte Endkonzentration im Medium

E. coli

Ampicillin	50 µg/ml
Blastizidin	100 µg/ml
Chloramphenicol	10 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml

P. anserina

Hygromycin B	100 µg/ml
Phleomycin (Bleocin)	6 µg/ml

2.1.5 Puffer und Lösungen

CsCl-Lösung

5,7 M CsCl
0,1 M EDTA
pH = 7,4 (HCl)

Refraktionsindex auf 1,400 mit DMPC-bidest einstellen

Denaturierungspuffer Southern Blot Analyse

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH

Material und Methoden

50 x Denhardts-Lösung

1 % (w/v) Ficoll 400
1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon
1 % (w/v) BSA

DiG-1

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

DiG-2

DiG-1 + 0,5 % (w/v) „Blocking-Reagenz“

DiG-3

0,1 M TRIS
0,1 M NaCl
pH = 9,5 (HCl)

DiG-WP („Digoxigenin-Waschpuffer“)

DiG-1 + 0,3 % (v/v) Tween₂₀

DMPC-bidest

1 l H₂O autoklavieren
1 ml DMPC zugeben
30 min inkubieren
erneut autoklavieren

10 x DNA-Ladepuffer

60 % (w/v) Saccharose
20 mM EDTA, pH 8,0
0,025 % (w/v) Bromphenolblau

Extraktionspuffer (RNA aus Hefe)

0,1 M LiCl
0,1 M TRIS
0,01 M DTT
0,625 % (w/v) SDS
pH = 7,0 (HCl)

Glycin Stripping Puffer

0,2 M Glycin
0,1 % (w/v) SDS
1 % (v/v) Tween₂₀
pH = 2,2 (HCl)

GTC/β-Mercaptoethanol

5,5 M GTC
25 mM Na₃Citrat
0,5% (w/v) N-Lauroylsarkosin
0,2 M β-Mercaptoethanol*
pH = 7,0 (HCl)
*stets frisch zugeben

„high SDS“- (Prä-)Hybridisierungslösung

7 % (w/v) SDS
5 x SSC
50 mM Natriumphosphat, pH 7,0
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin
2 % (w/v) „Blocking Reagenz“

Isolierungspuffer (Mitochondrien)

0,33 M Saccharose
10 mM TRIS
1 mM EDTA
pH = 7,5 (HCl)

Isolierungspuffer (TXRF)

0,6 M Sorbit
10 mM TRIS
1 mM EDTA
pH = 7,5 (Acetat)

10 x Laufpuffer (SDS-PAGE)

0,25 M TRIS
1,9 M Glycin
1 % (v/v) SDS

Lithium-Sorbit-Lösung

100 mM LiOAc
10 mM TRIS
1 mM EDTA
1 M Sorbit
pH = 8 (HCl)

Milchpulverlösung

1 % (w/v) Milchpulver
0,1 % (v/v) Tween₂₀
in 1 x PBS

10 x MOPS

200 mM MOPS
50 mM NaAc
10 mM EDTA
pH = 7,0 (NaOH)

Neutralisierungspuffer Southern Blot Analyse

2 M NaCl
1 M TRIS
pH = 5,5 (HCl)

10 x PBS

0,58M Na₂HPO₄
0,17M NaH₂PO₄ x H₂O
0,68M NaCl

PEG-Lösung

60 % PEG 4000
50 mM CaCl₂ x H₂O
10 mM TRIS
pH = 7,5 (HCl)

Prähybridisierungslösung (radioaktiv)

6 x SSC
5 x Denhardts Lösung
50 % (v/v) Formamid
0,5 % (w/v) SDS
2 % (w/v) „Blocking-Reagenz“
100 µg/ml Heringssperma-DNA
(frisch denaturiert)

4xProbenpuffer (SDS-PAGE)

12 % (w/v) SDS
6 % (v/v) β-Mercaptoethanol
30 % (v/v) Glycerin
0,05 % (w/v) Serva blue G
150 mM TRIS
pH = 7,0 (HCl)

OPL-I

1,5 µM Hexanukleotide [d(N)₆] in TE

Material und Methoden

OPL-II -C

500 mM TRIS/HCl (pH 7,5)
100 mM MgCl₂
700 mM β-Mercaptoethanol
0,5 mM dATP
0,5 mM dGTP
0,5 mM dTTP

RNA-Ladepuffer

50 % (v/v) Formamid
40 % (v/v) Glycerin
0,1 % Bromphenolblau
0,1 % Xylencyanol

RNA-Probenpuffermix

7,5 µl RNA (10 µg)
1 µl 10 x MOPS
3,5 µl Formaldehyd
10 µl Formamid
2 µl RNA-Ladepuffer

Sammelgel

5% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
1 x Sammelgel-Puffer
2,5 µl/ml TEMED
25 µl/ml 10 % APS

4 x Sammelgelpuffer

0,5 M TRIS
pH = 6,8 (HCl)

SEMK-Puffer

0,25 M Saccharose
1 mM EDTA
10 mM MOPS (pH 7,2)
100 mM KCl

SEMK+P-Puffer

SEMK-Puffer + 1 mM pefa-bloc

20 x SSC

3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
pH = 7,0 (HCl)

STC

1 M Sorbit
10 mM TRIS
50 mM CaCl₂ x 2H₂O
pH = 7,5 (HCl)

1 x STE-Puffer

100 mM NaCl
20 mM TRIS
10 mM EDTA
pH = 7,5 (HCl)

STET-Puffer

8% Saccharose
5% Triton-X-100
50 mM EDTA (pH 8,0)
10 mM TRIS-HCl (pH 8,0)

20 x TAE-Puffer

0,8 M TRIS
0,4 M NaAcetat
0,04 M EDTA
pH = 8,3 (Eisessig)

TENS-Puffer

10 mM TRIS-HCl (pH 8)
1mM EDTA
100 mM NaCl
2% SDS

TPS

20 % Saccharose
5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
45 mM KH₂PO₄
pH = 5,5 (Phosphorsäure)

Trenngel

16% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
1 X Trenngel-Puffer
0,5 µl/ml TEMED
2 µl/ml APS

4 x Trenngelpuffer

1,5 M TRIS
pH = 8,8 (HCl)

2.1.6 Enzyme

Alle Restriktionsenzyme
RNase A
Reverse Transkriptase
DNase
T4-DNA-Ligase
Taq-Polymerase
Phusion Polymerase
Klenow-Fragment
der DNA Polymerase I

MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SIGMA
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Roche, Mannheim
MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Invitrogen, Karlsruhe
New England Biolabs, Frankfurt / Main
MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Material und Methoden

2.1.7 Antikörper

Primärantikörper (eingesetzt jeweils in 1:1000 Verdünnung in Milchpulverlösung):

α -eGFP *	Invitrogen (Molecular Probes), Karlsruhe
α -MnSOD **	Stressgen, Victoria, Kanada
α -Cu/Zn-SOD **	Stressgen, Victoria, Kanada

* hergestellt in Maus
** hergestellt in Kaninchen

Sekundärantikörper (eingesetzt jeweils in 1:10000 Verdünnung in Milchpulverlösung):

α -Maus-HRP-Konjugat	Roth, Karlsruhe
α -Kaninchen-HRP-Konjugat	Roth, Karlsruhe

2.1.8 verwendete Kits

„5'/3' RACE-Kit“	Roche, Mannheim
„DIG-DNA labeling and detection kit“	Roche, Mannheim
„NucleoSpin-Extract II“	Macherey&Nagel, Düren
„Midi-/Maxi Plasmid Purification Kit“	Qiagen, Hilden
„Western Blotting Luminol Reagent“	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.1.9 verwendete DNA- und Protein-Größenstandards

Alle eingesetzten Größenstandards wurden von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot bezogen.

DNA-Längenstandards

#SM0322	„GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus“
#SM0101	„Lambda DNA/HindIII Marker 2“

Protein-Längenstandards

#SM0431	„Unstained Protein Molecular Weight Marker“ (nicht-vorgefärbter Protein Marker)
#SM0441	„Prestained Protein Molecular Weight Marker“ (vorgefärbter Protein Marker)
#SM0671	„PageRuler Prestained Protein Marker“ (vorgefärbter Protein Marker)

Material und Methoden

2.1.10 verwendete Vektoren und Plasmide

Tabelle 1: Auflistung aller in diese Arbeit hergestellten oder verwendeten Plasmide. Aufgeführt sind der Name des Plasmids, der darauf codierte Selektionsmarker (Leu: Strukturgen *Leu2* für Leucin-Biosynthese; amp^r: Resistenz gegen Ampicillin; hyg^r: Resistenz gegen Hygromycin B; ble^r: Resistenz gegen Phleomycin; bsd^r: Resistenz gegen Blastizidin), eine kurze Beschreibung des Plasmids und die Referenz.

Name	Selektionsmarker	Beschreibung	Referenz
pAD4	Leu, amp ^r	Plasmid zur Überexpression in <i>S. cerevisiae</i>	Stratagene
pAN7-1	amp ^r , hyg ^r	enthält Hygromycin-Resistenzkassette (hyg^r), bestehend aus Hygromycin B Phosphotransferase Strukturgen aus <i>E. coli</i> , Promoter des <i>Gpd</i> -Gens und Transkriptionsterminator des <i>TrpC</i> -Gens aus <i>A. nidulans</i>	Punt <i>et al.</i> 1987
pBSSK	amp ^r	allgemeiner Klonierungsvektor	Stratagene
pEX(ble)	amp ^r , ble ^r	enthält Phleomycin-Resistenzkassette (ble^r), bestehend aus dem ble Strukturgen aus <i>Streptoalotrichus hindustanus</i> , stark konstitutiven Promoter des <i>PaMt1</i> -Gens aus <i>P. anserina</i> und dem Transkriptionsterminator des <i>Cyc1</i> -Gens aus <i>S. cerevisiae</i>	Dissertation N. Averbek 1999
pEX-NcMTS-PaMT1-6xHis-TT	amp ^r	Plasmid zur Überexpression von PaMt1 mit 6xHis-tag in <i>P. anserina</i> ; MTS der MPP von <i>N. crassa</i> (Arretz <i>et al.</i> 1994) leitet PaMT1 in die mitochondriale Matrix; Promoter und Transkriptionsterminator des PaMt1 -Gens; kein in <i>P. anserina</i> verwendbarer Resistenzmarker	Diplomarbeit K. Jezek 2005
pKO3	amp ^r , ble ^r , bsd ^r	Plasmid zum Austausch von Genen von <i>P. anserina</i> auf einem Cosmid gegen eine bifunktionelle Resistenzkassette (ble^r, bsd^r); ble ^r wie in pEX(ble), Blastizidin-Resistenzkassette (bsd ^r) aus pEM7/bsd (Invitrogen)	Hamann <i>et al.</i> 2005
pMOS blue	amp ^r	allgemeiner Klonierungsvektor aus "pMOS blue blunt-ended cloning kit" (Amersham Biosciences), geöffnet an <i>EcoRV</i> -Schnittstelle	Amersham Biosciences
pMY60	amp ^r	Plasmid enthält rDNA -Fragment von <i>S. carlsbergensis</i>	Verbeet <i>et al.</i> 1983
pSM1	amp ^r , hyg ^r	Plasmid enthält eGFP -Strukturgen aus pEGFP-N1 (BD-Bioscience) unter Kontrolle des Promoters des <i>Gpd</i> -Gens und Transkriptionsterminator des <i>TrpC</i> -Gens aus <i>A. nidulans</i> und eine Hygromycin-Resistenzkassette (hyg ^r)	Pöggeler <i>et al.</i> 2003
pSP17	amp ^r	Plasmid enthält zwei Kopien des ersten Introns des <i>Cox1</i> -Gens von <i>P. anserina</i> (pidNA)	Stahl <i>et al.</i> 1982
pAD4-Gal4-PaCOX17	Leu, amp ^r	Plasmid für Hefe-2-Hybrid-Versuche zur Interaktion von PaCOX17 und PaSCO1, enthält ein Aktivator-domäne des Gal4-Transkriptionsfaktors fusioniertes PaCOX17; <i>PaCox17</i> -ORF PCR-amplifiziert, kloniert über eingefügte EcoRI / SmaI Schnittstellen	diese Arbeit
pAD4-PaSCO1	Leu, amp ^r	Plasmid zur Überexpression von PaSCO1 in <i>S. cerevisiae</i> , PaSCO1 -ORF (cDNA) über PstI / EcoRI aus pPaSCO1 im UZS zum Versuch der Komplementation eines Δ SCO1-Hefestammes durch PaSCO1	diese Arbeit
pPaCox23.1	amp ^r	cDNA von PaCox23 im UZS (d.h. in gleicher Orientierung wie <i>lacZ</i>) in pMos blue, PCR-amplifiziert mittels " PaCox23 for " und " PaCox23 rev "	diese Arbeit
pPaSCO1 ggn UZS	amp ^r	cDNA von PaSCO1 ggn UZS (d.h. in gegensätzlicher Orientierung wie <i>lacZ</i>) in pMos blue, PCR-amplifiziert mittels " PaSCO1 for " und " PaSCO1 rev "	diese Arbeit
pPaSCO1 im UZS	amp ^r	cDNA von PaSCO1 im UZS (d.h. in gleicher Orientierung wie <i>lacZ</i>) in pMos blue, PCR-amplifiziert mittels " PaSCO1 for " und " PaSCO1 rev "	diese Arbeit
pEX-NcMTS-eGFP-hph	amp ^r , hyg ^r	Plasmid zum Expression von in die mitochondriale Matrix geleitetem eGFP in <i>P. anserina</i> , Promoter und Transkriptionsterminator von <i>PaMt1</i> ; <i>eGfp</i> -ORF aus pSM1 ersetzt <i>PaMt1</i> -ORF+6xHis-tag aus pEX-NcMTS-PaMT1-TT; Hygromycin-Resistenzkassette als <i>EcoRI</i> -Fragment aus pSM1	diese Arbeit
pEX-PaCox23	amp ^r , hyg ^r	Plasmid zur Überexpression von PaCOX23 in <i>P. anserina</i> , Rückgrat pEX-NcMTS-eGFP-hph, <i>eGfp</i> -ORF + MTS durch cDNA von <i>PaCox23</i> aus pPaCox23.1 ersetzt	diese Arbeit
pEX-PaSCO1	amp ^r , hyg ^r	Plasmid zur Überexpression von PaSCO1 in <i>P. anserina</i> , Rückgrat pEX-NcMTS-eGFP-hph, <i>eGfp</i> -ORF + MTS durch cDNA von <i>PaSCO1</i> aus pPaSCO1 im UZS ersetzt	diese Arbeit
pHuB-AT	amp ^r , ble ^r , hyg ^r	allgemeines Gentauch -Plasmid, ermöglicht das Einklonieren der das zu deletierende Gen flankierenden Bereiche 5' und 3' der Phleomycin-Resistenzkassette über <i>NotI</i> und <i>Eco72I</i> bzw. <i>Phi231I</i> , <i>MssI</i> , <i>BcuI</i>	diese Arbeit
pHuB-AT-PaSCO1	amp ^r , ble ^r , hyg ^r	pHuB-AT mit einklonierter 1536 bp bzw. 1597 bp großer 5' bzw. 3' Flanke von PaSCO1 , für Gentauch <i>PaSCO1</i> <-> ble ^r in <i>P. anserina</i>	diese Arbeit
pKO4	amp ^r , ble ^r , bsd ^r	um 182 bp großes PstI -Fragment verkürzte Variante von pKO3	diese Arbeit
pKO4-PaSCO1	amp ^r , ble ^r , bsd ^r	pKO4 mit einklonierter 332 bp bzw. 319 bp großer 5' bzw. 3' Flanke von PaSCO1 , für Gentauch <i>PaSCO1</i> <-> ble ^r auf Cosmid 36E11 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pKO4-PaCOX23	amp ^r , ble ^r , bsd ^r	pKO4 mit einklonierter 345 bp bzw. 346 bp großer 5' bzw. 3' Flanke von PaCox23 , für Gentauch <i>PaCox23</i> <-> ble ^r auf Cosmid 29D8 und 29G11 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pPrCcc2-eGFP	amp ^r , hyg ^r	Reporterkonstrukt: pSM1 mit einkloniertem 1737 bp Promotor-Fragments des putativen Gens PaCcc2	diese Arbeit
pPrCcs1-eGFP	amp ^r , hyg ^r	Reporterkonstrukt: pSM1 mit einkloniertem 1765 bp Promotor-Fragments des putativen Gens PaCcs1	diese Arbeit

Material und Methoden

2.1.11 verwendete Oligonukleotid-Primer

Tabelle 2: Auflistung aller in diese Arbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer. Angegeben sind Name und Sequenz in 5' → 3' -Richtung und eine kurze Beschreibung der Funktion.

Name	Sequenz (5' → 3')	Funktion
ble for	CCGCGCGCGCGGCCACGTGTTCAAGAATTCATTGTGATCTGCCGTACCCC	Amplifikation der ble-Kassette und Einfügen von <i>NotI</i> , <i>EheI/NarI</i> , <i>BbrPI</i> und <i>Bsp119I</i>
ble rev	TAACTAGTGGCGCCGTTAAACGTACGAGCTTGCAAATTAAGCCCTTCGAGCG	Amplifikation der ble-Kassette und Einfügen von <i>BcuI</i> , <i>EheI/NarI</i> , <i>MssI</i> , <i>Pfi23II</i> und <i>SplII</i>
Ccc2-Prom for	TTGTCGACTTGAGAGCTGGTGGTT	Amplifikation des 1737 bp großen Promoter-Fragments von <i>PaCcc2</i> , Einfügen von <i>SalI</i>
Ccc2-Prom rev	CAGAATCTCTGTAGTGGTGGCACC	Amplifikation des 1737 bp großen Promoter-Fragments von <i>PaCcc2</i> , Einfügen von <i>EcoRI</i>
Ccs1-Prom for	CAGTCGACAAGCACCACCTTCAGAA	Amplifikation des 1765 bp großen Promoter-Fragments von <i>PaCcs1</i> , Einfügen von <i>SalI</i>
Ccs1-Prom rev	CAGAATTCAGAAGATCGCGTTGCC	Amplifikation des 1765 bp großen Promoter-Fragments von <i>PaCcs1</i> , Einfügen von <i>EcoRI</i>
NcMPP MTS for	AAGGATCCGATGCTGAATCGCTCCGG	Amplifikation und Klonierung der MTS von NcMPP, Einfügen von <i>BamHI</i>
NcMPP MTS rev	TCGAAGCTTCGCCATGTCTGCCATTGTAAC	Amplifikation und Klonierung der MTS von NcMPP, Einfügen von <i>NcoI</i> und <i>HindIII</i>
PaAtx1 for	CCACATTGTCATGAGCTG	RT-PCR
PaAtx1 rev	CCACTTTTTTGCCGTCT	RT-PCR
PaCcs1 for	CCGCCCATGCATTGTGAA	RT-PCR
PaCcs1 rev	GGATCCTTCTTCTCTCC	RT-PCR
PaCox11 for	CCATAACCGCCAAACTCA	RT-PCR
PaCox11 rev	CCTAATTCACACCACGC	RT-PCR
PaCox11 RACE 3_2	CCTGGAGCCTTTGCTCTCAA	RACE zur Identifizierung der genauen <i>PaCox11</i> -Sequenz
PaCox11 rev_2	GCTCTCCACCCTCTCATGTT	RACE zur Identifizierung der genauen <i>PaCox11</i> -Sequenz
PaCox19 for	CCTGAGTTACCTAAGCTG	RT-PCR
PaCox19 rev	CCTTGCTCCTTAAACC	RT-PCR
PaCox23 3' Test	AAACTCCGCACTACTTG	Verifizierung des Austausch-Cosmids
PaCox23 5' Test	GAGTAGTTGAACGGGTG	Verifizierung des Austausch-Cosmids
PaCox23 for	CCATGGCGTCCACCGGAGG	Amplifikation und Klonierung von <i>PaCox23</i> cDNA in pMOS, Einfügen von <i>NcoI</i>
PaCox23 rev	TTAAGCATTGCTCTCCGTTT	Amplifikation und Klonierung von <i>PaCox23</i> cDNA in pMOS
PaCox23 I3 rev	GCATGCAATCCGTCATTC	Bindet in drittem Intron von <i>PaCox23</i> , Überprüfung der Stämme, die erst cDNA überexpr. dann mit KO-Cosmid transformiert wurden
PaCox23 KO 3' for	CCACTAGTAGGAATTGGCTCCAGG	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaCox23</i> in pKO4, Einfügen von <i>BcuI</i>
PaCox23 KO 3' rev	AAGCGGCGCGCTGATGGGACTACTGT	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaCox23</i> in pKO4, Einfügen von <i>NotI</i>
PaCox23 KO 5' for	AAGGTACCGCCATTGGAGATCA	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaCox23</i> in pKO4, Einfügen von <i>KpnI</i>
PaCox23 KO 5' rev	CCAAGCTTTGAGCAGGTCCAT	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaCox23</i> in pKO4, Einfügen von <i>HindIII</i>
PaPorin P8	GTCTCGGTGCTCTTTG	RT-PCR (Dissertation A. Hamann 2000)
PaPorin P9	TGTTGCCCTGATCATCG	RT-PCR (Dissertation A. Hamann 2000)
PaSco1 3' for	CCCCTAGCAATTATGGGCACGTA	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaSco1</i> in pHuB-AT, Einfügen von <i>Pfi23II</i>
PaSco1 3' rev	CCGTTTAAACAGAATCGGCACGAGG	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaSco1</i> in pHuB-AT, Einfügen von <i>MssI</i>
PaSco1 3' Test_2	GTATTGCCCTCGCAAGA	Verifizierung des Austausch-Cosmids
PaSco1 5' for	CCGCGCGCCGCTCGAGCATTTTCTT	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaSco1</i> in pHuB-AT, Einfügen von <i>NotI</i>
PaSco1 5' rev	CCCACGTGTTGGGTGGTTTTGC	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaSco1</i> in pHuB-AT, Einfügen von <i>BbrPI</i>
PaSco1 5' Test_2	CAGCTGTTCTGTTGGTGA	Verifizierung des Austausch-Cosmids
PaSco1 for	CACCCAAAATGTCACAAC	Amplifikation und Klonierung von <i>PaSco1</i> cDNA in pMOS
PaSco1 rev	CCATAATCTAGGCCCTTC	Amplifikation und Klonierung von <i>PaSco1</i> cDNA in pMOS
PaSco1 I2 rev	AACACGCCAGCACTTACA	Bindet in zweitem Intron von <i>PaSco1</i> , Überprüfung der Stämme, die erst cDNA überexpr. dann mit KO-Cosmid transformiert wurden
PaSco1 KO 3' for	CCACTAGTCTGAATTGCATCATTG	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaSco1</i> in pKO4, Einfügen von <i>BcuI</i>
PaSco1 KO 3' rev	AAGCGGCGCGAGACCAAGTTGT	Klonierung der 3' Flanke von <i>PaSco1</i> in pKO4, Einfügen von <i>NotI</i>
PaSco1 KO 5' for	AAGGTACCCATGGCAGCTTAATG	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaSco1</i> in pKO4, Einfügen von <i>KpnI</i>
PaSco1 KO 5' rev	CCAAGCTTGTGGGATAAAAGCTC	Klonierung der 5' Flanke von <i>PaSco1</i> in pKO4, Einfügen von <i>HindIII</i>
PaSco1 Test 3'	CTACTAGACCTCTCCGGT	Verifikation von <i>PaSco1</i> KO (pHuB-AT-Methode)
PaSco1 Test 5'	CAGTCTGGAGAAAGAGGGAA	Verifikation von <i>PaSco1</i> KO (pHuB-AT-Methode)
PCR anchor Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	Anchor-Primer des RACE-Kits (ROCHE)
pHuB seq 3'	GGACGCTCGAAGGCTTTAAT	Sequenzierung der in pHuB-AT einklonierten 3' Flanke
pHuB seq 5'	CGGCAGATCACAATGAATTC	Sequenzierung der in pHuB-AT einklonierten 5' Flanke
Y2H PaCox17 for	AAGAATTCATGCTCCGCCCAAGCT	RT-PCR
Y2H PaCox17 rev	AACCCGGACCTAAACCTGAATCCA	RT-PCR

Material und Methoden

2.1.12 verwendete Sonden zur Nukleinsäure-Hybridisierung

Tabelle 3: Auflistung der in dieser Arbeit für Northern Blot Analysen und Southern Blot Analysen verwendeten DNA-Sonden. Angegeben sind die Sequenz die die jeweilige Sonde detektiert und wie bzw. woraus sie hergestellt wurde.

	Nachweis von	Quelle	Referenz
Northern Hybridisierung - Markierung mittels α - ³² P-dCTP	PaAtx1	PCR mit "PaAtx1 for" und "PaAtx1 rev" + genomischer DNA	/
	PaCcs1	PCR mit "PaCcs1 for" und "PaCcs1 rev" + genomischer DNA	/
	PaCox11	PCR mit "PaCox11 for" und "PaCox11 rev" + genomischer DNA	/
	PaCox17	EcoRI / SmaI Fragment aus pAD-Gal4-PaCOX17	diese Arbeit
	PaCox23	NcoI / EcoRI Fragment aus pcPaCox23.1	diese Arbeit
	PaSco1	PstI / SmaI Fragment aus pcPaSco1 im UZS	diese Arbeit
	rRNA	HindIII Fragment aus pMY60	Verbeet <i>et al.</i> 1983
Southern Hybridisierung - Markierung mittels Digoxigenin	3' Flanke von PaCox23	BcuI / NotI Fragment aus pKO4-PaCox23	diese Arbeit
	5' Flanke von PaSco1	KpnI / HinIII Fragment aus pKO4-PaSco1	diese Arbeit
	pIDNA	SalI Fragment aus pSP17	Stahl <i>et al.</i> 1982

2.2 Organismen

2.2.1 Podospora anserina

Für alle Experimente wurde der Wildstamm „s“ von *P. anserina* (Esser 1974) verwendet. Alle im Ergebnisteil dargestellten Transformanten wurden durch Transformation der entsprechend dort angegebenen Plasmide hergestellt.

Anzucht

Alle *P. anserina*-Stämme wurden bei 27°C und Dauerlicht entweder auf Agarplatten mit BM-Medium oder in flüssigem CM-Medium angezogen.

2.2.2 Saccharomyces cerevisiae

In dieser Arbeit wurde der Wildstamm W303 und der Deletionsstamm W303 Δ Sco1 mit dem folgenden jeweiligen Genotyp verwendet:

W03 (*ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 - **)

W303 Δ SCO1 (*ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 Δ sco1::URA3 - Glerum et al. 1996 B*)

* zur Verfügung gestellt von Dr. Rodney Rothstein, Department of Human Genetics, Columbia University

Material und Methoden

Für die Komplementationsversuche wurde der Deletionsstamm mit den im Ergebnisteil angegebenen Plasmiden transformiert.

Anzucht

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte bei 30°C. Es wurde YPAD, YPG oder SD-Medium sowohl als Flüssig- als auch als Festmedium verwendet.

2.2.3 Escherichia coli

Zur Klonierung und Vermehrung aller in dieser Arbeit hergestellten Plasmide wurde der *E. coli*-Stamm XL-1 blue mit folgendem Genotyp verwendet:

recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac^F, proAB, lac^qΔM15, Tn10(Tet^r) (Bullock *et al.* 1987)

Für die Herstellung der Austausch-Cosmide wurde der *E. coli*-Stamm KS272 [Genotyp: F, Δ*lacX74*, *gaE, gaK, thi, rpsL, ΔphoA (PvuII)*] verwendet (Chaveroche *et al.* 2000). Dieser beinhaltet das Plasmid pKOBEG, auf welchem die Komponenten einer hocheffizienten Rekombinationsmaschinerie eines Phagen kodiert sind. Dadurch wird der Austausch Gen ↔ Resistenzmarker auf Cosmidebene bewerkstelligt.

Anzucht

E. coli-Kulturen wurden stets bei 37°C auf festem oder flüssigem LB-Medium (inkl. des entsprechenden Antibiotikums) kultiviert. Solange das Plasmid pKOBEG im Stamm KS272 benötigt wurde, erfolgte die Anzucht bei 30°C.

2.3 Methoden

2.3.1. P. anserina-spezifische Methoden:

2.3.1.1 Isolierung von Gesamt-DNA

Mehrere Impfstückchen des zu untersuchenden Pilzstammes wurden auf einer Cellophan-bedeckten BMM-Platte für drei bis vier Tage angezogen. Das Myzel wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und 1 ml TENS-Puffer zugegeben. Zum Aufschluss des Myzels wurden folgende drei Schritte insgesamt dreimal durchgeführt: 1 min in flüssigem Stickstoff, 1 min stark schütteln („Vortex“) und 10 min bei 70°C bei leichtem Schütteln inkubieren.

Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 13000 x g und RT) entfernt. Um Verunreinigungen der DNA v.a. durch Proteine zu entfernen, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden dem Überstand des obigen Zentrifugationsschritt ein Volumen Phenol zugegeben, durch Invertieren gemischt und die beiden entstandenen Phasen (wässrige und organische) durch Zentrifugation (10 min, 8000 x g und RT) getrennt. Die Oberphase wurde in ein frische Reaktionsgefäß überführt, ein Volumen eines Gemischs aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Material und Methoden

im Verhältnis 25:24:1 zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 8000 x g und RT). Der Überstand wurde nach der Überführung in ein frisches Reaktionsgefäß mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Vermischung und Phasentrennung erfolgte wie in den beiden Schritten zuvor. Um aus dem Überstand die DNA zu fällen wurde ein Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt durch Invertieren und anschließend umgehend die DNA durch Zentrifugation (20 min, 13000 x g und 4°C) sedimentiert. Die DNA wurde in 90 µl A. bid und 10 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2) durch Schütteln bei 37°C rückgelöst. Durch Zugabe von zwei Volumen reinstem Ethanol und anschließender Inkubation bei -80°C wurde die DNA wiederum ausgefällt und durch Zentrifugation (20 min, 13000 x g und 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocken in 50 µl A. bid rückgelöst. Zur Qualitätskontrolle und Mengenabschätzung wurden 1 – 2 µl der Lösung mittels Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.4.6) untersucht.

2.3.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus *P. anserina* wurden pro zu untersuchendem Stamm drei mit sterilen Cellophan-Scheiben bedeckte BMM-Platten mit Stücken beimpft und zwei Tage bei 27°C und Dauerlicht im Brutschrank inkubiert. Mit dem auf den drei Platten gewachsenen Myzel wurden zwei mit je 200 ml CM-Medium befüllte Kolben angeimpft und weitere zwei Tage bei 27°C, Dauerlicht und 140 Upm auf dem Schüttler inkubiert.

Das Myzel wurde über Mull abfiltriert und 10 g (Frischgewicht) davon in flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Das Pulver wurde in 20 ml 60°C warmen GTC/β-Mercaptoethanol gelöst und für 10 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min bei 12000 x g und RT) entfernt. Der Überstand wurde auf ein Kissen aus 3 ml CsCl-Lösung in einem Ultrazentrifugen-Röhrchen geschichtet und für 18 h bei 200000 x g und RT zentrifugiert.

Die sedimentierte RNA wurde nach vorsichtiger Abnahme des Überstands dreimal mit 70% Ethanol (DMPC-bidest) gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl DMPC-bidest wurde die RNA rückgelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zum Präzipitieren der RNA wurden 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,2) und drei Volumen eiskalten reinstem Ethanol hinzugefügt, durch Invertieren gemischt und 1 h bei -80°C inkubiert. Die ausgefallene RNA wurde abzentrifugiert (20 min bei 15000 x g und 4°C), das Sediment in 500 µl 70% Ethanol (DMPC-bidest) gewaschen und luftgetrocknet. Die RNA wurde in einem Volumen von 200 – 500 µl DMPC-bidest bei 60°C rückgelöst, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Qualität der aufgearbeiteten RNA auf einem denaturierenden Agarosegel (2.3.4.6) untersucht.

2.3.1.3 Transformation von *P. anserina*

Bevor Fremd-DNA in *P. anserina* eingebracht werden kann, muss die Chitin-Zellwand abgedaut und somit Protoplasten hergestellt werden.

Material und Methoden

Fünf bis sechs mit sterilen Cellophan-Scheiben belegte BMM-Platten wurden mit Stückchen des zu transformierenden Stammes beimpft und nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 27°C und Dauerlicht wurde das angewachsene Myzel von jeweils einer Platte in jeweils einen mit 200 ml CM-Medium befüllten Kolben überführt. Es folgte eine zweitägige Inkubation bei 27°C, Dauerlicht und 140 Upm. Das Myzel wurde über Mull abfiltriert und 20 g davon wurden in einem Gesamtvolumen von 100 ml TPS mit 20 mg/ml Glucanex in einem Mixer homogenisiert. Der enzymatische Verdau der Zellwand erfolgte im Wasserbad bei 34°C und leichtem Schütteln für zwei Stunden.

Zur Aufreinigung der entstandenen Protoplasten wurde der Ansatz erst über Mull und dann über Glaswolle abfiltriert. Die Protoplasten wurden aus der Lösung durch Zentrifugation (10 min, 3500 x g und RT) sedimentiert und das Sediment dreimal in TPS gewaschen. Nach der Bestimmung der Protoplastenzahl in einer Thoma-Zählkammer wurden für jeden Transformationsansatz 1×10^7 Protoplasten in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, abzentrifugiert (10 min, 3500 x g und RT) und in 200 µl STC aufgenommen.

10 µg des zu transformierenden Plasmids wurden zugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 50 µl PEG-Lösung hinzugegeben, vorsichtig gemischt und anschließend für weitere 20 min auf Eis inkubiert. In vier Schritten à 500 µl wurden nun weitere insgesamt 2 ml PEG-Lösung zugegeben und für 20 min auf Eis und weitere 10 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 4 ml STC wurde der Ansatz verdünnt, anschließend je 1 ml in Überschiebungsmedium gegeben und die Protoplasten auf Platten mit stabilisierendem Transformationsmedium, das das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt, ausgebracht. Nach vier bis vierzehn Tagen wurden die Platten ausgewertet.

2.3.1.4 Herstellung von mikroskopischen Präparaten

In eine Petri-Schale wurde mit A. bid befeuchteter Zellstoff gegeben, auf welchen als Abstandshalter zwei Bündel aus je drei aluminiumverpackten Zahnstochern gelegt wurden. Darauf wurde ein Objektträger platziert. Auf diesem wurden drei Würfel ausgeschnittenen BMMs verteilt. Diese BMM-Stückchen wurden mit dem zu untersuchenden Pilzmyzel beimpft, welches mit einem Deckgläschen abgedeckt wurde. Während der folgenden zweitägigen Inkubation im Brutschrank wuchs das Myzel auf dieses Deckgläschen, das – nachdem es vorsichtig von dem Agarwürfel abgelöst wurde – direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop „Leica DM LB“ mit entsprechenden Einstellungen untersucht wurde. Die Anfärbung der Mitochondrien mit dem Farbstoff „MitoTracker® red CMXRos“ erfolgte durch Inkubation mit einer 0,66 µM konzentrierten Lösung direkt auf dem Deckgläschen unmittelbar vor dem Mikroskopieren.

Folgende Filtersätze wurden verwendet:

Grün-Filter (für eGFP)

Anregung 515 – 560 nm / Emission > 590 nm

Rot-Filter (für MitoTracker® red CMXRos)

Anregung 450 – 490 nm / Emission > 515 nm

Material und Methoden

Die mikroskopischen Bilder wurden mit einer „Leica DC 500“ Kamera aufgenommen und mit dem Computerprogramm „Adobe Photoshop CS2 9.0“ bearbeitet.

2.3.1.5 Isolierung von Mitochondrien

Die Isolierung physiologisch gekoppelter Mitochondrien wurde nach dem von Gredilla *et al.* veröffentlichtem Protokoll (Gredilla *et al.* 2006) mittels differentieller Zentrifugation.

Zehn mit sterilen Cellophan-Scheiben bedeckte BMM-Platten wurden mit Stückchen des entsprechenden Stammes beimpft und ~36 h bei 27°C im Dauerlicht inkubiert. Anschließend wurde das Myzel von jeweils einer Platte in je einen mit 200 ml CM-Medium befüllten Kolben überführt und weitere 24 h bei 27°C im Schüttler bei 140 Upm und Dauerlicht inkubiert.

Alle folgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Das Myzel wurde abfiltriert und mit Hilfe eines BeatBeaters™ in Isolierungspuffer + 0,2% BSA homogenisiert. Das Homogenat wurde über ein Nesseltuch filtriert. Zur Entfernung von Zellbruchstücken wurde 10 min bei 600 x g und 4°C zentrifugiert und nochmals über Glaswolle filtriert. Im nächsten Schritt wurden die Mitochondrien und Vakuolen durch Zentrifugation (20 min, 15000 x g und 4°C) sedimentiert. Der Überstand dieses Schritts wurde als „Cytoplasma“ bezeichnet und aufgehoben. (Die korrekte Bezeichnung des Überstands ist „Post-mitochondrialer Überstand“, besteht aber zum allergrößten Teil aus Cytoplasma). Die Sedimente wurden in Isolierungspuffer ohne BSA aufgenommen, vereinigt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment dieses Schritts bestand aus einem inneren dunklen Teil, bestehend aus Vakuolen, und einem äußeren hellen Teil, den Mitochondrien. Für Lokalisierungsexperimente wurde der dunkle Teil mittels einer Pipettenspitze entfernt und die Mitochondrien in einem angemessenen Volumen Isolierungspuffer ohne BSA aufgenommen (in der Regel 200 µl – 500 µl) und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt.

2.3.1.6 Fraktionierung von Zellbestandteilen für TXRF-Messungen

Für die direkte Bestimmung der Kupfermengen wurden cytoplasmatische und mitochondriale Fraktionen von *P. anserina* isoliert. Basis der Isolierung war die unter 2.3.1.5 beschriebene Isolierung von physiologisch gekoppelten Mitochondrien. Die Pufferzusammensetzung wurde leicht verändert (Sorbit anstelle von Saccharose, Acetat statt HCl). Die cytosolische Fraktion entsprach exakt der als „Cytoplasma“ bezeichneten Fraktion unter 2.3.1.5. Die Mitochondrien wurden weiter über Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigt. So sollten zum einen Kontaminationen anderer Organellen (v.a. Vakuolen) aber zum anderen auch nicht (mehr) vollständig intakte Mitochondrien entfernt werden. Die Selektion auf die Intaktheit der Mitochondrien spielt v.a. bei seneszenten Proben eine wichtige Rolle und wird im Ergebnis- und Diskussionsteil weitergehend erläutert.

Das Sediment des zweiten Hochgeschwindigkeits-Zentrifugationsschritts wurde in seiner Gesamtheit (d.h. ohne die Vakuolen zu entfernen) in 1 ml Isolierungspuffer aufgenommen und auf einen Saccharose-Dichtegradienten (24% / 36% / 50%) geschichtet. Die Auftrennung erfolgte in einer Ultrazentrifuge für 1 h bei 100000 x g und 4°C. Die Bande zwischen 36% und 50% Saccharose wurde mit einer Kanüle entnommen und nochmals in Isolierungspuffer für 20 min bei 15000 x g und 4°C

Material und Methoden

zentrifugiert. Das so erhaltene Sediment wurde in einem angemessenen Volumen (100 μ l – 500 μ l) Isolierungspuffer aufgenommen und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt.

2.3.1.7 Isolierung von mitochondrialer DNA (mtDNA) aus Mitochondrien

Als Biomarker für Seneszenz wurde die Reorganisierung von mitochondrialer DNA (Cummings *et al.* 1979; Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984) und die damit einhergehende Freisetzung von pDNA analysiert. Dazu wurde mtDNA direkt aus isolierten Mitochondrien aufgereinigt. 1 mg wie unter 2.3.1.5 beschrieben frisch isolierter Mitochondrien wurde für 10 min mit 0,5 mg/ml Proteinase K behandelt und anschließend die DNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.3.4.3) und Ethanol-Präzipitation (siehe 2.3.4.2) aufgereinigt. Gleiche Mengen von mtDNA wurden über Nacht mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut und mittels Southern Blot Analyse (siehe 2.3.4.7) auf pDNA hin untersucht.

2.3.2 *S. cerevisiae*-spezifische Methoden:

2.3.2.1 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe wurde nach der von Gietz und Woods publizierten Methode („LiAc/ssDNA/PEG-Methode“) durchgeführt (Gietz und Woods 2002)

Als Vorkultur wurden 100ml YAPD-Medium mit einer frisch ausgestrichenen Hefe-Kolonie des Wildstamms W303 beimpft. Diese Kultur wurde 24 - 36 Stunden im Schüttler bei 30°C und 180 Upm inkubiert. Anschließend wurden als Hauptkultur pro Transformationsansatz 50ml YAPD mit der Vorkultur beimpft, so dass die OD₆₀₀ ungefähr 0,2 betrug. Die Hauptkultur wurde bei 30°C und 180 Upm solange inkubiert, bis sie OD₆₀₀ = 0,6 - 0,8 erreichte. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 3000 x g und RT) geerntet. Zum Waschen wurde das Sediment im gleichen Volumen A. bid resuspendiert und die Zentrifugation wiederholt. Das entstandene Sediment wurde in 1/10 Volumen LiSORB-Lösung rückgelöst. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 30°C im Wasserbad. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000 x g, 10 min) sedimentiert und in 1/1000 Volumen (50 μ l) LiSORB-Lösung rückgelöst. Zu den Zellen wurden 50 μ l eines Gemisches aus 25 μ l frisch denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und 25 μ l LiSORB-Lösung gegeben und gut gemischt. Im nächsten Schritt folgte die Zugabe von 900 μ l 50% PEG/10 x TE/ 10 x LiOAc (8:1:1). Von dem zu transformierenden Plasmid wurden 100 ng in einem Volumen von 10 μ l vorgelegt, die Zellen hinzugefügt und 30 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Durch einen zweimaligen Hitzeschock für je 8 min bei 42°C mit dazwischenliegender achtminütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Aufnahme der DNA in die Hefezellen.

Zur Regeneration wurden zu den Zellen 10 ml SD-Medium, in dem die Aminosäure fehlt, die zur Selektion der Plasmidaufnahme verwendet wird, zugegeben und 1 Stunde bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Material und Methoden

Ein Zentrifugationsschritt bei 3000 x g und 10 min ertete die Zellen, die in 1 ml SD-Medium wieder aufgenommen wurden und anschließend in Aliquots von 200 µl auf SD-Platten ausplattiert wurden. Nach vier- bis fünftägiger Inkubation bei 30°C wurden die Platten ausgewertet.

2.3.2.2 Komplementationstest

Der Verlust von SCO1 in *S. cerevisiae* führt zum Verlust der Atmungskompetenz, d.h. der entsprechende Stamm kann nur durch Gärung Energie gewinnen und somit auf Medium mit einer nicht vergärbaren C-Quelle (z.B. YPG) nicht anwachsen. Ein Test auf Wachstum auf vergärbaren bzw. nicht vergärbarem Medium liefert somit einfach und schnell Aufschluss über eine funktionierende mitochondriale Atmung.

Es wurden von den zu untersuchenden Stämmen 100ml YPAD mit frisch ausgestrichenen Kulturen beimpft. Die Zellen wurden bis zur $OD_{600}=1,0$ inkubiert. Dann wurden Verdünnungen um jeweils den Faktor 10 (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) erstellt. Von den verschiedenen Verdünnungen wurden auf YPAD- und YPG-Platten 5 µl Zelllösungen nebeneinander getropft. Die Platten wurden drei bis sechs Tage bei 30°C inkubiert und ausgewertet.

2.3.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Mit einer frisch auf einer YPAD-Platte angewachsenen Kolonie wurde eine 10 ml YPAD-Flüssigkultur beimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 2400 x g und RT) geerntet. Das Sediment wurde in 200 µl Extraktionspuffer aufgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 0,4 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser) und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vorgelegt waren. Der Gesamtansatz wurde für 2 min stark gemischt („Vortex“). Anschließend wurden nochmals je 300 µl Extraktionspuffer und 300 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben und wiederum 1 min stark gemischt („Vortex“). Durch Zentrifugation (10 min bei 14000 x g und RT) wurde die Phasentrennung herbeigeführt und die Glaskugeln sedimentiert. Die Oberphase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach der Wiederholung der Misch- und Zentrifugationsschritte wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zum Fällen der RNA 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,2) und zwei Volumen reiner Ethanol zugegeben. Die Präzipitation erfolgte für 1 h bei -20°C. Durch Zentrifugieren (20 min bei 14000 x g und 4°C) wurde die RNA sedimentiert und das Sediment in 500 µl 70%-igem Ethanol (DMPC-bidest) getrocknet. Nachdem die RNA luftgetrocknet war, wurde sie in einem angemessenen Volumen DMPC-bidest rückgelöst und die Konzentration der Lösung photometrisch bestimmt.

2.3.3 *E. coli*-spezifische Methoden:

Material und Methoden

2.3.3.1 Transformation von *E. coli*

Hitzeschock-Transformation

Die Hitzeschock-Methode wurde zur Transformation von *E. coli* XL-1 blue Zellen eingesetzt. Nach dem Auftauen eines Aliquots *E. coli* XL-1 blue auf Eis wurde der halbe Ligationsansatz bzw. 5 – 10 ng des zu transformierenden Plasmids zugegeben und gemischt. Es schloss sich eine 30-minütige Inkubation auf Eis an. Die Aufnahme der DNA erfolgte während eines 90 Sekunden dauernden Hitzeschocks bei 42°C im Wasserbad. Nach kurzer Erholung auf Eis wurde 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und die Zellen zur Regeneration und Ausbildung der auf dem transformierten Plasmid kodierten Resistenz für 1 h bei 37°C geschüttelt. Aliquots von 100 – 300 µl wurden auf LB-Platten, die das entsprechende Selektions-Antibiotikum (siehe 2.1.4) enthielten, ausgestrichen und nach über-Nacht-Inkubation bei 37°C die Transformation ausgewertet.

Elektroporation

Da der *E. coli*-Stamm KS272, der für die Herstellung der Austausch-Cosmide verwendet wurde, das thermosensitive Plasmid pKOBEG enthält (Chaverocche *et al.* 2000), konnte nicht die Standard-Methode (Hitzeschock) für die Transformation verwendet werden. Als Alternative wurde die Elektroporation angewandt.

Ein Aliquot der elektrokompenten Zellen wurde auf Eis aufgetaut und 1 µg der zu transformierenden DNA, die zuvor durch Dialyse salzfrei gemacht wurde, zugegeben. Nach kurzer Inkubation auf Eis (30 – 60 s) wurde der Ansatz in die Küvette überführt und direkt anschließend der Elektropuls (25 µF, 400* und 1,8 kV) durchgeführt. Unmittelbar nach dem Impuls wurde 1 ml SOC-Medium zugegeben und dadurch die Zellen aus der Küvette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach einstündiger Regeneration auf dem Schüttler bei 30°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 s bei 14000 x g und RT) geerntet und in 100 µl frischem SOC-Medium wieder aufgenommen. Dieses Volumen wurde auf LB-Platten, die das entsprechende Selektions-Antibiotikum enthielten, ausgestrichen und nach 24-stündiger Inkubation bei 30°C im Brutschrank die Transformation ausgewertet.

2.3.3.2 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*

CaCl₂-kompetente *E. coli* XL-1 blue

Nach dem Ausstreichen auf einer LB-Platte, die als Selektions-Antibiotikum Tetracyclin enthält (LB_T), wurde mit einer Kolonie eine 5 ml LB_T-Kultur angeimpft und diese über Nacht bei 37°C geschüttelt. Mit dieser Vorkultur wurde eine 150 ml LB_T-Kultur beimpft und diese bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 – 0,7 inkubiert. Alle sich nun anschließenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min bei 2000 x g und 4°C) geerntet, in einem Volumen kaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert und das entstandene Sediment in 1/10 Volumen kaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen. Nachdem die Zellen 24 h im Kühlraum bei 4°C auf Eis standen, wurde die Zellsuspension mit eiskaltem Glycerin versetzt, so dass dessen Endkonzentration 15% betrug. Die

Material und Methoden

Bakterien wurden in Aliquots à 300 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

elektrokompetente *E. coli* KS272

Von einer frisch ausgestrichenen Kolonie *E. coli* KS272, die das auszuschaltende Gen enthaltende Cosmid bereits in einer vorhergegangenen Transformation aufgenommen hatten, wurde eine 5 ml Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Dem LB-Medium dafür wurden sowohl Ampicillin als auch Chloramphenicol (LB_{AC}) zur Selektion auf das Cosmid bzw. pKOBEG als auch 0,2% Arabinose zur Induktion der auf pKOBEG kodierten Rekombinationsmaschinerie zugesetzt. Mit der Vorkultur wurde ein 150 ml LB_{AC}+0,2% Arabinose beimpft und diese bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 – 0,7 im Schüttler bei 30°C inkubiert. Da es für die Elektroporation entscheidend ist, dass die Zellen vollkommen salzfrei sind, wurden die Bakterien durch Zentrifugation (10 min bei 4500 x g und 4°C) geerntet und insgesamt dreimal in einem Volumen kaltem A. bid wieder aufgenommen. Das Sediment der letzten Zentrifugation wurde in 1/12,5 Volumen A. bid resuspendiert und von GSA- in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurde das Sediment in 1/333,33 Volumen 10% Glycerin rückgelöst und die Zellen in Aliquots à 50 µl verteilt. Nachdem sie in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, wurden die Bakterien bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (STET-Miniprep)

Von jedem zu untersuchenden Klon wurde mit einem sterilen Zahnstocher eine 5 ml LB_A-Kultur angeimpft und diese über Nacht bei 37°C geschüttelt. 2 ml dieser Kultur wurden in Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 14000 x g und RT) geerntet. Das Zellsediment wurde in 150 µl STET-Puffer rückgelöst, 12 µl Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und nach starkem Mischen für >60 s bei 94°C inkubiert. Eine Zentrifugation (10 min, 14000 x g und RT) trennte die Zellbruchstücke ab. Durch Zugabe von 150 µl Isopropanol wurde aus dem Überstand die Plasmid-DNA gefällt (5 min -80°C) und durch Zentrifugieren (15 min, 14000 x g und 4°C) sedimentiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70% Ethanol wurde das Sediment luftgetrocknet und anschließend in 50 µl A. bid die DNA rückgelöst. Für die folgende Restriktion wurden 3 – 10 µl eingesetzt.

2.3.3.4 Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab (QIAGEN-Midiprep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA im mittleren Maßstab wurde mit dem „Plasmid Purification Midi/Maxi Kit“ der Firma QIAGEN, Hilden, nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 – 250 µl A. bid rückgelöst und die Konzentration der Lösung photometrisch bestimmt.

Material und Methoden

2.3.4 allgemeine molekularbiologische Methoden

2.3.4.1 Restriktion von DNA

Standardmäßig wurde der analytische Verdau von DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl in dem vom Enzymhersteller empfohlenen Puffer und 5 – 10 U des Enzyms durchgeführt. Präparative Restriktionen wurden im Gesamtvolumen von 100 µl mit >20 µg DNA und 25 U Enzym durchgeführt.

2.3.4.2 Ethanol-Präzipitation von DNA

Um DNA aus wässriger Lösung zu fällen, wurden der DNA-Lösung 1/10 Volumen 3 M NaAcetat (pH 5,2) und 2 Volumen reinstem Ethanol zugesetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurde für 15 – 60 min bei -20°C inkubiert. Anschließend folgte zur Sedimentierung der präzipitierten DNA ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 14000 x g und 4°C. Durch Zugabe von 500 µl kaltem 70% Ethanol wurde das Sediment gewaschen. Anschließend wurde das Sediment luftgetrocknet und in einem angemessenen Volumen A. bid resuspendiert.

2.3.4.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von Nukleinsäuren

Mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion lassen sich verunreinigende Proteine aus Nukleinsäure-Lösungen entfernen. Dazu wurden zur Nukleinsäure-Lösung ein Volumen Phenol zugegeben, stark gemischt („Vortex“) und durch Zentrifugation (5 min bei 14000 x g und RT) das Gemisch in wässrige, die DNA enthaltende, und in organische, phenolische Phase getrennt. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Hier wurde ein Volumen eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zugegeben und der Misch- und Zentrifugationsschritt wiederholt. Die Oberphase wurde anschließend nochmals mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die DNA aus der nun entstandenen wässrigen Oberphase wurde durch eine sich anschließende Ethanol-Präzipitation (siehe 2.3.4.2) gefällt.

2.3.4.4 PCR – Polymerase-Ketten-Reaktion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Polymerasen für die PCR verwendet. Sollte das PCR-Produkt kloniert werden, so erfolgte die Amplifikation mit der Phusion-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt), für alle anderen Anwendungen wurde die *Taq*-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) mit den entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Puffern verwendet. Als DNA-Matrize wurden bei Plasmid-DNA 10 ng, bei Cosmid-DNA 70 ng, bei Präparationen genomischer DNA 1 µl (~50 – 100 ng), frisch gewachsene *E. coli*-Kolonien verwendet oder im Falle einer RT-PCR (siehe 2.3.4.9) variable Volumina gleicher cDNA-Mengen.

Material und Methoden

<u>Taq-Polymerase</u>	<u>Phusion-Polymerase</u>
1 x Puffer	1 x Puffer
1,5 mM MgCl ₂	-
0,6 mM dNTP-Mix	1 mM dNTP-Mix
12,5 pmol je Oligonukleotid	25 pmol je Oligonukleotid
2,5 U Polymerase	2,5 U Polymerase
variable Volumen DNA-Matrize	
ad 30 µl A. bid	ad 50 µl A. bid

Für jede Kombination von Oligonukleotid-Primer wurde in einem Vorversuch die optimale Anlagerungstemperatur ermittelt.

Das Ergebnis der PCR wurde entweder mittels Agarosegel überprüft und/oder über das „NucleoSpin-Extract II“ (Macherey&Nagel, Düren) aufgereinigt.

Die verwendeten PCR-Programme waren:

Taq-Polymerase: 95°C 300 s | [95°C 30 s; XX°C* 30 s; 72°C 30 s] x 35 | 72°C 420 s

Phusion-Polymerase: 98°C 120 s | [98°C 20 s; XX°C* 20 s; 72°C 20 s] x 38 | 72°C 420 s

* vorher ermittelte optimale Anlagerungstemperatur für die spezifische Oligonukleotid-Kombination

2.3.4.5 Ligation

Die Verknüpfung von kompatiblen DNA-Enden wurde standardmäßig in einem Volumen von 10 µl durchgeführt, wobei 1 µl T4-Ligase-Puffer und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) verwendet wurden. Die eingesetzten Volumen der beteiligten DNA-Stücke war je nach Reaktion unterschiedlich, das molare Verhältnis zwischen Insertionsfragment und aufnehmendem Plasmid lag stets zwischen 3 : 1 und 6 : 1.

2.3.4.6 Agarosegelelektrophorese

Für die größenabhängige Auftrennung von Nukleinsäuren wurde die Elektrophorese über Agarosegele verwendet. Hierbei wurde DNA in Standard TAE-Gelen aufgetrennt, RNA in denaturierenden MOPS/Formaldehyd-Gele.

TAE-Gelelektrophorese

Für alle hier durchgeführten Experimente wurden stets 1%-ige TAE-Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge an Agarose wurde in einem Kolben im entsprechenden Volumen 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in einen vorbereiteten Gelträger (mit Kamm zur Ausformung der Taschen) gegossen. Nach dem Aushärten wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine mit ausreichend 1 x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt und die mit DNA-Ladepuffer versetzten aufzutrennenden Proben samt passendem DNA-Größenstandard (siehe 2.1.9) in die Taschen pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 60 – 70 V wurde die Elektrophorese gestartet und beendet nachdem die Bromphenolblau-Front das untere Viertel des Gels erreicht hatte. Zum Anfärben der DNA wurde das Gel in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Nach ausreichender Inkubation im Färbebad wurde das Ergebnis auf einem UV-Transilluminator betrachtet, fotografiert und ausgewertet.

Material und Methoden

Wenn die aufgetrennte DNA anschließend in einer Southern Blot Analyse auf eine Membran übertragen werden sollte, so wurde das Gel zum Entfernen des Ethidiumbromids für ~30 min in A. bid gelegt.

denaturierende Agarosegelelektrophorese

Da RNA aufgrund ihrer Einzelsträngigkeit sehr leicht Sekundärstrukturen ausbildet, die die Laufeigenschaften in einem Agarosegel verfälschen würden, muss sie denaturiert (durch Erhitzen auf 65°C) und in diesem Zustand während der Auftrennung gehalten werden (durch Formaldehyd und Formamid).

Für alle Versuche wurden stets 1,5%-ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in DMPC-bidest durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen auf ~65°C 10% (v/v) 10 x MOPS und 22% (v/v) Formaldehyd zugegeben. Das Gemisch wurde in einen vorbereiteten Gelträger (inkl. Kamm) gegossen und nach dem Aushärten der Agarose das Gel in einer Laufkammer platziert und mit einfach konzentriertem MOPS-Puffer als Laufpuffer überschichtet. Die RNA-Proben (10 µg) wurden in RNA-Probenpuffermix für 10 min bei 65°C denaturiert und nach kurzem Abkühlen auf Eis in die Taschen des Gels pipettiert. Durch Anlegen einer Spannung von 60 – 70 V wurde die Auftrennung gestartet. Nachdem die blaue Front des Ladepuffers das untere Drittel des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel zum Anfärben der RNA in ein Ethidiumbromid-Färbebad gelegt. Da Ethidiumbromid nicht nur mit Nukleinsäuren sondern auch mit dem in der Gelmatrix vorhandenen Formaldehyd interagiert, musste das Gel vor der Auswertung auf dem UV-Transilluminator für mind. 3 h in Wasser entfärbt werden. Das Ergebnis wurde durch Fotografieren dokumentiert.

Sollte die aufgetrennte RNA anschließend auf eine Membran zum Zwecke einer Northern Blot Analyse (siehe 2.3.4.8) übertragen werden, so wurde das zu blottende Gel nicht gefärbt.

2.3.4.7 Southern Blot Analyse

Mittels einer Southern Blot Analyse kann man bestimmte DNA-Sequenzen in einem Gemisch von DNA-Fragmenten nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Markierung Digoxigenin verwendet.

Transfer der DNA

Die DNA-Proben, in welchen das gesuchte definierte DNA-Fragment nachzuweisen ist, wurden mittels Standard-TAE-Gelelektrophorese (siehe 2.3.4.6) der Größe nach aufgetrennt. Nach dem Färben mit Ethidiumbromid wurde das Gel ausreichend lang gewässert. Für den Transfer auf eine Nylonmembran („Hybond N[®], Amersham) wurde eine passend zugeschnittene Membran mit 2 x SSC angefeuchtet und auf eine Vakuumapparatur gelegt. Zum Abdichten wurde eine Folienmaske um die Membran herum gelegt und die Apparatur luftdicht verschlossen. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und durch das Anlegen eines Unterdrucks von 50 mbar wurde der Transfer gestartet. Da v.a. bei Proben aus genomischer DNA die Fragmente sehr groß sind und zusätzlich die DNA noch doppelsträngig vorliegt, was eine Detektion definierter Sequenzen mittels Hybridisierung mit einer markierten Sonde unmöglich machen würde, vorliegt, wurde das Gel in einem ersten Schritt für 25 min mit 0,25 M HCl überschichtet. Dadurch wird die DNA depuriniert, wodurch kleine Fragmente entstehen. Durch

Material und Methoden

Überschichten für ebenfalls 25 min mit Denaturierungspuffer wurden die Doppelstränge der DNA voneinander getrennt. Zum Neutralisieren wurde im dritten Schritt das Gel mit Neutralisierungspuffer für weitere 25 min inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der DNA für weitere 90 min durch Überschichten mit 20 x SSC. Nach dem Entfernen der Nylonmembran aus der Vakuumapparatur wurde sie kurz in 2 x SSC gelegt und nach kurzem Antrocknen von beiden Seiten die DNA durch UV-Licht mit der Membran quervernetzt („Stratalinker“, Stratagene).

Hybridisierung

Vor der eigentlichen Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Sonde wurde die Membran für ~3 h mit „high SDS“- (Prä-)Hybridisierungslösung bei 58°C prähybridisiert. Dadurch sollten alle noch freien Bindungsstellen für DNA auf der Membran abgesättigt und somit der Hintergrund der Detektion verbessert werden. Durch Zugabe von 5 – 25 ng frisch denaturierter Digoxigenin-markierter Sonde wurde die Hybridisierung gestartet, die über Nacht bei 58°C im Hybridisierungsofen erfolgte.

Markierung von DNA-Sonden mit Digoxigenin

Für eine typische Markierungsreaktion wurden bis zu 1 µg des zu markierenden DNA-Fragments durch Aufkochen denaturiert und nach dem Abkühlen auf Eis 2 µl Hexanukleotidgemisch und 2 µl dNTP-Mix (jeweils aus dem „DIG-DNA labeling and detection kit“ von Roche) zugegeben. Die Markierung wurde durch Zugabe von 1 µl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (2 U/µl) wurde die Reaktion gestartet und nach 20 h bei 37°C durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt.

Detektion

Um nichtgebundene DNA-Sonde von der Membran zu entfernen wurde eine Stringenzwaschung durchgeführt. Dazu wurde die Membran zweimal je 5 min in je 20 ml 2 x SSC 0,1 % SDS bei RT und zweimal je 15 min in je 20 ml 0,1 x SSC 0,1 % SDS bei 60°C gewaschen. Die Detektion der an die spezifische Zielsequenz gebundenen markierten Sonde basierte auf einer Antikörper-vermittelten Bindung von alkalischer Phosphatase an die Digoxigenin-Moleküle. Die alkalische Phosphatase kann anschließend ein Substrat umsetzen. Bei dieser Reaktion wird Strahlung emittiert („Chemilumineszenz“). Um die Membran in dem neuen Puffersystem zu äquilibrieren wurde sie für 5 min bei RT mit DiG-WP („Digoxigenin-Waschpuffer“) inkubiert. Zum Absättigen aller freien Bindungsstellen für den α -Digoxigenin-Antikörper wurde die Membran für 30 min bei RT in DiG-2 geschwenkt. Zu dieser Lösung wurde anschließend Antikörper (1 : 10000), an den die alkalische Phosphatase gekoppelt war, gegeben und weitere 30 – 60 min bei RT inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe in DiG-WP für je 15 min bei RT. Um optimale Bedingungen für die folgende Reaktion der an den Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase sicherzustellen, wurde die Membran für 5 min in DiG-3 äquilibriert. Anschließend wurde das Chemilumineszenz-Substrat (CSPD) auf die Membran gegeben, nach 5 min Inkubation die Lösung wieder entfernt und die Membran in Folie eingeschweißt. Die Exposition auf einen Röntgenfilm in einer Röntgenkassette erfolgte für 2 – 4 Stunden. Anschließend wurde der Film entwickelt und somit der Versuch ausgewertet.

Um die selbe Membran nochmals mit einer anderen Sonde hybridisieren zu können, wurde sie zweimal für je 30 min in je 30 ml 0,2 M NaOH, 2 % SDS geschwenkt. Dadurch wurden nicht die hybridisierten Sondenmoleküle entfernt, aber das Digoxigenin-Molekül gespalten und somit die alkalische

Material und Methoden

Phosphatase abgewaschen, so dass die bereits vorhandenen Sondenfragmente bei einer neuerlichen Detektion nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Dem Abspaltungsschritt folgten drei Waschschriffe mit ausreichend 2 x SSC für jeweils 15 min.

2.3.4.8 Northern Blot Analyse

Über Northern Blot Analysen lassen sich quantitativ bestimmte Transkripte in einem RNA-Gemisch nachweisen und so Rückschlüsse auf deren Expression ziehen. Die sensitivste Methode zur Markierung, die auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ist die Verwendung von radioaktiv markiertem Cytosin-Nukleotid (α - ^{32}P -dCTP).

Transfer der RNA

Die zu untersuchende RNA wurde über denaturierende Agarosegelelektrophorese (siehe 2.3.4.6) aufgetrennt, anschließend aber nicht mit Ethidiumbromid gefärbt. Eine Nylonmembran („Hybond N[®]“, Amersham) wurde auf die Größe des Gels zugeschnitten, mit 2 x SSC-Puffer angefeuchtet und auf der Vakuum-Apparatur platziert. Der nicht von der Membran bedeckte Teil der Apparatur wurde mit einer Folienmaske abgedichtet. Das Agarosegel wurde auf die Membran gelegt und die Apparatur luftdicht verschlossen. Das Gel wurde mit 20 x SSC-Puffer überschichtet und während des gesamten Transfers darauf geachtet, dass sich stets ausreichend 20 x SSC-Puffer auf dem Gel befindet. Durch Anlegen eines Unterdrucks von 50 mbar wurde der Transfer der RNA auf die Membran gestartet. Nach ~120 min wurde der Druck abgeschaltet und die Membran aus der Vakuum-Apparatur entfernt, kurz in 2 x SSC gespült und zum Fixieren der Nukleinsäure nach kurzem Abtrocknen beidseitig durch UV-Licht („Stratalinker“, Stratagene) quervernetzt. Die Membran wurde anschließend entweder direkt für eine Hybridisierung verwendet oder nach dem Trocknen aufbewahrt.

Hybridisierung

Vor der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde wurde die Membran für etwa eine Stunde bei 37°C im Hybridisierungsöfen mit 10 – 20 ml Prähybridisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die markierte Sonde durch Kochen denaturiert und nach Abkühlen auf Eis zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 37°C im Hybridisierungsöfen.

Markierung von DNA-Sonden mit α - ^{32}P -dCTP

Die sensitivste Methode zur Markierung von DNA-Sonden für Transkriptanalysen ist die radioaktive Markierung mit α - ^{32}P -dCTP. Ein typischer Markierungsansatz enthielt die folgenden Komponenten:

- 36,5 μl DNA-Fragment (350 ng)
- 5 μl DNA-Polymerase-Puffer
- 2 μl OPL-I
- 3 μl OPL-II –C
- 1 μl Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (2 U/ μl)
- 2,5 μl α - ^{32}P -dCTP (12,5 μCi)

Die Inkubation erfolgte für etwa eine Stunde bei 37°C. Zum Abstoppen der Reaktion und Abtrennen der nicht eingebauten Radio-Nukleotide wurden 50 μl STE-Puffer zugegeben und der Ansatz über

Material und Methoden

„ProbeQuant G-50“ (Amersham) aufgereinigt. Der Durchfluss nach der Zentrifugation wurde direkt in kochendem Wasser denaturiert und nach Abkühlen auf Eis in seiner Gesamtheit zur Prähybridisierungslösung gegeben.

Detektion

Um nicht gebundene Sonde von der Membran zu entfernen, wurden zwei Waschriffe durchgeführt. Im ersten wurde die Membran zweimal je 5 min mit je 20 ml 2 x SSC, 0,1 % SDS bei 37°C gewaschen; im zweiten Schritt zweimal je 15 min in je 20 ml 0,1 x SSC 0,1 % SDS ebenfalls bei 37°C. Anschließend wurde die Membran auf ein Filterpapier gelegt und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die radioaktiven Signale wurden durch die Exposition der Membran gegenüber einem Röntgenfilm über einen unterschiedlichen Zeitraum in einer Röntgenkassette inkl. Verstärkerfolie bei -80°C sichtbar gemacht

Sollte die selbe Membran noch mit weiteren Sonden hybridisiert werden (z.B. rDNA-Fragment von *Saccharomyces carlsbergensis* zum Nachweis der Beladung der einzelnen Spuren mit gleichen Mengen Gesamt-RNA), so wurde die gebundene Sonde durch dreimaliges Waschen mit heißem 0,1 x SSC 0,1 % SDS von der Membran entfernt. Mit einem Handmonitor wurde der Erfolg des Waschens überprüft; war die Sonde vollständig entfernt, konnte keine radioaktive Strahlung mehr detektiert werden.

2.3.4.9 RT-PCR

Die RT-PCR – PCR mit vorausgehender reverser Transkription von RNA in cDNA – ist eine sensitive Methode für die Transkriptanalyse.

Um Kontaminationen durch genomische DNA ausschließen zu können, wurden die aus *P. anserina* isolierten RNA-Proben mit DNase I inkubiert (50 µg in 100 µl mit 10 U DNase I und entsprechendem Puffer für 1 h bei 37°C). Zum Entfernen der DNase I wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.3.4.3) durchgeführt.

Für die reverse Transkription wurden 5 µg Gesamt-RNA verwendet. Sie wurde mit der „RevertAid M-MuLC RT“ (MBI fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurde als Oligonukleotid-Primer ein oligo-(dT)-Primer verwendet.

Nach Abschluss der RT-Reaktion wurde das Volumen von 20 µl auf 100 µl mit A. bid erhöht und für die sich anschließende PCR (siehe 2.3.4.4) 2,5 µl eingesetzt. Durch Vergleich der Amplifikatmengen einer PCR mit Oligonukleotid-Primern für das *PaPorin*-Gen („PaPorin 8“ und „PaPorin 9“ – siehe 2.1.11) wurden die für die folgenden PCR-Reaktionen verwendeten Volumina cDNA angepasst, so dass jeweils die gleichen Mengen eingesetzt wurden.

2.3.4.10 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen oder PCR-Ansätzen

Um DNA-Fragmente aus einem bestimmten Reaktionsgemisch oder aus Agarosegelen aufzureinigen wurde das „NucleoSpin-Extract II“ der Firma Macherey&Nagel (Düren) nach Herstellerangaben verwendet. Die Elution im letzten Schritt wurde stets mit 28 µl A. bid durchgeführt.

Material und Methoden

2.3.4.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung wurde in einem Photometer bestimmt. Dazu wurde von einer geeigneten Verdünnung die Absorption bei 260 nm und bei 280 nm gemessen. Bei 260 nm liegt das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, bei 280 nm das Absorptionsmaximum von phenolischen Seitenketten von Aminosäuren. Durch Bildung des Quotients Abs_{260} / Abs_{280} kann somit die Verunreinigung durch Proteine in der DNA/RNA-Lösung abgeschätzt werden. Idealerweise liegt der Wert für den Quotienten („Ratio“) zwischen 1,8 und 2,0.

Die Konzentration der DNA bzw. RNA errechnet sich nach den folgenden Formeln

$$[DNA] (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = 0,05 \cdot Abs_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 2$$

$$[RNA] (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = 0,04 \cdot Abs_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 2$$

Die Multiplikation mit dem Faktor 2 in der Formel ergibt sich aus der Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette.

2.3.4.12 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Dazu wurde eine Eichgerade mit 0 μg , 5 μg , 10 μg und 20 μg BSA erstellt und anhand dieser die unbekannte Proteinkonzentration der zu bestimmenden Probe errechnet. Die Proteinproben wurde in insgesamt 200 μl A. bid vorgelegt und 800 μl von 1 : 5 verdünntem „Roti-Nanoquant“ (Roth) zugegeben. Von den Proben unbekannter Konzentration wurden 2 μl für die Messung eingesetzt. Für alle Proben wurde die Absorption bei den Wellenlängen 450 nm und 590 nm gemessen. Zum Erstellen der Eichgerade wurde der Quotient aus Absorption bei 590 nm und Absorption bei 450 nm (Abs_{590} / Abs_{450}) der BSA-Proben gegen die bekannte Proteinkonzentration aufgetragen. Mit Hilfe computerunterstützter linearen Regression konnte daraus die Konzentration der zu bestimmenden Proteinproben errechnet werden.

2.3.4.13 „Digitonin-Assay“

Um die exakte Lokalisierung von Proteinen innerhalb von Mitochondrien zu bestimmen wurde ein sog. „Digitonin-Assay“, basierend auf Arbeiten von Hartl *et al.* (Hartl *et al.* 1986), etabliert und angewandt. Isolierte Mitochondrien werden mit unterschiedlichen Mengen des milden Detergens' Digitonin inkubiert und anschließend durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Dabei werden die Membranen der Mitochondrien beginnend mit der äußeren Membran aufgelöst, wodurch die sich darin bzw. im davon umschlossenen Sub-Kompartiment befindenden Proteine durch die Zentrifugation nicht mehr sedimentiert werden und somit im Überstand nachweisbar sind. Dieser Übergang Sediment → Überstand erfolgt in der Reihenfolge äußere Membran → Intermembranraum → innere Membran → Matrix. Anhand von Markerproteinen, z.B. die MnSOD für die mitochondriale Matrix, lässt sich somit die Lokalisierung von in die Mitochondrien eingebrachten Proteinen bestimmen.

Hier wurden die folgenden Digitonin-Konzentrationen eingesetzt:

0 %; 0,01 %; 0,02 %; 0,04 %; 0,05 %; 0,1 %; 0,2 %; 0,4 %

Material und Methoden

Pro Ansatz wurden je 100 µg frisch isolierte Mitochondrien (siehe 2.3.1.5) durch Zentrifugieren (10 min bei 16300 x g und 2°C) sedimentiert und in 100 µl SEMK-Puffer resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Mitochondrien in 50 µl SEMK+P-Puffer rückgelöst. In separaten Reaktionsgefäßen wurden je 50 µl Digitonin-Verdünnungen in SEMK+P-Puffer hergestellt, die jeweils doppelt konzentriert waren als die oben angegebenen verwendeten Mengen. Diese 50 µl wurden zu den Mitochondrien gegeben, gemischt und exakt 1 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden sieben Volumen SEMK+P-Puffer zugegeben. Die Trennung in Überstand und Sediment erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 25000 x g und 2°C. Das entstandene Sediment wurde direkt in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine des Überstands wurden durch Zugabe von ¼ Volumen 50% TCA gefällt und durch Zentrifugation (14000 x g für 15 min bei 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde mit Aceton gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Die Proteine wurden direkt in 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Sediment und Überstände wurden durch SDS-PAGE (siehe 2.3.4.14) und Western Blot Analysen (siehe 2.3.4.15) weiter untersucht und somit der Versuch ausgewertet.

2.3.4.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts wurden stets Standard Glycin-SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Es kamen stets 16%-ige Gele zum Einsatz. Alle für die Elektrophorese und auch für eine sich anschließende Western Blot Analyse verwendeten Materialien stammten aus dem „MINI PROTEAN II“-System von Bio-Rad

Zwischen zwei vorher gründlich gereinigte Glasplatten, die durch Abstandshalter getrennt waren und sich in einem Gießstand eingespannt befanden, wurde die Trenngellösung gegossen und zur Vermeidung von Luftblasen und unsauberen Kanten umgehend mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren der Gelmatrix wurde das Isopropanol abgeschüttet und mit A. bid gespült. Auf das Trenngel wurde die Sammelgellösung geschichtet und ein Kamm zum Ausformen der Taschen eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels wurde das Gel aus dem Gießstand entfernt, in eine Laufapparatur eingespannt, diese mit Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit Laufpuffer gespült.

Die aufzutrennenden Proteinproben wurden in 1 x Probenpuffer vor dem Auftragen bei 95°C für 5 min aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden sie in die Taschen pipettiert, ebenso wie ein passender Protein-Größenstandard (siehe 2.1.9). Durch Anlegen einer Spannung von 100 V wurde die Elektrophorese gestartet. Nachdem die Blau-Front des Ladepuffers unten aus dem Gel ausgetreten war, wurde der Vorgang gestoppt. Meist schloss sich direkt eine Western Blot Analyse (siehe 2.3.4.15) an.

2.3.4.15 Western Blot Analyse

Als Membran, auf die die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung übertragen wurden, wurde eine PVDF-Membran (Millipore) verwendet. Der Transfer der Proteine erfolgte in Komponenten des „MINI PROTEAN II“-System der Firma Bio-Rad.

Material und Methoden

Transfer

Eine auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde durch Inkubieren in Methanol (20 s) aktiviert und anschließend vor dem Transfer für 10 – 15 min in Blotting-Puffer äquilibriert. Ebenso wurden die verwendeten Schwämme und Filterpapierstücke vor dem Transfer in Blotting-Puffer durchfeuchtet. Der Aufbau für den Transfer entsprach den im „MINI PROTEAN II“-System beschriebenen Herstellerangaben. Der Transfer erfolgte bei 100 V Stromspannung für 70 min.

Die PVDF-Membran wurde in Methanol gelegt und anschließend vollständig getrocknet. Durch Anfärben der Proteine mit dem unspezifischen Farbstoff „Ponceau-Rot“ auf der Membran wurde der Erfolg des Transfers kontrolliert. Nach dem Färben wurden der Methanol- und der Trocknungsschritt wiederholt.

Immunodetektion

Auf die trockene Membran wurde direkt die Primärantikörper-Lösung (Antikörper verdünnt in Milchpulverlösung) gegeben und für 1 h – über Nacht inkubiert. Anschließend folgten zwei Waschschrte mit Milchpulverlösung für jeweils 10 min. Zum Nachweis von an das korrekte Antigen (= Protein) gebundenem Primärantikörper und zur gleichzeitigen Verstärkung des Signals wurde ein HRP-gekoppelter Sekundärantikörper in Milchpulverlösung auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 min. Zum Entfernen von unspezifisch gebundenem Sekundärantikörpern wurde dreimal für je 5 min in 1 x PBS gewaschen.

Die Detektion des Chemielumineszenzsignals erfolgte mit dem „Western Blotting Luminol Reagent“ der Firma Santa Cruz Biotechnology nach Herstellerangaben.

Zum Entfernen von Antikörper um die selbe Membran mit verschiedenen Antikörpern analysieren zu können, wurde die Membran zweimal für je 30 min in ausreichend „Glycin-Stripping-Puffer“ inkubiert und anschließend dreimal 15 min in ausreichend 1 x PBS gewaschen.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von direkt mit Kupfer assoziierten Proteinen in *P. anserina*

Um eine detaillierte Untersuchung des Kupfermetabolismus und dessen Veränderungen und Einfluss auf die Lebensspanne von *P. anserina* durchführen zu können, müssen im ersten Schritt möglichst alle Komponenten dieses Stoffwechselweges identifiziert werden. Um dies zu erreichen, wurden *in silico* mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) die Genomsequenz und die Datenbank der computerbasiert vorhergesagten Gene von *P. anserina* durchsucht (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>). Grundlage dieser Suche waren die Sequenzen von Proteinen, die in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* direkt mit dem Kupferstoffwechsel assoziiert sind; die Sequenzdaten dieser Proteine wurden aus öffentlich zugänglichen Datenbanken bezogen (v.a. <http://www.yeastgenome.org/>).

Die Ergebnisse dieser Suche sind in Tabelle 4 dargestellt. Grundsätzlich zeigt sich, dass alle Komponenten der Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase – Transporter, Chaperone für die Verteilung von Cu, Speicherproteine und Cu-regulierte Transkriptionsfaktoren - die in anderen Organismen (v.a. *S. cerevisiae*) identifiziert werden konnten, Homologe bzw. Orthologe (GRISEA) in *P. anserina* besitzen. Auffällig sind zwei Ausnahmen: zum einen besitzt *P. anserina* offensichtlich nur je einen Hoch- und einen Niedrig-Affinitätstransporter in der Plasmamembran (PaCTR3 und PaSMF1), im Gegensatz zur Bäckerhefe, die jeweils zwei Transporter beider Affinitäten (CTR1 und CTR3 bzw. SMF1 und FET4) besitzt. Zum anderen besitzt *P. anserina* nur ein SCO-Protein (PaSCO1) wohingegen *S. cerevisiae* und auch *H. sapiens* jeweils zwei sehr ähnliche SCO-Proteine (SCO1 und SCO2) haben. In keinem der beiden Organismen sind für beide SCO-Proteine die genauen Funktionen abschließend geklärt (siehe Einleitung). Jedoch scheinen sie auch über die Beladung der COX mit Kupfer hinaus gehende Funktionen (Leary *et al.* 2004; Horng *et al.* 2005; Khalimonchuk *et al.* 2007; Leary *et al.* 2007) auszuüben. Auf die Konsequenzen, die das Fehlen eines zweiten SCO-Proteins für *P. anserina* zu haben scheint, wird später in dieser Arbeit im Zuge der ausführlichen Charakterisierung von PaSCO1 eingegangen.

Ergebnisse

Tabelle 4: Ergebnisse der *in silico* Suche nach Homologen von Kupfer-assoziierten Proteinen aus *S. cerevisiae* in der Genomsequenz und Datenbank der annotierten Protein von *P. anserina*. Dargestellt sind der Name des Proteins, der P-Wert, der als Maß für die Homologie gilt, das Protein, zu dessen Sequenz der P-Wert ermittelt wurde und dessen Funktion (soweit bekannt). Für bereits publizierte Proteine aus *P. anserina* (grau unterlegt) ist die „Accession-Nr.“ angegeben, für neu identifizierte Protein die Nummer, die diesem Protein in der Datenbank der annotierten Proteine zugewiesen (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) ist. Ist der Nachweis der Expression des zugehörigen Gens in dieser Arbeit erfolgt, so ist der Eintrag blau hinterlegt, steht der Nachweis noch aus, dunkelgrau. Die drei Proteine (SCO2, CTR1 und FET4 aus *S. cerevisiae*) für die keine Homologen gefunden werden konnten, sind rot dargestellt.

Protein	P-Wert	Protein / Organismus	Nr. in Sequenz-annotierung / Accession Nr.	Funktion	Referenz	Expression des Gens
Assemblierung der COX						
COX11*	1 e-48 2 e-45	COX11 / <i>S. cerevisiae</i> COX11 / <i>H. sapiens</i>	Pa_3_6850*	Cu-Transfer zu COXI	Tzagoloff <i>et al.</i> 1990 Petruzzella <i>et al.</i> 1998	Northern Blot + RT-PCR
COX17			AJ578463	Cu-Transfer an SCO1 und COX11	Stumpferl <i>et al.</i> 2004	
COX19	2 e-17 8 e-08	COX19 / <i>S. cerevisiae</i> COX19 / <i>H. sapiens</i>	Pa_1_12660	genaue Funktion unbekannt essentiell für Assemblierung der COX, Ähnlichkeiten mit COX17	Nobrega <i>et al.</i> 2002 Sacconi <i>et al.</i> 2005	nur RT-PCR
COX23	5 e-08	COX23 / <i>S. cerevisiae</i>	Pa_5_4410	noch unbekannt, upstream von COX17	Barros <i>et al.</i> 2004	Northern Blot + RT-PCR
SCO1	7 e-65	SCO1 / <i>S. cerevisiae</i>	Pa_1_12920	Cu-Transfer zu COXII	Schulze und Rödel 1989	Northern Blot + RT-PCR
	2 e-57	SCO2 / <i>S. cerevisiae</i>			Smits <i>et al.</i> 1994	
	1 e-38	SCO1 / <i>H. sapiens</i>			Petruzzella <i>et al.</i> 1998	
	3 e-34	SCO2 / <i>H. sapiens</i>			Papadopoulou <i>et al.</i> 1995	
SCO2	KEIN HOMOLOG			beteiligt an Assemblierung der COX, genaue Funktion unbekannt; bindet Kupfer	Smits <i>et al.</i> 1994 Papadopoulou <i>et al.</i> 1999	
Cu-Chaperone						
CCS1	9 e-35 5 e-23	CCS1 / <i>S. cerevisiae</i> CCS1 / <i>H. sapiens</i>	Pa_7_11310**	Cu-Transfer zur Cu/Zn-SOD	Horecka <i>et al.</i> 1995 Culotta <i>et al.</i> 1997	Northern Blot + RT-PCR Promoter-Reporter Konstrukt pPrCcs1-eGFP
ATX1	4 e-08 9 e-05	ATX1 / <i>S. cerevisiae</i> ATOX1 / <i>H. sapiens</i>	Pa_3_5920	Cu-Transfer zu Ccc2	Lin und Culotta 1995 Klomp <i>et al.</i> 1997	Northern Blot + RT-PCR
Transporter						
CCC2	1,5 e-181	ATP7B (WNDP) / <i>H. sapiens</i>	Pa_1_4000	Cu-Transport vom Cytosol in den Golgi-Apparat	Petrukhin <i>et al.</i> 1994	Promoter-Reporter Konstrukt pPrCcc2-eGFP
	8,3 e-158	ATP7A (MNK) / <i>H. sapiens</i>			Vulpe <i>et al.</i> 1993	
	4 e-168	CCC2 / <i>S. cerevisiae</i>			Fu <i>et al.</i> 1995	
	1 e-168	RAN1 / <i>A. thaliana</i>			Hirayama <i>et al.</i> 1999	
CTR1	KEIN HOMOLOG			Hochaffinitäts-Cu-Transporter in der Plasmamembran	Dancis <i>et al.</i> 1994	
CTR2			AJ298106	Hochaffinitäts-Cu-Transporter in der Vakuolenmembran	Borghouts <i>et al.</i> 2002	
CTR3			AJ303117	Hochaffinitäts-Cu-Transporter in der Plasmamembran	Borghouts <i>et al.</i> 2002	
SMF1	2 e-104	SMF1 / <i>S. cerevisiae</i>	Pa_4_8650***	Niederaffinitäts-Transporter zweiwertiger Metalle in der Plasmamembran	Supek <i>et al.</i> 1996 Cohen <i>et al.</i> 2000	ausstehend
FET4	KEIN HOMOLOG			Niederaffinitäts-Cu-Transporter in der Plasmamembran	Dix <i>et al.</i> 1994	
PCA1	3 e-236	PCA1 / <i>S. cerevisiae</i>	Pa_7_4720	P-Typ ATPase in Plasmamembran, transportiert Cd, Cu und Ag	Rad <i>et al.</i> 1994 Adle <i>et al.</i> 2007	ausstehend
Metallothioneine						
PaMT1			AJ005121	Cu-Bindung und -Pufferung im Cytoplasma	Averbeck <i>et al.</i> 2001	
Transkriptionsfaktoren						
ACE1	9 e-12 3 e-10	ACE1 / <i>S. cerevisiae</i> HAA1 / <i>S. cerevisiae</i>	Pa_4_9520	durch Kupfer aktiviert homolog zu ACE1, aber nicht Cu-reguliert	Thiele 1988 Keller <i>et al.</i> 2001	ausstehend
GRISEA	ORTHOLOG		X89429	durch Kupfer reprimiert	Osliewacz und Nuber 1996	

<i>P. anserina</i> Daten publiziert
Expression in dieser Arbeit nachgewiesen
KEIN HOMOLOG in der Genomsequenz vorhanden
Nachweis der Expression steht noch aus

* Computer-annotiertes Protein 90 AS länger am N-terminus als manuell abgeleitetes Protein

** Computer-annotiertes Protein 71 AS länger am N-terminus als manuell abgeleitetes Protein

*** Computer-annotiertem Protein fehlt ein 38 AS Fragment in der N-terminalen Hälfte im Vergleich zum manuell abgeleiteten Protein

Sequenz des 5' Bereichs des Gens durch RACE ermittelt

Ergebnisse

Um die Ergebnisse der *in silico* Analyse zu bestätigen, wurde für ausgewählte Beispiele der neu identifizierten vorhergesagten Gene in *P. anserina* deren Expression experimentell verifiziert. Für das Cu-Chaperon PaCCS1, das stark homolog zu dem Protein CCS1 aus *S. cerevisiae* ist, welches Kupfer zur Cu/Zn-SOD bringt, und das Cu-Chaperon PaATX1, anhand der computerbasierten Vorhersage Kupfer-Lieferant für PaCCC2 in der Membran des Post-Golgi-Apparates, konnte sowohl durch Northern Blot Analysen als auch durch semiquantitative RT-PCR eine Expression der entsprechenden Gene im Wildtyp *s* und in den beiden Kupferstoffwechselmutanten *grisea* und Δ PaCox17 nachgewiesen werden (Abb. 3). Die Menge an mRNA von *PaCox19*, dem Homolog von *Cox19* in Hefe, war offensichtlich in allen drei untersuchten Stämmen (*s*, *grisea*, Δ PaCox17) derart gering, dass sie nur mittels der sensiblen semiquantitativen RT-PCR detektiert werden konnte (Abb. 3).

COX19 ist ein Kupfer-bindendes Protein, das große Ähnlichkeiten mit COX17 aufweist und wie dieses auch an der Assemblierung der COX beteiligt zu sein scheint, ohne die genaue Funktion des Proteins zu kennen (Nobrega *et al.* 2002; Rigby *et al.* 2007).

Da es sich – auch in Hefe – bei den Faktoren, die für die Kupferversorgung der COX von Bedeutung zu sein scheinen, um Proteine handelt, die nur in sehr geringen Mengen in der Zelle vorliegen (sog. „low-abundance proteins“ – engl. „Protein geringer Häufigkeit/Vorkommens“), ist dieser Befund nicht überraschend.

Auch wenn es sich bei den in Abb. 3 dargestellten Transkriptanalysen um initiale Untersuchungen handelt, so scheint es doch in den beiden untersuchten Kupferstoffwechselmutanten *grisea* und Δ PaCox17 zu Veränderungen im Transkriptspiegel aller drei Gene im Vergleich zum Wildtyp *s* zu kommen. Dies kann als weiteres Indiz dafür angesehen werden, dass die *in silico*-Vorhersagen einer Beteiligung dieser Gene an der molekularen Kupferhomöostase zutreffend sind. Weitere Experimente können die genaue Rolle jedes dieser Gene weiter ausarbeiten.

Ergebnisse

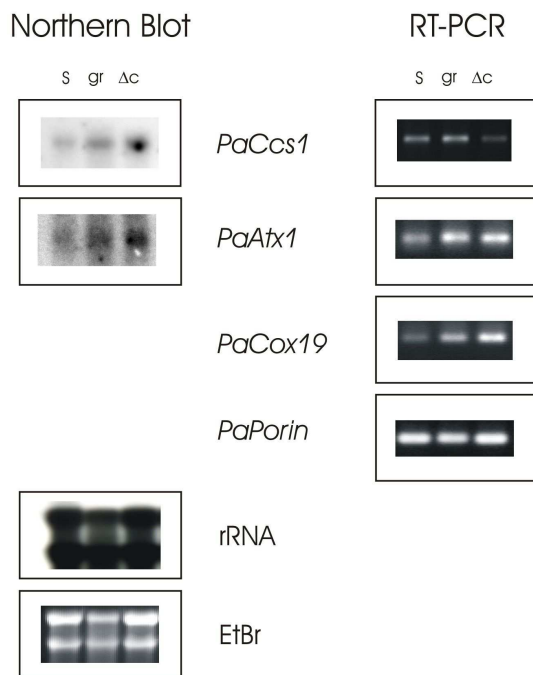


Abb. 3: Expressions-Analyse von *PaCcs1*, *PaAtx1* und *PaCox19*. Für *PaCcs1* und *PaAtx1* konnte mRNA sowohl in der Northern Blot Analyse (links) als auch in eine semiquantitativen RT-PCR (rechts), für *PaCox19* nur in der sensitiveren semiquantitativen RT-PCR (rechts) nachgewiesen werden. Die folgenden Stämme wurden in die Untersuchung einbezogen: Wildstamm s (s), grisea (gr) und Δ PaCox17 (Δ c). Als Kontrollexperimente sind dargestellt: links: Hybridisierung der Northern Blot Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen ribosomale RNA (rRNA) und Ethidiumbromid gefärbte Gesamt-RNA (EtBr) zum Nachweis von gleichmäßiger Beladung bzw. der Qualität der aufgetrennten Gesamt-RNA; rechts: Amplifikation von *PaPorin* mittels semiquantitativer RT-PCR zum Nachweis gleicher eingesetzter Mengen.

Für die putative Cu-transportierende ATPase vom P-Typ PaCCC2 wurde der Nachweis der Expression des entsprechenden Genes dadurch erbracht, dass durch die Verwendung eines $\sim 1,7$ kb großen Fragments des putativen Promotors von *PaCcc2* die Expression des für das grün fluoreszierende Protein codierenden *eGfp*-Leserahmens („enhanced Green Fluorescence Protein“ – engl. „verbessertes Grün Fluoreszierendes Protein“) im Wildstamm s erreicht werden konnte. Hierzu wurde ein 1737 bp großes DNA-Fragment, das im Genom von *P. anserina* direkt 5' an das putative Startcodon ATG des *PaCcc2*-Leserahmens angrenzt, via PCR amplifiziert und über die in der gleichen Reaktion eingeführten Schnittstellen für *SaI* und *EcoRI* in den Vector pSM1 (Pöggeler *et al.* 2003) kloniert. Mit dem daraus resultierenden Plasmid (pPrCcc2-eGFP – Abb. 4A) wurden Protoplasten des Wildtyps s transformiert. Mikroskopische Präparate von Hygromycin-resistenten Transformanten zeigten unter dem Fluoreszenzmikroskop bei Verwendung der entsprechenden Filter eine gleichmäßige grüne Fluoreszenz, deutliches Zeichen von eGFP im Cytoplasma der Transformanten. (Abb. 4C) Da der untransformierte Wildtyps s nur eine sehr schwache, gelbe Eigenfluoreszenz zeigt (Ergebnisse nicht dargestellt), ist die grüne Färbung ein guter Hinweis darauf, dass es sich bei dem verwendeten genomischen DNA-Fragment tatsächlich um eine Promotorstruktur und somit bei dem vorhergesagten *PaCcc2*-Leserahmen um ein in *P. anserina* exprimiertes Gen handelt.

Ergebnisse

Aussagen über die Kupferregulierbarkeit lassen sich anhand der bislang durchgeführten Experimente noch nicht treffen.

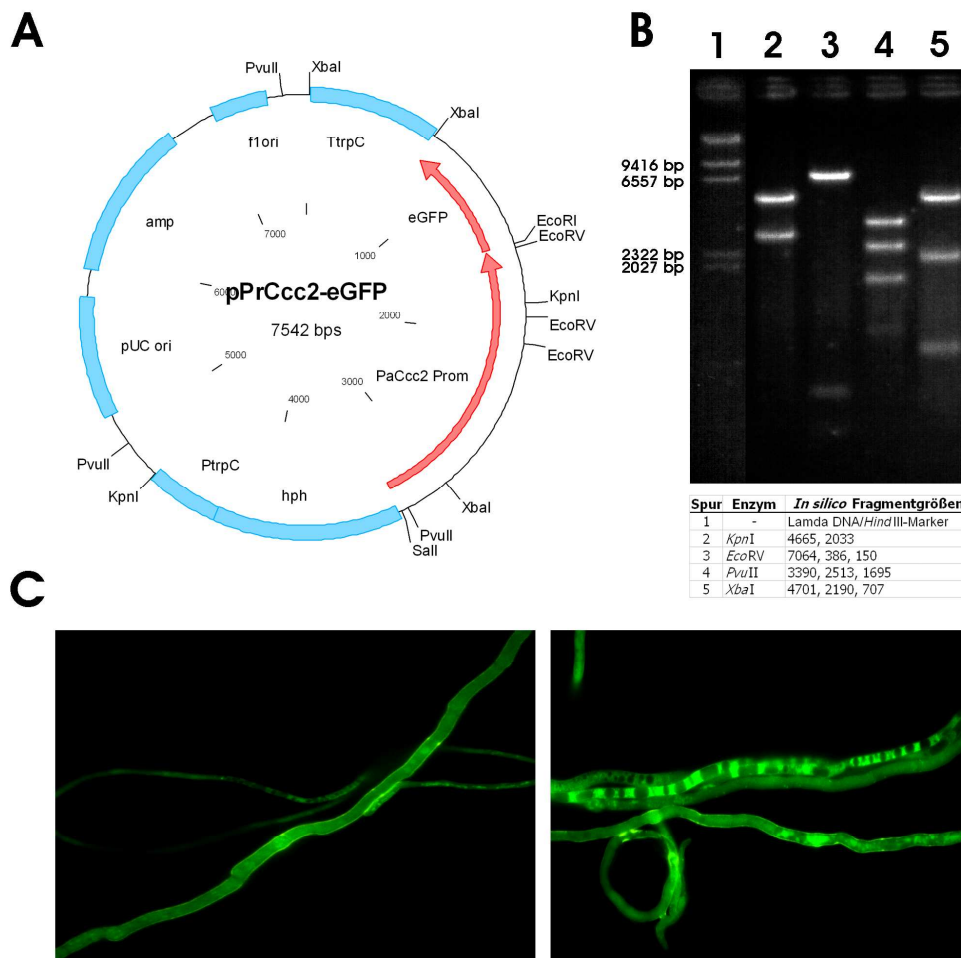


Abb. 4: Der Promotor des putativen Gens *PaCcc2* ermöglicht die Expression von *eGfp*. **A**) Plasmid pPrCcc2-eGFP, das für die Transformation des Wildtyps *s* eingesetzt wurde. Das Plasmid, dessen Ausgangsplasmid pSM1 (Pöggeler *et al.* 2003) ist, enthält den putativen Promotor von *PaCcc2* (*PaCcc2*-Prom – rot), der die Expression des *eGfp*-Leserahmens (*eGfp*-ORF - rot) ermöglicht. Weitere Bestandteile des Plasmids sind jeweils blau dargestellt: *TtrpC*, *PptrC* – Transkriptionsterminator bzw. –promotor des *TrpC*-Gens aus *A. nidulans*; *hph* – Hygromycin-Resistenz; *amp* – Ampicillin-Resistenz; *pUCori*, *f1ori* – bakterielle Replikationsursprünge **B**) eine Testrestriktion verifizierte pPrCcc2-eGFP: Es wurden die Enzyme *KpnI*, *EcoRV*, *PvuII* und *XbaI* verwendet und die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt. Unter dem Bild des EtBr-gefärbten Gels sind die *in silico* errechneten Fragmentgrößen angegeben **C**) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit dem Plasmid aus A) transformierten Wildstamm *s*.

Um zu zeigen, dass der für *PaCcc2* verwendete Test mit einem Reporter-eGFP-Konstrukt geeignet ist, die Expression eines vorhergesagten Gens nachzuweisen, wurde auch für das neu entdeckte Gen *PaCcs1* ein gleichartiges Reporter-Plasmid konstruiert. Für das putative *PaCcs1* konnte die Expression bereits mittels Northern Blot Analyse und semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (siehe Abb.3). Ein

Ergebnisse

1765 bp großes Fragment, das unmittelbar 5' des vorhergesagten Startcodons ATG von *PaCcs1* liegt, wurde mittels PCR aus genomischer DNA amplifiziert. Auch hier wurden für die Klonierung die *SacI*- und *EcoRI*-Schnittstellen aus pSM1 genutzt, die über die verwendeten Oligonukleotide an das Promotor-Fragment angehängt wurden. Durch Ligation des PCR-Fragments und des geschnittenen Plasmids pSM1 entstand pPrCcs1-eGFP (Abb. 5A). Wie in Abbildung 5C zu sehen ist, führt auch hier die Transformation des Wildstamms s mit dem neuen Plasmid zu einer homogenen Grün-Färbung der Hyphen.

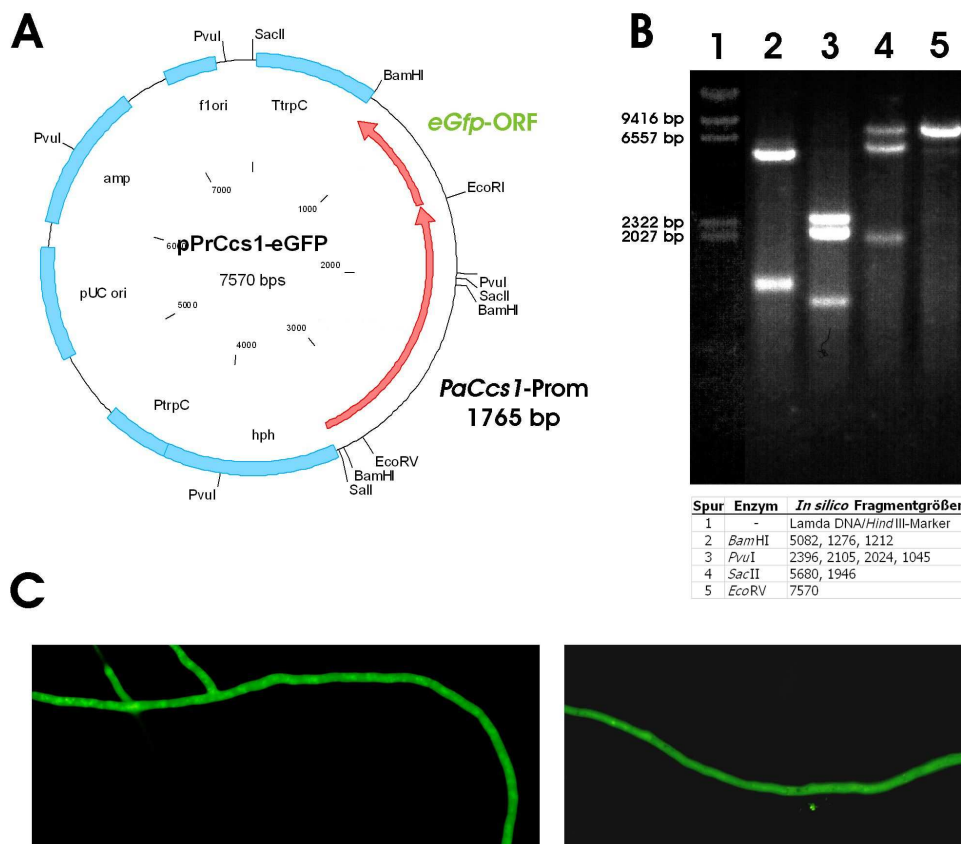


Abb. 5: Der Promotor des putativen Gens *PaCcs1* ermöglicht die Expression von *eGfp*. **A**) Plasmid pPrCcs1-eGFP, das für die Transformation des Wildtyps s eingesetzt wurde. Das Plasmid, dessen Ausgangsplasmid pSM1 (Pöggeler *et al.* 2003) ist, enthält den putativen Promotor von *PaCcs1* (*PaCcs1*-Prom – rot), der die Expression des *eGfp*-Leserahmens (*eGfp*-ORF - rot) ermöglicht. Weitere Bestandteile des Plasmids sind jeweils blau dargestellt: *TtrpC*, *PtrpC* – Transkriptionsterminator bzw. –promotor des *TrpC*-Gens aus *A. nidulans*; *hph* – Hygromycin-Resistenz; *amp* – Ampicillin-Resistenz; *pUCori*, *f1ori* – bakterielle Replikationsursprünge **B**) eine Testrestriktion verifizierte pPrCcs2-eGFP: Es wurden die Enzyme *Bam*HI, *Pvu*I, *Sac*II und *Eco*RV verwendet und die Fragmente über ein Agarosegel aufgetrennt. Unter dem Bild des EtBr-gefärbten Gels sind die *in silico* errechneten Fragmentgrößen angegeben **C**) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit dem Plasmid aus A) transformierten Wildstamm s

Ergebnisse

Somit konnte gezeigt werden, dass sich offensichtlich die verwendeten Reporter-Konstrukte, in welchen putative Promotoren die Expression von *eGfp* ermöglichen, gut dafür eignen, *in silico* Daten über vorhergesagte Gene in *P. anserina* zu überprüfen. Der Vorteil der Verwendung von eGFP ist besonders darin zu sehen, dass die Auswertung keinerlei experimentelle Eingriffe wie z.B. die Isolierung von Nukleinsäuren oder Proteinen benötigt und sehr einfach unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgen kann. Diese Eigenschaft des eGFP wird auch später in dieser Arbeit nochmals von Bedeutung sein (s.u. - 3.4).

Für die putativen Kupferchaperone PaATX1, PaCCS1 und PaCOX19 und die putative Kupfer-transportierende ATPase PaCCC2 konnte somit nach der *in silico* Identifizierung die Expression der entsprechenden Gene im Wildstamm s belegt werden. Für die vorhergesagten Protein PaSMF1 (put. Nieder-Affinitätstransporter), PaPCA1 (put. Kupfer-transportierende ATPase in der Plasmamembran) und PaACE1 (put. Kupfer-aktivierter Transkriptionsfaktor) steht dieser Nachweis noch aus.

3.2 Identifizierung und initiale Charakterisierung der Kupfer-Chaperone für die Cytochrom c Oxidase

Besonderes Augenmerk bei der Analyse der Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase lag auf dem Transportweg, auf dem Kupfer zur Cytochrom c Oxidase in den Mitochondrien gelangt. Der Einfluss und die Bedeutung der Mitochondrien und besonders der mitochondrialen Atmung für die Physiologie und die Lebensspanne von *P. anserina* konnte mehrfach demonstriert werden (Dufour *et al.* 2000; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A; Borghouts *et al.* 2002 B; Stumpferl *et al.* 2004; Sellem *et al.* 2006; Scheckhuber *et al.* 2007; zusammengefasst in Osiewacz 2002; Osiewacz und Scheckhuber 2006). In *S. cerevisiae* sind mind. vier Kupfer-Chaperone in die Kupferversorgung der COX involviert, wobei sich in den letzten Jahren immer wieder große Veränderungen im Arbeitsmodell dieses Reaktionswegs ergeben haben, so dass offensichtlich erst die Ansätze des genauen Transportwegs verstanden sind. Nach momentanem Stand sieht die Abfolge des Kupfertransports zur COX wie folgt aus: COX23 leitet Kupfer an COX17 (Barros *et al.* 2004), welches Kupfer weitergibt an SCO1 und COX11 (Hornig

Ergebnisse

et al. 2004). SCO1 liefert die beiden Kupferatome für die „Cu_A-Site“ in der COX-Untereinheit COX2 (Krummeck und Rödel 1990; Lode *et al.* 2000), wohingegen COX11 das Kupferatom für die „Cu_B-Site“ in der COX-Untereinheit COX1 bereitstellt (Tzagoloff *et al.* 1990; Hiser *et al.* 2000; Carr *et al.* 2002; Banci *et al.* 2004). In *P. anserina* konnte bereits erfolgreich *PaCox17* deletiert werden, was den totalen Verlust der COX-Atmung und eine drastische Verlängerung der Lebensspanne zur Folge hat (Stumpferl *et al.* 2004). Im Zuge der Arbeiten von Stefan Stumpferl konnte auch *PaSco1* identifiziert werden (S. Stumpferl 2005). In der vorliegenden Arbeit konnten auch für die beiden anderen bekannten Proteine Homologe im Genom von *P. anserina* – PaCOX11 und PaCOX23 - gefunden werden.

Identifizierung von PaCOX23

In der Bäckerhefe wurde COX23 erst kürzlich als möglicher Kupferdonor für COX17 identifiziert, ohne dass bislang dem Protein eine genaue Funktion zugewiesen werden konnte (Barros *et al.* 2004). Es scheint zumindest in der Funktionskette der Kupferlieferung zur COX COX17 vorgeschaltet zu sein (Barros *et al.* 2004). Das Hefeprotein besitzt im Vergleich zu vorhergesagten Homologen aus anderen Organismen (wie z.B. *N. crassa*, *D. melanogaster* oder *H. sapiens*) am N-Terminus 75 AS, die in keinem anderen Protein zu finden sind. Die Funktion dieser Extra-Aminosäuren ist nicht bekannt, aber für die Funktion des Proteins nicht notwendig (Barros *et al.* 2004). Aus diesem Grund wurde für die Suche mittels BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) im Genom von *P. anserina* die Proteinsequenz von AS 76 bis AS 151 (insgesamt 76 AS) verwendet. Es konnte ein Protein gefunden werden, das signifikante Homologie zum Hefe-Protein aufweist (P-Wert: 5 e-08). Es ist 81 Aminosäuren lang und besitzt ein berechnetes Molekulargewicht von 9,3 kDa. Das dafür kodierende Gen *PaCox23* enthält drei Introns an den Positionen +66 (Länge 57 bp), +231 (Länge 84 bp) und +343 (Länge 62 bp) – jeweils relativ zum Startcodon ATG in der genomischen Sequenz. Im Protein PaCOX23 lässt sich das Motiv, das wahrscheinlich für den Import des Proteins in den Intermembranraum essentiell ist („doppeltes CX₉C-Motiv“ - Chacinska *et al.* 2004; Herrmann und Hell 2005; Terziyska *et al.* 2005) an konservierter Stelle erkennen (Abb. 6)

Ergebnisse

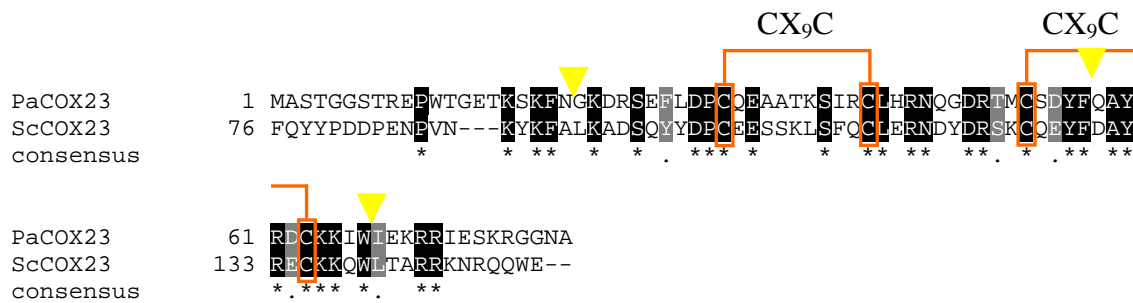


Abb. 6: Sequenzvergleich zwischen dem vorhergesagten PaCOX23 und COX23 aus *S. cerevisiae* (ScCOX23). Die ersten 75 AS des Hefe-Proteins wurden nicht in der Vergleich mit einbezogen. Der Vergleich wurde mit dem Programm „ClustalW“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), die Farbgebung mit „Boxshade“ (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) durchgeführt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz und mit Stern unterhalb der Sequenz, ähnliche Aminosäuren grau und mit einem Punkt markiert. Die Positionen, an welchen sich in der genomischen Sequenz ein Intron befindet, sind mit einem gelben Dreieck gekennzeichnet. Das für den Import in den Intermembranraum verantwortliche „doppelte CX₉C-Motiv“ ist durch orange Rechtecke gekennzeichnet (Chacinska *et al.* 2004; Herrmann und Hell 2005; Terziyska *et al.* 2005).

Der Nachweis der Transkription und der Vergleich der mRNA-Mengen im Wildtyp und verschiedenen Kupfer-Mutanten von *P. anserina* (s.u. – Abb. 10) konnten die *in silico* Daten validieren, dass es sich bei dem vorhergesagten ORF um ein tatsächlich exprimiertes Gen handelt.

In der genomischen Cosmidbank (Osiewacz 1994) konnte *PaCox23* auf den beiden Cosmiden 29D8 und 29G11 identifiziert werden. Durch Verdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen und anschließender Southern Blot Analyse konnte die Gesamtgröße der genomischen Fragmente in diesen beiden Cosmiden und auch die Größe der den *PaCox23*-Leserahmen flankierenden Bereiche bestimmt werden. Für sich anschließende Versuche der Gendeletion sind diese Informationen von großer Bedeutung. Die Größe der 3' Flanke betrug für das Cosmid 29D8 ~13 kb und für die 5' Flanke ~19 kb (Gesamtgröße des genomischen Fragments ~32 kb). Das Cosmid 29G11 beinhaltet ~35 kb der 3' liegenden Sequenz und ~3 kb der 5' von *PaCox23* liegenden Sequenz (Gesamtgröße des genomischen Fragments ~38 kb).

Identifizierung von PaSCO1

Bereits in Arbeiten von S. Stumpferl wurde das Genom von *P. anserina* nach Homologen des Hefe-Proteins SCO1 durchsucht. Zu diesem Zeitpunkt stand die Genomsequenz von *P. anserina* jedoch noch nicht zur Verfügung.

Ergebnisse

Im Gegensatz zur Identifizierung von PaCOX17 war es nicht möglich, PaSCO1 durch Komplementation einer entsprechenden Hefe-Deletionsmutante durch eine *P. anserina* cDNA-Bank zu isolieren. Die Komplementationsversuche wurden in dieser Arbeit nochmals mit gleichem Ergebnis wiederholt (s.u. - Abb. 8).

Jedoch ist dies auch durch keines der beiden menschlichen SCO-Proteine möglich. Nur hybride Proteine aus N-terminalem Hefe SCO1 und C-terminalem menschlichem SCO1 – nicht aber SCO2 – vermögen den Atmungsdefekt von $\Delta sco1$ -Hefezellen zu revertieren (Paret *et al.* 1999). Gleiches gilt für das menschliche Homolog zu COX11, dem Protein, das Kupfer vermutlich ebenfalls von COX17 erhält (Horng *et al.* 2004) und in die andere kupferenthaltende Untereinheit, COX1, einbaut. Auch dieses kann das Hefe-Protein nicht funktionell ersetzen (Carr *et al.* 2005).

Zur erfolgreichen Identifizierung von *PaSco1* führte die heterologe Hybridisierung einer Cosmid Bank genomischer DNA von *P. anserina* mit einer Sonde, die aus genomischer DNA von *N. crassa* hergestellt wurde. Für *N. crassa* war zu diesem Zeitpunkt bereits die Genomsequenz verfügbar. Das für PaSCO1 kodierende Gen wurde auf dem Cosmid 36E11 lokalisiert (S. Stumpferl 2005). Die Größe der den *PaSco1*-Leserahmen flankierenden Bereiche konnte mit mind. 13.5 kb 5' und mind. 5 kb 3' bestimmt werden. Durch Southern Blot Analysen wurden hier bereits starke Hinweise dafür gesammelt, dass sich nur das Gen für ein SCO-Protein im Genom von *P. anserina* – nicht zwei wie in Hefe oder Mensch – befindet. In dieser Arbeit, für welche sowohl die Roh-Genomsequenz als auch die Datenbank der computergestützt annotierten Gene von *P. anserina* zur Verfügung standen, wurden diese Befunde bestätigt: Im Genom von *P. anserina* ist nur PaSCO1 kodiert, weitere SCO-Protein sind nicht zu finden. Ähnliches gilt für *N. crassa*; auch hier ist in der Genomdatenbank nur ein SCO-Protein zu finden.

PaSco1 besitzt zwei Introns an den Positionen +217 (Länge 59 bp) und +486 (Länge 60 bp) – jeweils relativ zum Startcodon ATG in der genomischen Sequenz - und kodiert für ein Protein von 285 AS Länge und einem berechneten Molekulargewicht von 32,4 kDa. PaSCO1 zeigt starke Homologie zu je beiden SCO-Proteinen aus Hefe und Mensch (P-Werte zwischen 3×10^{-34} und 7×10^{-65} – siehe Tabelle 4) und es lassen sich alle für SCO-Proteine von Hefe und Mensch beschriebenen wichtigen Bereiche durch entsprechende *in silico* Verfahren identifizieren: eine vorhergesagte

Ergebnisse

mitochondrial Lokalisierungssequenz (MTS – rot in Abb. 7), eine vorhergesagt Transmembrandomäne (TM – grün in Abb. 7 – Buchwald *et al.* 1991) und die für die Kupferbindung wichtigen Aminosäuren (blau in Abb. 7 – Rentzsch *et al.* 1999; Nittis *et al.* 2001; Horng *et al.* 2005)

		vorhergesagte MTS	
PaSCO1	1	--MSQPAMRATINVLPRRAATRQCLRSLSTASNMARRPTTSCLPKQPOTQTYQPLVQRRF	
ScSCO1	1	--MLKLSR----SANLRLVQLPAARLSGNGAKLLTQRGFFIVTRLWQSNKKPLSRVPEV	
ScSCO2	1	--MLNSSRKYACRSLFRQANVSIKGLFYNGG--AYRRGFSTGCCLRSNDKESPSARQPL	
HsSCO1	1	MAMLVLVPGRVMRPLGGQLWRFLPRGLEFWGPAECTARVLLRQFCARQAERWRAS-GRPG	
HsSCO2	1	MLLILTRSPATAWHRLSQLKPRVLP-----GTLGGQALHLRSWLLSRQGPAPTGGQQQP-	
consensus		
		vorhergesagte TM	
PaSCO1	58	K-----FKTVEEAKSRYSRSGPFS--WKAQGLFPLMTGAGILLYTE--KEKERM	
ScSCO1	54	G-----GTPIKDNGKVREGSIEFSTGKA-IALFLAVGGALSYFFNRKERRL	
ScSCO2	56	DRL-----QLGDEINEPEPIRTRFFQFSRWKATIALLLLSGCTYANLS-RKRRLL	
HsSCO1	60	YCLGTRPLSTARPPPPWSQKGPGDSTRPSSKPGPVSWKSIATTFAGGALLAGMKVVKKEK	
HsSCO2	53	-----QGPGLRTRLLITG-----LFGACLGGAWLA----LRAEK	
consensus		
PaSCO1	101	QRKRIAESTKGVGRPKVG--GPFSLIDQNGNTVTDEDLKGRYSLVYFGFTHCPDICPEELD	
ScSCO1	99	ETQKEAEANRGYCKPSLG--GPFHLEDMYCNEFTEKNLKGKFSIIYFGFSNCPDICPEELD	
ScSCO2	105	ETEKEADANRAYGSVALG--GPFNLIDFNGKPFTEENLKGKFSIIYFGFTHCPDICPEELD	
HsSCO1	120	AEKLEKERQRHIGKPLLG--GPFSLTHTTGERKTDKDYLCQWLLIYFGFTHCPDVCEPELE	
HsSCO2	83	ERLQQQRTEALRQAAVGQGFDEHLLDHRGRARCKADFRGQWVLMYFGFTHCPDICPEELE	
consensus	 * * * * * * * * * * * * * *	
PaSCO1	160	KMARMFDLVEEKRPGLVAPVFTCDPARDGPKELKEYLAEFHFKFTGLTGTVDQIKAMC	
ScSCO1	158	KLGLWLNTLSSKYGI-TLQPLFITCDPARDSPAFLKEYLSDFHPSITGLTGTDFEVKNAC	
ScSCO2	164	RLTYWISELDDKDHI-KIQPLFISCDPARDTPDVLKEYLSDFHPAITGLTGTVDQVKSVC	
HsSCO1	179	KMIQVVDEIDSITLPLDPLPLFISIDPERDIKEAIAANYVKEFSPKLVGLTGTREVDQVA	
HsSCO2	143	KLQVVVRQLEAEPGLPPVQPVFITVDPERDDVEAMARYVQDFHPRLLGLTGTSTKQVAQAS	
consensus	 * * * * * * * * * * * * *	
PaSCO1	219	KAYRVYFSTPNEVKPQDYLVDHISIFFYLMDEPGDFVEALGRQHSPDQAAKTIIVDHMKEW	
ScSCO1	217	KKYRVYFSTPPNVKPGQDYLVDHISIFFYLMDEPGQFVDALGRNYDEKTCVQKIIVEHVKSYSY	
ScSCO2	223	KKYKVFYFSTPRDVKPNQDYLVDHISIFFYLDPECFIDALGRNYDEQSCLEKIREQIQAY	
HsSCO1	239	RAYRVYYSPPGPKDE-DEYIVDHIIMMYLIGPDGEFLDYFCQNRKGEIAASIATHMRPY	
HsSCO2	203	HSYRVYYNAGPKDE-DQDYIVDHSIAIYLLNPDGLFTDYGRSRAEQISDSVRRHMAAF	
consensus		. * * * * * * * * * * *	
PaSCO1	279	KGPLKKA-----	
ScSCO1	277	VPAEQRAKQKEAWYSFLFK	
ScSCO2	283	VPKEERERRSCKWYSFIYN	
HsSCO1	298	RKKS-----	
HsSCO2	262	RSVLS-----	
consensus		

Abb. 7: Sequenzvergleich zwischen dem vorhergesagten PaSCO1 und SCO1 und SCO2 aus *S. cerevisiae* bzw. *H. sapiens* (ScSCO1 und ScSCO2 bzw. HsSCO1 und HsSCO2). Der Vergleich wurde mit dem Programm „ClustalW“ (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), die

Ergebnisse

Farbgebung mit „Boxshade“ (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) durchgeführt. Konservierte Aminosäuren sind schwarz und mit Stern unterhalb der Sequenz, ähnliche Aminosäuren in mindestens drei Sequenzen grau und mit einem Punkt markiert. Die Positionen, an welchen sich in der genomischen Sequenz die beiden Introns befinden, sind mit einem gelben Dreieck gekennzeichnet. Außerdem ist die vorhergesagte Position der MTS, sowie der Transmembran-Domäne angegeben (rot bzw. grün). Für die Kupferbindung wichtige Aminosäuren sind blau markiert.

Der Befund, dass PaSCO1 das Hefe-Homolog SCO1 nicht funktionell ersetzen und deswegen eine $\Delta sco1$ -Hefemutante nicht komplementieren kann, sollte nochmals überprüft werden. So sollte ermittelt werden, ob in der für die Komplementationsversuche eingesetzten cDNA-Bank *PaSco1* ggf. nicht vorhanden war oder ob es sich bei PaSCO1 und SCO1 aus Hefe zwar um Sequenzhomologe, nicht aber um Orthologe handelt. Dazu wurde die für PaSCO1 kodierende cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Klonierungsvektor „pMOS blue“ kloniert. Da die Insertion von PCR-Fragmenten in „pMOS blue“ stets ungerichtet erfolgt, wurden zwei Plasmide hergestellt: Eines, in dem der *PaSco1*-Leserahmen im Uhrzeigersinn - d.h. in gleicher Leserichtung wie das *LacZ*-Gen – liegt („pcPaSco1 im UZS“), und ein weiteres in umgekehrter Orientierung („pcPaSco1 ggn UZS“). Aus ersterem wurde der *PaSco1*-Leserahmen über die Schnittstellen für *Pst*I und *Sma*I herausgeschnitten und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen geöffneten Hefe-Expressionsvektor pAD4 ligiert, wodurch pAD4-PaSco1 entstand. Mit diesem Plasmid wurde ein Hefestamm transformiert, dessen *Sco1*-Gen deletiert wurde (W303- $\Delta SCO1$). Die Deletion führt zum Verlust der COX-Atmung, wodurch der Stamm seinen Energiebedarf nur durch Gärung decken kann. Auf Medium, das keine vergärbare C-Quelle enthält (Glycerin-haltiges YPG an Stelle von Dextrose-haltigem normalem YPAD), kann die $\Delta sco1$ -Hefemutante nicht wachsen. Wenn PaSCO1 SCO1 funktionell zu ersetzen vermag, so kann die entsprechende Transformante wieder auf nicht-vergärbarem Medium wachsen.

Ergebnisse

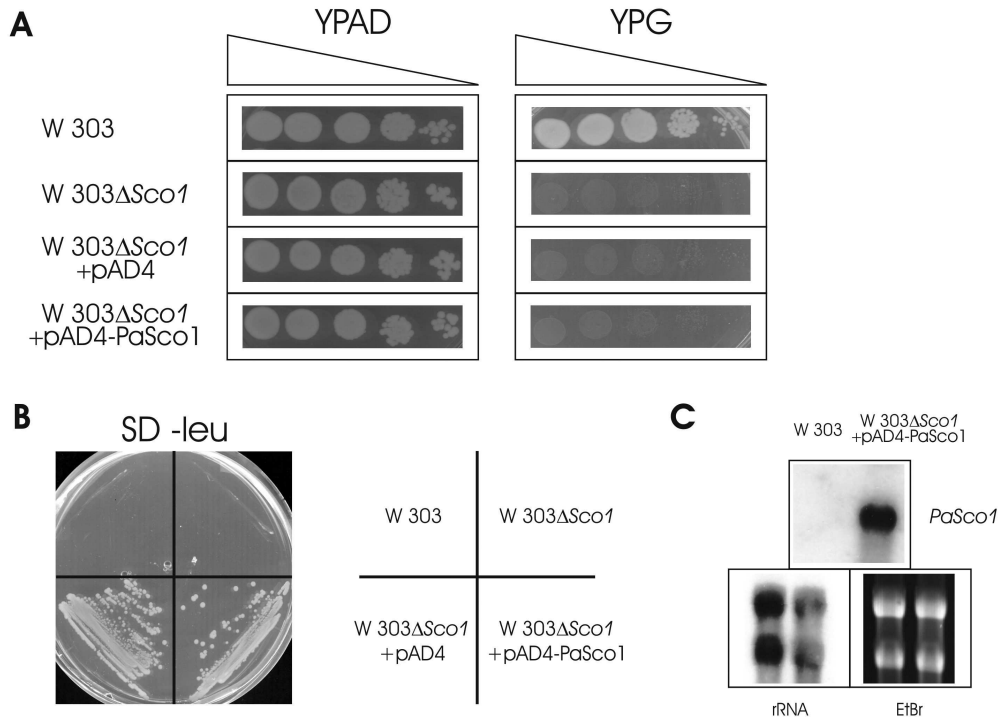


Abb. 8: Versuch der Komplementation einer $\Delta sco1$ -Hefemutante durch PaSCO1. Die Überexpression von *PaSco1* führt nicht zur Wiederherstellung der Atmungskompetenz. **A)** Die untersuchten Stämme wurden auf Atmung bzw. Gärung getestet: 1:10-Verdünnungen ($10^{-1} - 10^{-5}$) wurden auf Medium mit vergärbare C-Quelle (links - YPAD) und ohne vergärbare C-Quelle (rechts - YPG) aufgetropft und zwei Tage bei 30°C inkubiert. W 303: Wildtyp-Hefestamm, W 303Δ*Sco1*: $\Delta sco1$ -Deletionsstamm, W 303Δ*Sco1*-pAD4: $\Delta sco1$ -Deletionsstamm mit eintransformiertem leeren Expressionsplasmid pAD4, W 303Δ*Sco1*-pAD4-Pa*Sco1*: $\Delta sco1$ -Deletionsstamm mit eintransformiertem Expressionsplasmid pAD4-Pa*Sco1* das zu einer starken Überexpression von *PaSco1* führt. **B)** Kontrolle der erfolgreichen Transformation der beiden Plasmide pAD4 bzw. pAD4-Pa*Sco1*. Die untersuchten Stämme aus A) wurden auf synthetischem Medium ohne Leucin ausgestrichen. Der verwendete Wildstamm und die Deletionsmutante sind auxotroph für Leucin, das fehlende Strukturgen *leu2* ist auf pAD4 kodiert, wodurch die beiden Transformanten auch ohne Leucinsupplementation wachsen können. **C)** Northern Blot Analyse zum Nachweis der erfolgreichen Überexpression von *PaSco1* in Hefe. Vom Wildstamm W 303 (links) und der Transformante W 303Δ*Sco1*-pAD4-Pa*Sco1* (rechts) wurde Gesamt-RNA isoliert, aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv-markierten Sonde, die aus der *PaSco1*-cDNA hergestellt wurden (oben - *PaSco1*). Zur Kontrolle der Qualität der verwendeten RNA und gleicher aufgetragener Mengen wurde die gleiche Membran mit einer Sonde gegen die rRNA aus *Saccharomyces carlsbergensis* hybridisiert (unten links - rDNA). Weiterhin ist das Ethidiumbromid-gefärbte RNA-Gel dargestellt (unten rechts - EtBr).

Auch mit vollständiger und exakt klonierter cDNA von *PaSco1* ist es nicht möglich, in einer $\Delta sco1$ -Hefemutante den Atmungs-defizienten Phänotyp zu revertieren. Wie Abb. 8 zeigt, führt die Überexpression von *PaSco1* in der Hefe-Deletionsmutante nicht dazu, dass diese auf nicht-vergärbarem Medium wachsen kann, d.h. die Atmung kann nicht wiederhergestellt werden. Nur der Wildstamm kann auf Medium mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Abb. 8 A). Die durchgeführten Kontrollen belegen dieses Ergebnis. Nur die beiden mit dem leeren pAD4 bzw. dem

Ergebnisse

Überexpressionsplasmid pAD4-PaSco1 transformierten Hefestämme (W 303 Δ Sco1-pAD4 bzw. W 303 Δ Sco1-pAD4-PaSco1) können auf synthetischem Medium ohne Leucin (SD -Leu) wachsen (Abb. 8 B), nicht aber die Leucin-auxotrophen Wildtyp- und Δ sco1-Zellen (W 303 und W 303 Δ Sco1). Somit ist der Nachweis erbracht, dass die Transformation der *S. cerevisiae*-Kulturen erfolgreich war, denn auf den transformierten Plasmiden ist das dem Ausgangsstamm W 303 fehlende Strukturgen *leu2* kodiert und nur dieses kann die Leucin-Auxotrophie zurück in eine Leucin-Prototrophie wandeln. Dass die Transformation von pAD4-PaSco1 auch tatsächlich zur starken Überexpression von *PaSco1* führt, konnte in einer Northern Blot Analyse belegt werden (Abb. 8 C). Das Ausbleiben eines Signals im untransformierten Wildstamm zeigt, dass das starke Signal in der Transformante nicht durch fälschliche Hybridisierung der *PaSco1*-Sonde mit der mRNA des Hefe-Gens stammt. Aufgrund der deutlichen Sequenzähnlichkeiten der beiden Gene wäre eine heterologe Hybridisierung mit der mRNA des Hefe-Gens nicht auszuschließen, dass in der Wildtyp-Spur gar kein Signal zu sehen ist, mag auch in der geringen Transkriptionsrate des endogenen *Sco1* in *S. cerevisiae* bedingt sein.

Auch wenn der Nachweis der funktionellen Komplementation ausblieb, so liefern die *in silico*-Daten starke Hinweise darauf, dass es sich bei dem hier beschriebenen Gen *PaSco1* um das Homolog zu den in Hefe und Mensch beschriebenen Genen handelt. Initiale Transkriptanalysen sollten diesen Befund weiter bestärken (s.u. - Abb. 10)

Identifizierung von PaCOX11

Während SCO1 offenbar Kupfer von COX17 empfängt, um es in die Untereinheit COXII einzubauen, so liefert COX11 der momentanen Vorstellung nach das Kupfer, das es von COX17 erhält, zur Untereinheit COXI. Die Identifizierung von PaCOX11 war leider nicht durch reine *in silico*-Analysen möglich. Zwar konnte ein großer Bereich, der in allen bislang bekannten Homologen unterschiedlicher Spezies C-terminal der Transmembrandomäne liegt, mit sehr großer Ähnlichkeit gefunden werden, jedoch waren anhand der genomischen Sequenz keine definitiven Aussagen über den N-terminus (ca. AS 1-90) und das genaue C-terminale Ende dieser putativen Aminosäuresequenz möglich. Es konnte abgeleitet werden, dass 5' des Bereichs, der hohe Ähnlichkeiten aufweist, ein Intron in der genomischen Sequenz

Ergebnisse

lokalisiert ist. Für das sich 5' anschließende Exon und das ATG-Startcodon waren mehrere Varianten denkbar. Mittels eines „5' RACE“-Experiments („Rapid Amplification of cDNA Ends“ – engl. „schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden“) konnte dieses Exon und somit auch der Translationsstart mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit gefunden werden. Das nun – zumindest am N-terminus – vollständige Protein wurde *in silico* zu einem Ähnlichkeitsvergleichen mit den Homologen aus Hefe und Mensch unterzogen, zum anderen auf vorhersagbare mitochondriale Lokalisierungs-sequenz (MTS – „mitochondrial targeting sequence“) und Transmembrandomänen (TM) hin untersucht. Die Ergebnisse (Abb. 9) zeigen, dass das hier gefundene Gen *PaCox11* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit das Homolog zu *Cox11* in *S. cerevisiae* ist und somit vermutlich im Kupfertransportweg hin zur COX beteiligt ist. Das Protein PaCOX11 zeigt eine klar definierbare MTS und eine TM. Auch sind alle in anderen Spezies bislang als essentiell für die Kupferbindung (blau in Abb. 9 - Carr *et al.* 2002) und zwei erst kürzlich als strukturell essentiell (orange in Abb. 9 - Banting und Glerum 2006) gefundenen Aminosäuren auch in PaCOX11 konserviert.

Der C-Terminus von PaCOX11 bzw. das 3' Ende des entsprechenden Gens *PaCox11* konnte anhand der *in silico*-Daten nicht mit ausreichender Sicherheit festgelegt werden. Die in Abb. 9 angeführte Sequenz stellt eine Möglichkeit dar, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich an der mit einem gelb-schraffierten Dreieck markierten Stelle ein weiteres Intron befindet, wodurch sich die weitere Sequenz verändert. Weitere Experimente sind nötig (z.B. 3'-RACE), um diese Frage abschließend zu klären. In der Datenbank der computergestützt annotierten, im Genom von *P. anserina* kodierten Proteine wurde das Protein mit der Nummer Pa_3_6850 als Homolog zu COX11 aus Hefe gefunden. Dieses besitzt den hier in Abb. 9 dargestellten C-Terminus. Es ist jedoch anzumerken, dass in diesem Protein ein weiter 5' stromaufwärts liegendes Startcodon ATG benutzt wird, wodurch sich der N-terminale Teil um 90 AS verlängert. Der Vergleich mit anderen vorhergesagten COX11-Proteinen anderer Spezies und die in der manuell abgeleiteten Sequenz eindeutig vorhandenen MTS sprechen eindeutig für die hier dargestellte Sequenz.

Ergebnisse

Mitochondrien, im Gegensatz zum hier manuell annotierten PaCOX11 mit einer Wahrscheinlichkeit von ~99% und klar definierbarer MTS inkl. vorhergesagter Schnittstelle, an der die MTS nach erfolgreichem Import abgetrennt wird.

Der Nachweis, dass das vorhergesagte Gen *PaCox11* tatsächlich exprimiert wird, konnte in der initialen Transkriptanalyse aller an der Kupferbeladung der COX beteiligten Gene erbracht werden (s.u. – Abb. 10).

In der genomischen Cosmidbank von *P. anserina* (Osiewacz 1994) konnte der *PaCox11*-Leserahmen auf dem Cosmid 17F3 identifiziert werden. Weitere Analysen dieses Cosmids stehen noch aus.

Initiale Analyse der Expression von *PaCox23*, *PaCox17*, *PaSco1* und *PaCox11*

Für alle vier anhand von Homologievergleichen identifizierten Gene, welche für Proteine codieren, die entsprechend der *in silico* Analysen an der Versorgung der COX in der inneren mitochondrialen Membran mit Kupfer beteiligt sind, wurde die Expression im Wildtyp *s* mit der Expression in den beiden Kupfer-Mutanten *grisea* und Δ *PaCox17* verglichen. Sind die untersuchten Gene am zellulären Kupferhaushalt beteiligt, so sollten sich in den Mutanten Veränderungen in den Transkriptmengen zeigen. Hierzu wurden sowohl Northern Blot Analysen als auch semiquantitative RT-PCR-Experimente mit Gesamt-RNA, isoliert aus jeweils mittelalten Kulturen, durchgeführt.

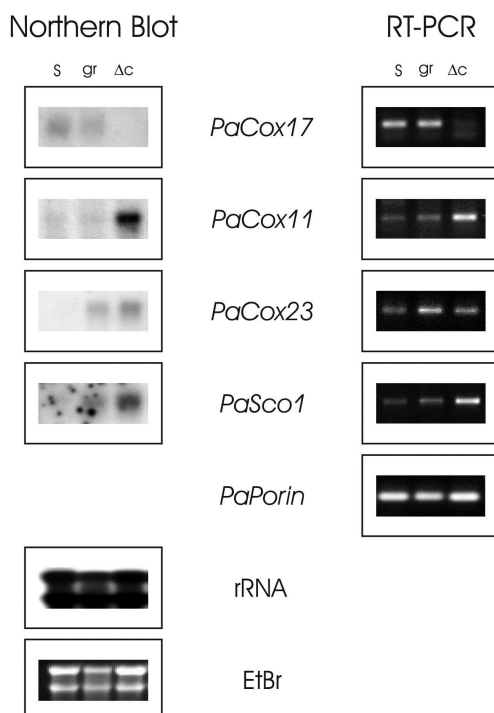


Abb. 10: Vergleich der Expression von *PaCox17*, *PaCox11*, *PaCox23* und *PaSco1* im Wildstamm *s* (*s*) und in den beiden Kupferstoffwechsel-Mutanten *grisea* (*gr*) und Δ *PaCox17* (Δ C). Die Mengen an mRNA der jeweiligen Gene wurden sowohl im Northern Blot (links) als auch mittels semiquantitativer RT-PCR (rechts) untersucht. Als Kontrolle sind dargestellt: links: Hybridisierung der Northern Blot Membran mit einer α -³²P-dCTP radioaktiv markierten Sonde gegen ribosomale RNA (rRNA) und Ethidiumbromid gefärbte Gesamt-RNA (EtBr) zum Nachweis von gleichmäßiger Beladung bzw. der Qualität der aufgetrennten Gesamt-RNA; rechts: Amplifikation von *PaPorin* mittels semiquantitativer RT-PCR zum Nachweis gleicher eingesetzter cDNA-Mengen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse – dargestellt in Abb. 10 – unterstreichen die Vorhersagen, dass PaCOX23, PaSCO1 und PaCOX11 ebenso wie PaCOX17, dessen Funktion im Stoffwechselweg der Kupferversorgung der COX bereits publiziert ist (Stumpferl *et al.* 2004), an der molekularen Kupferhomöostase beteiligt sind. Durch beide Nachweismethoden konnte gezeigt werden, dass die Transkription sowohl von *PaCox11* als auch *PaSco1* – beides potentielle Kupferakzeptoren von PaCOX17 – in der Δ PaCox17-Mutante deutlich ansteigt. Die Transkription von *PaCox23* scheint sowohl in Δ PaCox17, als auch in der Kupfermangelmutante grisea erhöht zu sein. Diese Befunde zeigen, dass die Transkriptionsrate bei Veränderungen im Kupferhaushalt angepasst wird und legen die Vermutung nahe, dass die Zelle bei Mangel an Kupfer im Transportweg durch vermehrte Synthese der an diesem Weg beteiligten Gene versucht, diesem Mangel entgegenzuwirken.

Für die vier Gene wurde weiterhin die Expression abhängig vom Alter der Kulturen untersucht. Die Untersuchung erfolgte im Wildstamm *s* mittels semiquantitativer RT-PCR und deren Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

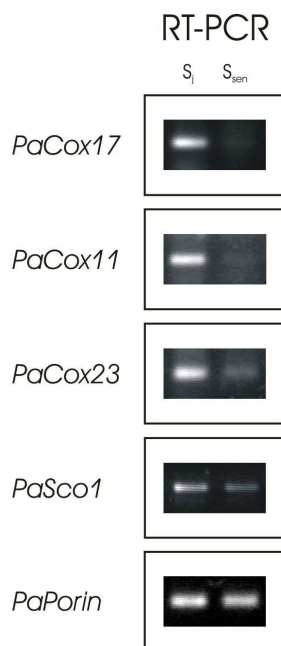


Abb. 11: Altersabhängige Expression von *PaCox17*, *PaCox11*, *PaCox23* und *PaSco1* im Wildstamm *s*. Die Mengen an mRNA der jeweiligen Gene wurden in juvenilen (s_j – links) und seneszenten (s_{sen} - rechts) Kulturen untersucht. Als Kontrollelexperiment ist die Amplifikation von *PaPorin* zum Nachweis gleicher eingesetzter Mengen dargestellt:

Offenbar werden alle vier Gene im Alter deutlich nach unten reguliert. Dies stimmt mit Ergebnisse überein, die eine Abnahme der Aktivität der COX im Alter nachweisen konnten (B. Kunstmann 2004). Somit scheint weniger Kupfer in diesem Stoffwechselweg benötigt werden und die Transkriptionsrate wird dementsprechend verringert.

Ergebnisse

Dies ist ein weiteres Beispiel für die grundsätzlichen Veränderungen, die in der Zelle während des Alterungsprozesses eintreten und für die die Mitochondrien eine ganz entscheidende Rolle zu spielen scheinen.

Im Laufe der Untersuchung der altersabhängigen Expression konnte v.a. für *PaCox11* eine interessante Beobachtung gemacht werden, die erste Hinweise auf einen genau regulierten Kontrollmechanismus dieses Stoffwechselwegs liefern. Die Ergebnisse einer Northern Blot Analyse mit RNA aus zwei verschiedenen Wildtypen (jeweils juvenil und seneszent) sind praktisch das genaue Gegenteil der Ergebnisse einer semiquantitativen RT-PCR der gleichen RNA-Proben. Während die Northern Blot Analysen der Proben aus seneszenten Kulturen sehr deutlich stärkere Signale als der Proben aus juvenilen zeigen, so ist in der semiquantitativen RT-PCR in seneszenten Proben kaum *PaCox11*-Transkript nachzuweisen (Abb. 12).

Alle hier beschriebenen Experimente zur altersabhängigen Expression von *PaCox11* wurden mit Gesamt-RNA-Proben der gleichen Isolierung durchgeführt.

Für die Erststrangsynthese bei den RT-PCR-Experimenten, bei der die RNA in cDNA umgeschrieben wird, wurde ein sog. „oligo(dT)-Primer“ verwendet. Dieser hybridisiert mit dem Poly(A)-Schwanz von mRNA-Molekülen und somit wird aus den eingesetzten Gesamt-RNA-Proben nur translatierbare mRNA mit intaktem Poly(A)-Schwanz in cDNA umgeschrieben und somit in der anschließenden PCR nachweisbar.

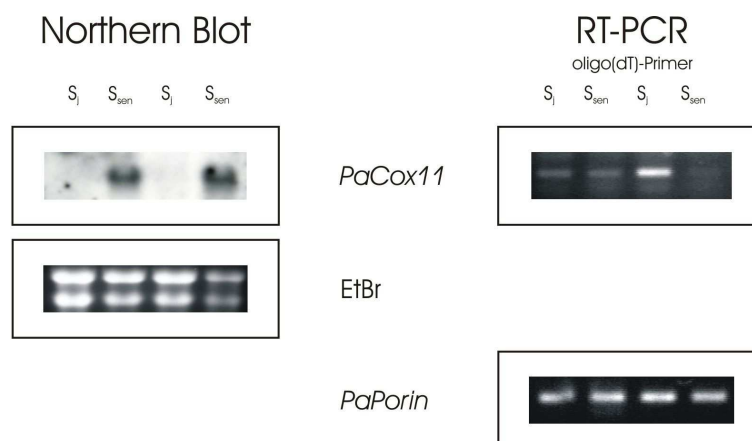


Abb. 12: Vergleich der Ergebnisse von Northern Blot Analyse (links) und semiquantitativer RT-PCR (rechts) für die Untersuchung der Expression von *PaCox11* in zwei juvenilen (s_j) und seneszenten (s_{sen}) Kulturen des Wildstamms *s*. Während in einer Northern Blot Analyse die α -³²P-dCTP radioaktiv markierte *PaCox11*-Sonde nur in den seneszenten Proben sehr deutliche Signale produzieren, so sind mittels RT-PCR in seneszenten Kulturen nur sehr geringe Mengen an *PaCox11*-Transkript zu detektieren. In juvenilen Kulturen zeigt die RT-PCR viel stärkere Signale als in seneszenten Kulturen, wohingegen mittels Northern Blot

Ergebnisse

Analyse zu diesem Zeitpunkt praktisch keine mRNA für *PaCox11* nachgewiesen werden kann. Als Kontrollelexperimente sind dargestellt: links: Ethidiumbromid gefärbte Gesamt-RNA (EtBr) zum Nachweis von gleichmäßiger Beladung bzw. der Qualität der aufgetrennten Gesamt-RNA; rechts: Amplifikation von *PaPorin* mittels semiquantitative RT-PCR zum Nachweis gleicher eingesetzter Mengen

Diese Selektion auf eine bestimmte Subpopulation innerhalb der Gesamt-RNA-Proben findet nur bei der Erststrangsynthese im Rahmen der semiquantitativen RT-PCR statt, nicht aber bei der Northern Blot Analyse. Dies legt den Schluss nahe, dass das sehr starke Signal in den seneszenten Proben im Northern Blot *PaCox11*-mRNA ohne intakten Poly(A)-Schwanz repräsentiert. Um diese mRNA-Spezies auch in der RT-PCR nachweisen zu können, wurde die Erststrangsynthese mit *PaCox11*-spezifischen Oligonukleotid-Primern (anstelle der oligo(dT)-Primer) durchgeführt (Abb. 13). So konnte auch in seneszenten Proben, in welchen durch Verwendung der oligo(dT)-Primern keine mRNA von *PaCox11* nachweisbar war (Abb. 12/ Abb. 13 rechts), ähnliche Mengen *PaCox11*-Transkript wie in juvenilen Proben detektiert werden (Abb. 13 links).

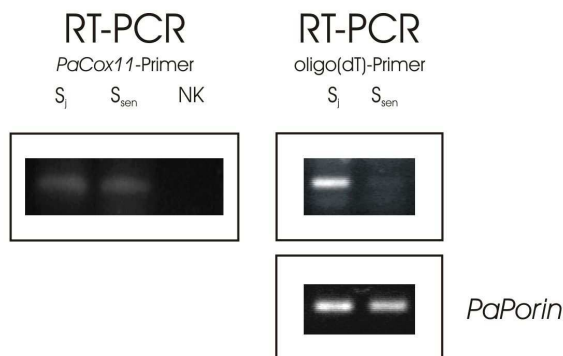


Abb. 13: Durch Verwendung von oligo(dT)-Primern bei der Erststrangsynthese werden *PaCox11*-mRNA-Moleküle ohne intakten Poly(A)-Schwanz nicht erfasst (rechts) im Gegensatz zu Northern Blot Analysen (siehe Abb. 12). *PaCox11*-spezifische Primer (links) jedoch zeigen, dass auch in seneszenten Kulturen *PaCox11*-Transkript nachweisbar ist, auch wenn dieses aufgrund des Fehlens des Poly(A)-Schwanzes wahrscheinlich nicht mehr

translatierbar ist. Als Kontrolle der Experimente mit *PaCox11*-spezifischen Oligonukleotiden ist ein PCR-Ansatz mit DNase-verdauter Gesamt-RNA vor der Erststrangsynthese (NK) dargestellt. Für die Experimente mit oligo(dT)-Primer konnte durch Amplifikation des *PaPorin*-Gens auch die Verwendung gleiche Ausgangsmengen gezeigt werden (*PaPorin* – rechts).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der Transkriptionsrate auch Faktoren wie z.B. die Stabilität der mRNA eine Rolle bei der Regulation von PaCOX11 zu spielen, wie es für COX17 in Hefe bereits gezeigt werden konnte (Oliva und Parker 2000; Jackson *et al.* 2004). Dies verdeutlicht dass die Kontrolle dieses Stoffwechselwegs offenbar vielschichtig auf mehreren Ebenen (Transkriptions- und Translationsebene) erfolgt, was die Bedeutung dieses Wegs unterstreicht.

Ergebnisse

Deletion von *PaSco1* und *PaCox23*

Das erfolgreiche Ausschalten des für das Kupfer-Chaperon PaCOX17 codierenden Gens (*PaCox17*) hat die Wichtigkeit aber auch die Zweischnidigkeit der zellulären Energiegewinnung über die Cytochrom c Oxidase gezeigt: zum einen ist der Organismus auf die effiziente und ausreichend Belieferung mit ATP angewiesen, da ansonsten viele Funktionen (z.B. Wachstum, Fertilität) stark eingeschränkt werden (Stumpferl *et al.* 2004), andererseits kommt es ohne eben diese Form der Energiegewinnung zu einer drastischen Verlängerung der Lebensspanne (+ 12,5-fach –Stumpferl *et al.* 2004; S. Stumpferl 2005). Der wahrscheinlichste Grund für die Lebensverlängerung liegt wohl in der drastisch verringerten ROS-Produktion durch die Verwendung der alternativen Oxidase (AOX – Dufour *et al.* 2000; Gredilla *et al.* 2006). Um die Rolle der Proteine PaSCO1 und PaCOX23, für die eine Beteiligung im gleichen Stoffwechselweg vorhergesagt wird, bei der Kupferversorgung der COX weiter aufklären zu können, sollten die für die beiden Proteine kodierenden Gene (jeweils einzeln) durch homologe Rekombination mit einer Resistenzkassette im Genom von *P. anserina* deletiert werden.

In einem ersten Schritt wurde ein Plasmid hergestellt, das zwei für die Selektion in *P. anserina* verwendbare Resistenzkassetten enthält (hyg^r und ble^r – blau bzw. rot in Abb. 14). 5' und 3' der ble^r wurden durch PCR Schnittstellen für selten schneidende Restriktionsenzyme eingefügt. Über diese Schnittstellen können anschließend die für die homologe Rekombination in *P. anserina* notwendigen, das zu deletierende Gen flankierenden Bereiche inkloniert werden. Bei derartigen Austausch-Plasmiden ist es sinnvoll, zwei Resistenzkassetten zu verwenden: eine, gegen die das zu deletierende Gen ausgetauscht wird (hier ble^r), und eine weitere, durch die auf die notwendigen zwei Rekombinationsereignisse selektiert werden kann (hier hyg^r). So können Transformanten, bei welchen nur ein einfaches Crossing-Over stattgefunden hat, durch Resistenz gegenüber dem zweiten Selektionsmarker (hier Hygromycin) vorab aussortiert werden.

Bei einem erfolgreichen Gentausch kommt es 5' und 3' der einen Resistenzkassette (hier ble^r) zu je einem Rekombinationsereignis. Dadurch wird der Leserahmen gegen die Resistenzkassette ausgetauscht. Der Rest des transformierten Plasmids (inkl. der zweiten Resistenzkassette – hier hyg^r) wird nicht integriert und geht verloren. Sind Primärtransformanten jedoch noch resistent gegen das zweite

Ergebnisse

Antibiotikum (hier Hygromycin) ist auszuschließen, dass die homologe Rekombination in gewünschter Weise stattgefunden hat.

Zur Konstruktion des allgemeinen Austausch-Plasmids mit Hygromycin- und Phleomycin-Resistenz (pHuB-AT-1) wurde der Klonierungsvektor pBSSK als Rückgrat verwendet und in diesen die Hygromycin-Resistenzkassette (hyg^r) aus dem Plasmid pAN7-1 (Punt *et al.* 1987) - *Bgl*II/*Hind*III-Fragment aus pAN7-1 in *Bam*HI/*Hind*III geschnittenen pBSSK - eingesetzt. Um die Phleomycin-Resistenzkassette (ble^r) für die Deletion verschiedener Gene leicht mit den notwendigen genomischen Bereichen flankieren zu können, wurde sie mittels PCR aus pEX(ble) amplifiziert und in der gleichen Reaktion am 5'-Ende Schnittstellen für *Not*I und *Eco*72I und am 3'-Ende Schnittstellen für *Pf*23II, *Mss*I und *Bcu*I angefügt. Bei allen Enzymen handelt es sich um sehr selten schneidende Restriktionsenzyme; *Mss*I generiert glatten Enden, so dass dieses auch in Kombination mit anderen glatt schneidenden Enzymen verwendet werden kann.

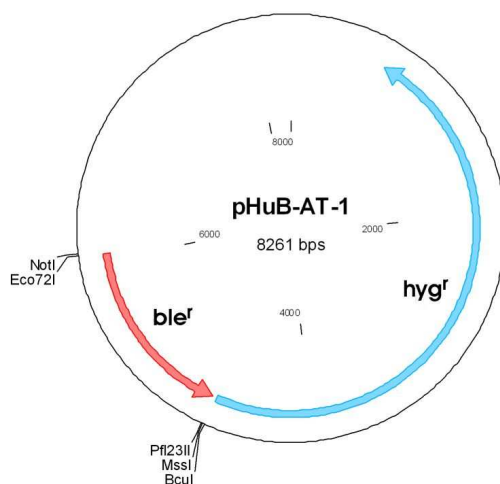


Abb. 14: Schematische Darstellung des allgemeinen Austausch-Plasmids pHuB-AT-1. Das Plasmid enthält eine Hygromycin-Resistenzkassette (hyg^r - blau) und eine Phleomycin-Resistenzkassette (ble^r - rot). An letztere können 5' und 3' die Flanken des auszuschaltenden Gens kloniert werden; die Schnittstellen für *Not*I, *Eco*72I, *Pf*23II, *Mss*I und *Bcu*I wurden über die für die PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer eingefügt.

In pHuB-AT-1 wurden jeweils ~1,5 kb der 5'- bzw. der 3'-Flanke von *PaSco1* einkloniert und nach Verifikation des entstandenen Plasmids pHuB-AT-PaSco1 Protoplasten von *P. anserina* mit diesem transformiert. In drei Transformationsexperimenten wurden insgesamt 383 Phleomycin-resistente Primärtransformanten erhalten. Von diesen waren 49 Transformanten sensitiv gegenüber Hygromycin, ein notwendiges Merkmal einer erfolgreichen Deletion (s.o.). Diese Transformanten wurden mittels Southern Blot Analyse auf einen erfolgreichen Austausch des *PaSco1*-Gens gegen die Phleomycin-Resistenzkassette hin untersucht. Keine der untersuchten Transformanten wies eine Deletion des *PaSco1*-Leserahmens auf, weder homo- noch heterokaryotisch.

Ergebnisse

Bei der verwendeten Transformationsmethode wurden Protoplasten – d.h. Pilzzellen, bei denen die Zellwand enzymatisch abgedaut wurde – eingesetzt. Diese können einen oder mehrere Zellkerne enthalten. Unterscheiden sich die Kerne bzgl. eines oder mehrere Merkmale (z.B. Gentausch) so sind die daraus entstehenden Mycelien heterokaryotisch, falls nicht sind sie homokaryotisch.

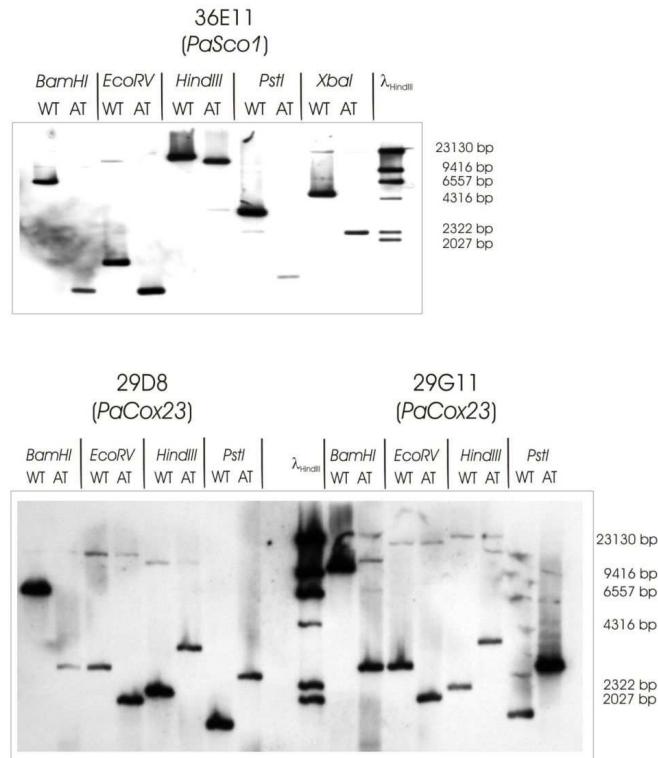
Um den Austausch dennoch zu erreichen, wurde eine neu etablierte Strategie angewandt, bei der in einem ersten Schritt der Austausch Gen \leftrightarrow Resistenzkassette auf einem Cosmid in *E. coli* stattfindet (Hamann *et al.* 2005). Für diesen Schritt reicht die Klonierung relativ kurzer Flanken, durch den Gentausch auf dem Cosmid entstehen jedoch sehr große Flanken, die die Wahrscheinlichkeit einer korrekten homologen Rekombination in *P. anserina* deutlich erhöhen. Mit dieser Methode konnten bereits mehrere Deletionsstämme hergestellt werden, mit einer Erfolgsquote von über 10%; d.h. ein erfolgreicher Austausch pro zehn Phleomycin-resistenter Primärtransformanten (Hamann *et al.* 2005). Sowohl für *PaSco1* als auch *PaCox23* wurden kurze Flanken in das Plasmid pKO4 kloniert, wodurch pKO4-PaSco1 bzw. pKO4-PaCox23 entstanden.

pKO4 enthält eine bifunktionelle Resistenzkassette, die zum einen Resistenz gegen Phleomycin zu Selektion in *P. anserina* vermittelt, zum anderen gegen Blasticidin zur Selektion in *E. coli*. Die kurzen Flanken (\sim 250 bp) des zu deletierenden Gens wurden 5' bzw. 3' dieser Kassette kloniert.

Der Leserahmen von *PaSco1* wurde auf dem Cosmid 36E11 gegen die Resistenzkassette ausgetauscht, der Leserahmen von *PaCox23* sowohl auf dem Cosmid 29D8 als auch 29G11. Vor allem das Cosmid 29D8, das ähnlich große Bereiche sowohl 5' als auch 3' des *PaCox23*-ORFs enthält (13 kb bzw. 19 kb) sollte sehr gut für derartige Deletionsexperimente geeignet sein.

Der erfolgreiche Austausch der beiden Gene auf den jeweiligen Cosmiden (AT-Cosmide 36E11-*PaSco1*::ble; 29D8-*PaCox23*::ble, 29G11-*PaCox23*::ble) wurde sowohl mittels PCR (Ergebnisse nicht dargestellt) als auch mittels Southern Blot Analyse (Abb. 15) bestätigt.

Ergebnisse



36E11 (<i>PaSco1</i>)		29D8 (<i>PaCox23</i>)		29G11 (<i>PaCox23</i>)		
Wildtyp (WT)	Austausch (AT)	Wildtyp (WT)	Austausch (AT)	Wildtyp (WT)	Austausch (AT)	
<i>Bam</i> HI	? (>1282 bp)	847	7177	2722	7177	2722
<i>Eco</i> RV	1458	843	2710	1992	2710	1992
<i>Hind</i> III	? (>4997bp)	? (WT-2905bp)	2140	3387	2140	3387
<i>Pst</i> I	3294	1043	1574	2555	1574	2555
<i>Xba</i> I	? (>4612bp)	? (WT-2490bp)	/	/	/	/

Abb 15: Southern Blot Analyse zur Verifizierung des erfolgreichen Austauschs Leserahmen \leftrightarrow Resistenzkassette auf den Cosmiden 36E11 (*PaSco1*) und 29D8 und 29G11 (beide *PaCox23*) Die durch homologe Rekombination in *E. coli* KS 272-Zellen erhaltenen rekombinanten Cosmide und die Ausgangscosmide wurden mit den Enzymen *Bam*HI, *Eco*RV, *Hind*III, *Pst*I und *Xba*I (nur 36E11) geschnitten, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Als Sonde für die Hybridisierung dienten die klonierte 5' Flanke für *PaSco1* und die klonierte 3' Flanke für *PaCox23*, jeweils Digoxigenin-markiert. Als Größenstandard wurde die *Hind*III geschnittene DNA des λ -Phagen verwendet, die entsprechenden Größen sind jeweils auf der rechten Seite angegeben. Die Tabelle gibt die jeweils zu erwartenden Fragmentgrößen an. Sie wurden anhand der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten der jeweiligen Contigs der Rohsequenz (*PaSco1*: Contig 542, *PaCox23*: Contig 1083) berechnet. Ein „?“ zeigt an, dass die Fragmentgröße nicht korrekt berechnet werden konnte, da die entsprechenden Schnittstellen außerhalb des Contigs lagen; die ermittelte Mindestgröße ist in Klammern angegeben. AT: rekombinantes Austausch-Cosmid, WT: Wildtyp-Cosmid

Die Transformation von *P. anserina*-Protoplasten mit den AT-Cosmiden brachte für *PaSco1* 197 und für *PaCox23* insgesamt 114 Phleomycin-resistente Primärtransformanten hervor. Unter diesen waren 58 bzw. 35 Transformanten, die sensitiv gegenüber Hygromycin waren. Jedoch konnte auch mit dieser Methode – wie

Ergebnisse

schon mit der Transformation mit pHuB-AT – für keines der beiden Gene ein Stamm generiert werden, der einen Austausch Leserahmen ↔ Resistenzkassette trägt. Offensichtlich ist die Deletion von sowohl *PaSco1* als auch *PaCox23* letal. Dies lässt darauf schließen, dass für beide Proteine noch eine weitere Funktion zusätzlich zum Transport von Kupfer zur COX bestehen muss. Denn der Ausfall der COX kann von *P. anserina* durch die Induktion der alternativen Oxidase (AOX) kompensiert werden, so war auch die Deletion von *PaCox17* (Stumpferl *et al.* 2004) und einer COX-Untereinheit (COX5 - Dufour *et al.* 2000) erfolgreich. Für die Homologe von PaSCO1 aus Hefe und Mensch wird die Funktion als Peroxidase diskutiert (Williams *et al.* 2005; Banting und Glerum 2006; Khalimonchuk *et al.* 2007), für PaCOX23 ist eine Rolle in der generellen zellulären Kupferhomöostase denkbar (siehe Diskussion).

Da die Deletion von *PaSco1* und *PaCox23* jeweils ein Überleben der transformierten Protoplasten unmöglich zu machen scheint, wurde folgende Strategie entwickelt: Vor der Transformation mit den jeweiligen AT-Cosmiden wird eine zusätzliche Kopie des auszuschaltenden Gens auf einem Überexpressionsplasmid in *P. anserina* eingebracht. Dadurch sollte die Deletion der endogenen Kopie möglich sein, da der Ausfall der Funktion des Proteins durch die zusätzliche Kopie kompensiert wird. Anschließend werden durch Kreuzung die exogene Kopie und die Resistenzkassette, gegen die das Endogen getauscht wurde, wieder getrennt. Sollten diese genetischen Experimente nicht erfolgreich sein (Trennung der beiden Merkmale), so ist der Nachweis erbracht, dass die Deletion des jeweiligen Gens letal ist.

Da als Selektionsmarker in *P. anserina* nur zwei Resistenzen verfügbar sind (gegen Hygromycin und gegen Phleomycin), entfällt bei vorheriger Transformation eines Überexpressionsplasmids die Möglichkeit, beide auf den AT-Cosmiden kodierten Resistenzen zur Selektion potentieller Deletionsstämme zu verwenden. Diese sind resistent gegenüber Phleomycin aber sensitiv gegen Hygromycin, da die Hygromycin-Resistenzkassette aufgrund der beiden für die Deletion erforderlichen Crossing-Over-Ereignisse nicht stabil in das Genom von *P. anserina* integriert wird. Das vorab transformierte Überexpressionsplasmid jedoch vermittelt bei stabiler Integration die Resistenz gegenüber Hygromycin. So können nicht die ~70% Falsch-Positiven (d.h.

Ergebnisse

resistent gegen beide Antibiotika) vorab selektioniert werden, was die Zahl der zu untersuchenden Pilze deutlich erhöht.

Bei den obigen Experimenten mit den AT-Cosmiden waren nur ~30 % (58 von 197 für *PaSco1* bzw. 35 von 114 für *PaCox23*) der Phleomycin-resistenten Primärtransformanten sensitiv gegenüber Hygromycin und kamen somit für eine genauere Untersuchung mittels Southern Blot Analyse in Betracht. Bei diesen haben bei der stabilen Integration der Phleomycin-Resistenzkassette mindestens zwei Crossing-Over-Ereignisse stattgefunden, weswegen die *hyg^r* eliminiert wurde.

Wird für die Herstellung der Überexpressionsplasmids jedoch eine cDNA-Kopie des Gens und nicht die genomische Kopie verwendet, so kann durch zwei einfache PCR-Experimente direkt aus Pilzmycel eine Vorauswahl Falsch-Positiver getroffen werden. Diese Versuche können nicht einen Stamm mit erfolgreichem Gentausch identifizieren, allerdings all jene Transformanten, die noch die endogene Kopie des auszuschaltenden Gens enthalten, ausschließen. Mit einer Oligonukleotid-Kombination (1 + 2 in Abb. 16), bei der beide (sowohl der „forward“ als auch der „reverse“) Oligonukleotid-Primer im codierenden Bereich des Leserahmens binden und mindestens ein Intron mit einschließen, kann man anhand des Größenunterschieds des Amplifikats sehr gut zwischen Endogen (+ Intron) und zusätzlicher Kopie (- Intron) unterscheiden. Da jedoch bei PCR-Reaktionen, bei denen mehr als ein Produkt entstehen kann, die Gefahr besteht, dass bevorzugt bzw. ausschließlich das kleinere Produkt synthetisiert wird, bietet die Verwendung eines Oligonukleotid-Primers (3 in Abb. 16), der in einem Intron des Gens bindet, die Möglichkeit, die Ergebnisse zu verifizieren. Wird dieser in einer Reaktion mit dem entsprechenden passenden Gegenstück aus der ersten PCR eingesetzt, so entsteht nur bei denjenigen Transformanten ein Amplifikat, welche noch das Endogen enthalten, somit also nicht positiv im Sinne des Gentauchs sind. Denn die Kopie, die über das Überexpressionsplasmid eingebracht wurde, besitzt keine Introns und somit keine Bindungsstelle für den Oligonukleotid-Primer. Mit den beschriebenen beiden Experimenten, die schematisch in Abb. 16 zusammengefasst sind, lassen sich somit alle Phleomycin-resistenten Transformanten auswählen, die ein ektopisch integriertes AT-Cosmid und somit keinen erfolgreiche Deletion tragen.

Ergebnisse

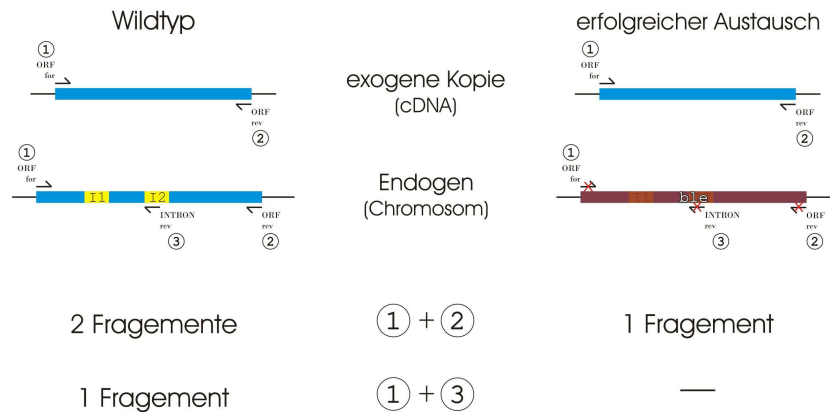


Abb. 16: Schematische Darstellung der PCR-Strategie zur Identifizierung Falsch-Positiver potentieller Deletionsstämme. Der Wildstamm *s* wird in einem ersten Schritt mit einem Überexpressionsplasmid, von dem das auszuschaltende Gen als cDNA abgelesen wird, transformiert, um die anschließende Disruption des Endogenen zu kompensieren. Um Transformanten, die trotz entsprechender Resistenzen keinen Tausch Gen ↔ Resistenzkassette enthalten (links „Wildtyp“ bzgl. des Zielgens), von korrekten Deletionsstämmen (rechts „erfolgreicher Austausch“) zu unterscheiden, werden zwei PCR durchgeführt. Die Oligonukleotid-Kombination 1 und 2 liefert in der Wildtypsituation zwei Fragmente (Endogen inkl. Introns und zusätzliche Kopie ohne Introns), bei erfolgreichem Austausch nur das kleinere Fragment ohne Introns. Wird der im Intron bindende Oligonukleotid-Primer 3 zusammen mit 1 verwendet, kann nur ein Fragment entstehen, wenn noch die endogene Kopie des Gens vorhanden ist.

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit für keines der beiden Gene (*PaSco1* und *PaCox23*) diese Strategie erfolgreich angewendet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit durch die Identifizierung einer Vielzahl von Genen, die in die Aufrechterhaltung des Kupferhaushalts involviert sind, die Grundlagen gelegt wurden, ein detailliertes Bild der molekularen Kupferhomöostase in *P. anserina* zu erstellen. Ist diese Bestandsaufnahme erfolgt, hat man sehr gute Möglichkeiten, Veränderungen im Kupferstoffwechsel und deren Bezug zu Alterungsprozessen aufzudecken. Um Rückschlüsse auf die vorherrschenden Kupferspiegel ziehen zu können, eignet sich vor allem die Untersuchung von Transkriptspiegeln Kupfer-assoziiierter Gene. Für *PaMt1* und *PaCtr3* konnte diese Methode bereits erfolgreich angewandt werden (Averbeck *et al.* 2001, Borghouts *et al.* 2002 A). Diese beiden Gene reagieren in entgegengesetzter Weise auf Erhöhungen der Kupferkonzentration: während die Transkription von *PaMt1* stark ansteigt, wird die Transkription von *PaCtr3*, kontrolliert durch den Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktor GRISEA, stark herabgesetzt. Je mehr Gene

Ergebnisse

in eine Transkriptanalyse mit einbezogen werden können, umso genauer kann die Reaktion der Zelle auf Veränderungen im Kupferhaushalt aufgezeichnet werden.

3.3 Direkte Bestimmung der Kupferkonzentration in fraktionierten Zellbestandteilen

Durch die Analyse der Transkription von *PaMt1* und *PaCtr3* und der Aktivität der Cu/Zn-SOD konnte in *P. anserina* gezeigt werden, dass es während des Alterns des Pilzes offenbar zu drastischen Veränderungen in der Verteilung von Kupfer zwischen den zellulären Kompartimenten kommt (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A). Das starke Ansteigen sowohl der Transkription von *PaMt1* als auch der Aktivität der Cu/Zn-SOD bei gleichzeitiger Repression der Transkription von *PaCtr3* liefert sehr gute Hinweise darauf, dass es im Cytoplasma seneszenter Pilzkulturen zu einem Anstieg der Kupfer-Konzentration kommt. Als mögliche Quelle des Kupfers wurden die Mitochondrien genannt (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A).

Zur Verifikation dieser anhand indirekter Befunde erstellten Hypothese eines cytoplasmatischen Kupferanstiegs während der Seneszenz sollten im Rahmen dieser Arbeit Kupferspiegel direkt mit analytischen Methoden im Cytoplasma und in Mitochondrien juveniler und seneszenter Wildtyp-Stämme von *P. anserina* gemessen werden. Hierzu wurden sechs Probengruppen der mitochondrialen bzw. cytoplasmatischen Fraktion aus jeweils juvenilen und seneszenten Stämmen von insgesamt fünf Isolaten (F 56560, F 56590, F 56601, F 57470, F 57271) präpariert.

Isolierung cytoplasmatischer und mitochondrialer Zellfraktionen aus juvenilen und seneszenten Kulturen

Um die Kupferkonzentrationen in unterschiedlichen Zellkompartimenten direkt bestimmen zu können, muss ein Verfahren zur effizienten und effektiven Zellfraktionierung zur Verfügung stehen. Arbeiten von Dr. Ricardo Gredilla etablierten eine Methode zur Isolierung von physiologisch gekoppelten Mitochondrien durch differentielle Zentrifugation (Gredilla *et al.* 2006). Nach dem ersten Hochgeschwindigkeitszentrifugationsschritt, bei dem Mitochondrien und Vakuolen sedimentiert werden, bleibt ein Überstand, der korrekter Weise als „Post-mitochondrialer Überstand“ benannt wird, hier im weiteren Verlauf aber als

Ergebnisse

„Cytoplasma“ bezeichnet wird. Western Blot Analysen konnten belegen, dass diese Fraktion frei von mitochondrialen und vakuolären Verunreinigungen ist (Abb. 24). Um Kontaminationen durch andere Zellbestandteile oder defekte Mitochondrien auszuschließen, wurde das Sediment des Hochgeschwindigkeits-zentrifugationsschritts, das Mitochondrien und Vakuolen enthält, weiter durch Ultrazentrifugation über einen diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten (20% / 36% / 50%) aufgetrennt. Intakte Mitochondrien befinden sich in der Interphase zwischen 36% und 50% Saccharose. Diese wurden für die Messungen der Kupferkonzentration eingesetzt (s.u.).

Die Aufreinigung der Mitochondrien über Dichtegradienten-Zentrifugation birgt die Gefahr einer Selektion auf eine bestimmte Subpopulation an Mitochondrien, v.a. und besonders bei seneszenten Kulturen. Für die Dichte der Mitochondrien, nach der in dieser Methode die Proben aufgetrennt werden, ist die Intaktheit und Integrität der Membranen entscheidend. Wie in anderen Modellsystemen (v.a. Säugerzellen) gezeigt werden konnte, verändert sich diese für beide, sowohl die innere als auch die äußere, mitochondrialen Membranen beim Eintritt in die Seneszenz (zusammengefasst in Halestrap *et al.* 2002; Crompton 2004; Armstrong 2006; Bernardi *et al.* 2006). Auch ist wohl bekannt, dass sich die Morphologie der Mitochondrien von lang, schlauchförmig und verzweigt in juvenilen Kulturen nach klein und kugelig im Alter verändert (Yasuda *et al.* 2006; Scheckhuber *et al.* 2007).

Um sicherzustellen, dass die isolierten Mitochondrien, die für die Messung des Kupfergehalts eingesetzt wurden, auch tatsächlich seneszent sind, wurde ein Biomarker für Seneszenz in *P. anserina* untersucht: die Reorganisation der mitochondrialen DNA (mtDNA) (Cummings *et al.* 1979; Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984; Cummings *et al.* 1985). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass in seneszenten Proben durch die Dichtegradienten-Zentrifugation selektiv Mitochondrien angereichert wurden, die nicht oder noch nicht seneszent sind und eher einen juvenilen Phänotyp aufweisen, was die Ergebnisse verfälschen würde. Hierzu wurde erstmals direkt aus Mitochondrien isolierte mtDNA mit *Bgl*II verdaut und mittels Southern Blot Analyse auf das Vorkommen von plDNA („plasmid like DNA“ – engl. „Plasmid-ähnliche DNA“) untersucht. Bei plDNA handelt es sich um den ausgegliederten Bereich eines Introns des *CoI*-Gens, der sich transposon-ähnlich

Ergebnisse

amplifizieren und in die mtDNA reintegrieren kann (Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984; Sellem *et al.* 1993; Sainsard-Chanet *et al.* 1998). Durch intramolekulare homologe Rekombinationsereignisse zwischen pDNA-Bereichen kann es anschließend zu Deletionen großer Bereiche kommen, was praktisch zum vollständigen Verlust der auf der mtDNA kodierten Gene führen kann (Sellem *et al.* 1993; Sainsard-Chanet *et al.* 1998).

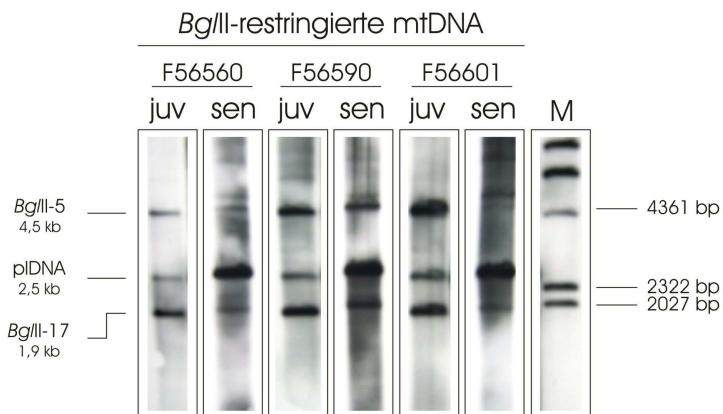


Abb. 17: Reorganisation der mtDNA als Biomarker für Seneszenz. Die mittels Dichtegradienten-Zentrifugation aufgereinigten Mitochondrien aus seneszenten Stämmen (hier für drei der sechs Proben dargestellt) zeigen eine deutliche Amplifikation von pDNA. Direkt aus Mitochondrien isolierte mtDNA wurde nach BglII-Restriktion mittels Southern Blot Analyse auf das Vorkommen von pDNA hin untersucht. In juvenilen (juv) Proben liegt hauptsächlich

intakte mtDNA vor, wie das Vorkommen der beiden Banden bei 4,5 kb und 1,9 kb (BglII-5 und BglII-17) zeigt. Diese verschwinden in seneszenten (sen) Proben fast vollständig und werden durch pDNA (eine Bande bei 2,5 kb) ersetzt. Die Nylonmembran wurde mit einer Digoxigenin-markierten pDNA-spezifischen Sonde aus pSP17 (Stahl *et al.* 1982) hybridisiert. Als Größenstandard (M) ist der Digoxigenin-markierte λ /HindIII-Marker aufgetragen.

Die aus seneszenten Kulturen isolierten Mitochondrien weisen eindeutig molekulare Merkmale von Seneszenz auf; der größte Teil der mtDNA-Moleküle ist reorganisiert und es kommt zur Amplifikation von pDNA (Abb. 17).

Die Ergebnisse der Southern Blot Analyse – zwei Banden der intakten mtDNA (BglII-5 und BglII-17) und eine Bande für amplifizierte pDNA –, die hier erstmals mit direkt aus isolierten Mitochondrien gewonnener mtDNA durchgeführt wurde, entsprechen denen mit isolierter Gesamt-DNA, auch wenn dort in juvenilen Kulturen praktische keine pDNA und in seneszenten Kulturen praktisch keine intakte mtDNA mehr nachzuweisen ist (Stahl *et al.* 1978; Cummings *et al.* 1979; Kück *et al.* 1985; Borghouts *et al.* 1997; Dufour *et al.* 2000; Stumpferl *et al.* 2004; Scheckhuber *et al.* 2007). Das Vorkommen von sowohl intakter als auch reorganisierter mtDNA in jeweils juvenilen und seneszenten Proben (wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß) kann als Hinweis für eine höhere Sensitivität des Experiments mit direkt aus Mitochondrien isolierter mtDNA gewertet werden.

Ergebnisse

Somit wurden durch die Aufreinigungsmethode (Dichtegradienten-Zentrifugation) nicht selektiv junge, ungeschädigte Mitochondrien angereichert. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die „ältesten“ Mitochondrien, die die dramatischsten Schädigungen aufweisen, nicht mit in die Analyse mit einbezogen werden. Die möglichen Folgen für die Ergebnisse der Kupfermessungen werden im Diskussionsteil ausführlich dargelegt.

Für die insgesamt 24 präparierten Proben (6 x jeweils juvenile und seneszente Mitochondrien und Cytoplasma) wurde nun der Gehalt an Kupfer mittels Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektrometrie (TXRF - Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektrometrie) bestimmt.

Messung der Kupferkonzentration in isoliertem Cytoplasma und isolierten Mitochondrien mittels TXRF

Indirekte Befunde waren bislang die einzigen Hinweise auf einen Anstieg der Kupferkonzentration im Cytoplasma durch eine Umverteilung mitochondrialen Kupfers während der Seneszenz. Diese Ergebnisse sollten im Rahmen dieser Arbeit mittels einer direkten analytischen Methode (TXRF) verifiziert werden.

Die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektrometrie (TXRF) ist eine sehr empfindliche Methode, mit der in geringen Mengen untersuchten Materials auch geringste Mengen (Nachweisgrenze bis zu $1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$) verschiedenster Elemente zuverlässig quantitativ nachgewiesen werden können (Klockenkämper 1997; Zickermann *et al.* 1997; Wittershagen *et al.* 1998).

Die Messungen wurden von Claudia Rittmeyer aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. B.O. Kolbesen am Institut für anorganische und analytische Chemie der JW Goethe-Universität durchgeführt. Die in mg pro Liter [mg / l] ermittelten Werte wurden auf die im gemessenen Probenvolumen vorhandene Menge an Protein bezogen und in nmol Kupfer pro mg Protein [$\text{nmol Cu} / \text{mg Protein}$] umgerechnet. Die Ergebnisse der Einzelmessungen sind in der Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5 (nächste Seite): Ergebnisse der direkten Messung des Kupfergehalts in der cytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktion von juvenilen und seneszenten Kulturen von *P. anserina* mittels TXRF. Angegeben ist die jeweilige gemessene Kupferkonzentration in nmol pro mg Protein der Einzelmessungen (obere Hälfte – jeweils $n = 4$) und der aus den jeweils sechs Einzelwerten errechnete Mittelwert für die jeweils juvenile und seneszente cytoplasmatische bzw. mitochondriale Fraktion (\pm Standardfehler – untere Hälfte).

Ergebnisse

Stamm Alter	Kupfer-Gehalt [nmol Cu / mg Protein]		Stamm Alter	Kupfer-Gehalt [nmol Cu / mg Protein]	
	Cytosol	Mitochondrien		Cytosol	Mitochondrien
56560			57470		
juvenil	1,39 ± 0,12	1,09 ± 0,02	juvenil	1,17 ± 0,05	1,07 ± 0,13
seneszent	1,36 ± 0,12	0,57 ± 0,08	seneszent	2,65 ± 0,26	1,72 ± 0,10
56590			57470		
juvenil	2,16 ± 0,14	1,59 ± 0,12	juvenil	1,20 ± 0,09	2,25 ± 0,17
seneszent	1,25 ± 0,11	1,11 ± 0,09	seneszent	1,43 ± 0,19	1,21 ± 0,10
56601			57271		
juvenil	0,80 ± 0,04	1,11 ± 0,07	juvenil	0,85 ± 0,07	0,97 ± 0,01
seneszent	1,40 ± 0,23	0,83 ± 0,07	seneszent	1,37 ± 0,06	0,64 ± 0,03
		Cytosol			Mitochondrien
Ø juvenil		1,26 ± 0,20			1,34 ± 0,20
Ø seneszent		1,59 ± 0,21			1,03 ± 0,18

Die Kupferkonzentration, die in den einzelnen Fraktionen bestimmt wurde, lag für das Cytosol zwischen 0,80 und 2,65 nmol Cu / mg Protein und für Mitochondrien zwischen 0,57 und 2,25 nmol Cu / mg Protein. Diese Werte stimmen sehr gut mit Werten überein, die für menschliche Zellkulturen (Tapia *et al.* 2003) ebenfalls mittels TXRF und Mitochondrien aus *S. cerevisiae* (Cobine *et al.* 2004) mittels einer anderen analytischen Methode (ICP-OES - „Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy“) gemessen wurden. Diese lagen zwischen 0,35 und 1,4 nmol Cu / mg Protein bzw. 0,62 und 0,7 nmol Cu / mg Protein (Tapia *et al.* 2003; Cobine *et al.* 2004). Dies zeigt somit, dass durch die hier etablierte Aufreinigungsmethode (experimentelles Vorgehen, Pufferzusammensetzung) es sehr gut möglich ist, Kupferspiegel in Material von *P. anserina* direkt und zuverlässig zu bestimmen. Dies erweitert den Umfang der zur Verfügung stehenden Methoden zur Aufklärung der molekularen Mechanismen der Kupferhomöostase und deren Bezug zu Alterungsprozessen um ein sehr hilfreiches Werkzeug.

Gleichzeitig konnte mit den durchgeführten Messungen gezeigt werden, dass neben *S. cerevisiae* (Cobine *et al.* 2004) und Säugerzellen (Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B) auch Mitochondrien von *P. anserina* offensichtlich als Kupferspeicher fungieren, da die Menge an dort vorhandenem Kupfer viel höher ist, als in Cuproenzymen in den Mitochondrien eingebaut vorliegt. Dieser Befund passt sich sehr gut in das Arbeitsmodell ein, dass eine Relokalisation zellulären Kupfers von den Mitochondrien in das Cytoplasma beim Eintritt in die Seneszenz vorhersagt.

Ergebnisse

Aus den jeweils sechs Einzelwerten für juvenile und seneszente Mitochondrien und Cytoplasma wurden die vier Mittelwerte gebildet (ebenfalls in Tabelle 5), welche grafisch in Abbildung 18 dargestellt sind.

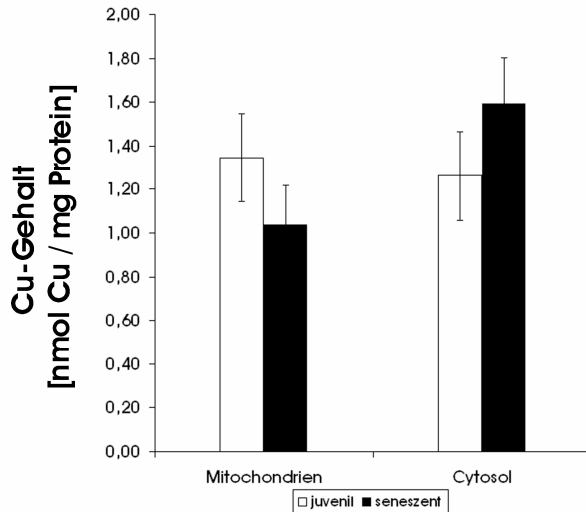


Abb. 18: Grafische Darstellung des gemittelten Kupfergehalts in Mitochondrien (links) und Cytosol (rechts) isoliert aus juvenilen (weiße Balken) und seneszenten (schwarze Balken) Kulturen von *P. anserina*. Die Werte errechnen sich als Mittelwert der jeweils sechs Einzelmessung (Tab. 5) und sind \pm des Standardfehlers abgebildet.

Betrachtet man die Mittelwerte der Messungen, so kann man einen deutlichen Trend hin zu einem Anstieg der Kupferkonzentration im Cytoplasma in seneszenten Kulturen erkennen. Gleichzeitig nimmt die Konzentration an Kupfer in den Mitochondrien – die als Quelle des im Cytoplasma im Alter auftauchenden Kupfers denkbar sind – leicht ab. Beide Trends sind jedoch nicht von statistischer Signifikanz. Dies ist vor allem den großen individuellen Unterschieden innerhalb der getesteten Stämme geschuldet. In vier von sechs Proben kommt es im Cytoplasma im Alter zu einem klaren Anstieg, bei einer Probe bleibt die Kupferkonzentration praktisch gleich und eine Probe zeigt ein umgekehrtes Verhalten; dort fällt die cytoplasmatische Kupferkonzentration im Alter ab.

Um diese individuellen Unterschiede zu eliminieren, wurde das Verhältnis aus mitochondrialer und cytoplasmatischer Kupferkonzentration ($[\text{Cu}]_{\text{Mito}}/[\text{Cu}]_{\text{Cyto}}$) gebildet (Tab. 6, Abb. 19).

Tabelle 6 (nächste Seite): Verhältnis zwischen mitochondrialer und cytoplasmatischer Kupferkonzentration in juvenilen und seneszenten Kulturen von *P. anserina*. Aus den jeweiligen Ergebnissen der Einzelmessungen für $[\text{Cu}]_{\text{Mito}}$ und $[\text{Cu}]_{\text{Cyto}}$ für das entsprechende Alter und Isolat wurde der Quotient gebildet (obere Hälfte). In der unteren Hälfte ist der Mittelwert \pm Standardfehler angegeben.

Ergebnisse

Stamm	Alter	Verhältnis [Cu] _{Mito} / [Cu] _{Cyto}	Stamm	Alter	Verhältnis [Cu] _{Mito} / [Cu] _{Cyto}
56560	juvenil	0,78	57470	juvenil	0,92
	seneszent	0,42		seneszent	0,65
56590	juvenil	0,73	57470	juvenil	1,88
	seneszent	0,94		seneszent	0,85
56601	juvenil	1,39	57271	juvenil	1,14
	seneszent	0,59		seneszent	0,47

	[Cu] _{Mito} / [Cu] _{Cyto}
Ø juvenil	1,14 ± 0,18
Ø seneszent	0,65 ± 0,08

Steigt der cytosolische Kupferspiegel an und/oder nimmt der Kupfergehalt in den Mitochondrien ab, so wird der Wert des Quotienten kleiner. Genau dies zeigt sich in den Berechnungen für die sechs hier untersuchten Proben-Pärchen. Der Mittelwert fällt von $1,14 \pm 0,18$ auf $0,65 \pm 0,08$, signifikant auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,04$. Nicht nur der Mittelwert, sondern auch in fünf der sechs Einzelberechnungen liegt der Wert des Quotienten für juvenile Kulturen ganz deutlich über dem für seneszente Kulturen. Nur der Stamm (F 56590), für den auch ein drastischer Abfall der cytoplasmatischen Kupferkonzentration im Alter gemessen wurde, verhält sich konträr.

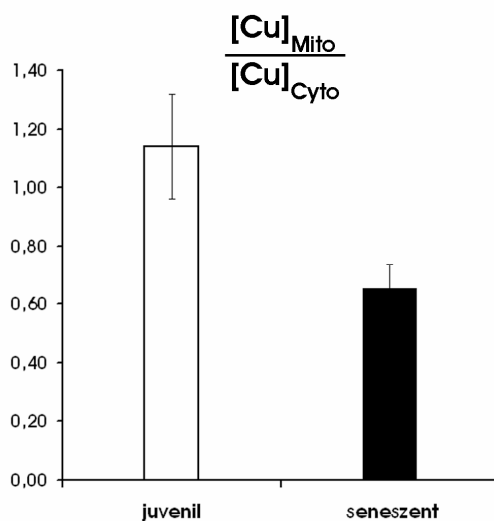


Abb. 19: Grafische Darstellung der gemittelten Verhältnisse von mitochondrialer und cytoplasmatischer Kupferkonzentration in juvenilen (links) und seneszenten (rechts) Kulturen von *P. anserina*. Das Verhältnis sinkt signifikant in seneszenten Stämmen ($p < 0,04$). Die Werte sind \pm des Standardfehlers abgebildet.

Zusammengenommen verfestigen die durchgeführten direkten Messungen der Kupferkonzentration mittels TXRF das Arbeitsmodell, nach dem bei Eintritt in die

Ergebnisse

Seneszenz Kupfer aus den Mitochondrien in das Cytoplasma entlassen wird. Kontrollexperimente (Southern Blot Analyse zur Charakterisierung der verwendeten Mitochondrien) und die bereits veröffentlichten Ergebnisse von Transkript- und Aktivitätsanalysen (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A) sprechen deutlich dafür, dass nicht die verwendete Isolierungsmethode (differentielle Zentrifugation und Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation) für die nachgewiesenen altersabhängigen Unterschiede in der zellulären Kupferverteilung verantwortlich ist, sondern tatsächlich in der Seneszenz die Menge an Kupfer im Alter im Cytoplasma ansteigt. In Kooperation mit Florence Debaq-Chainiaux aus der Arbeitsgruppe von O. Toussiant an der Universität von Namur (Belgien - FUNDP) konnten mittels Transkriptanalyse (real-time PCR) erste Hinweise darauf erarbeitet werden, dass es auch in alternden menschlichen diploiden Fibroblasten (HDF – „human diploid fibroblasts“) zu einer Zunahme der cytoplasmatischen Kupferkonzentration kommt. Welche detaillierten Effekte dieser Anstieg für den Zellmetabolismus hat, muss in weiteren Arbeiten geklärt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse weisen aber auf eine neue Rolle für Kupfer, die über seine Funktion als Co-Faktor der in der mitochondrialen Atmung verwendeten Endoxidase hinausgeht, hin.

3.4 Freisetzung von Matrix-Inhalten in der Seneszenz

Stammt das Kupfer, das sich im Alter im Cytoplasma anhäuft, tatsächlich aus den Mitochondrien? Bereits in früheren Arbeiten (Borghouts *et al.* 2002 A) konnte gezeigt werden, dass das Kupfer nicht aus dem Aussenmedium in die Zelle einströmt, denn der Hochaffinität-Kupfertransporter *PaCtr3* wird in seneszenten Kulturen nicht exprimiert. In diesen Arbeiten (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A) und durch die hier erbrachten Ergebnisse wurden erste Hinweise auf die Mitochondrien als intrazelluläre Quelle des Kupfers gesammelt. Für diese Organellen ist eine zentrale Rolle im Zelltod lange bekannt und sie konnten des Weiteren kürzlich in *S. cerevisiae* als Speicherorte für Kupfer (Cobine *et al.* 2004) identifiziert werden. Dieses Reservoir an Kupfer („Kupfer-Pool“) konnte auch in Säugerzellen (Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B) und in dieser Arbeit in *P. anserina* nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Um zu zeigen, dass sich während des Alterns der Inhalt der mitochondrialen Matrix inklusive des sich dort befindlichen Kupfers in das Cytoplasma ergießt, wurde eine Herangehensweise gewählt, die den experimentellen Einfluss minimiert. Hierfür eignet sich besonders das grün fluoreszierende Protein (eGFP – engl. „enhanced Green Fluorescence Protein“), dessen intrazelluläre Verteilung sich sehr einfach ohne Isolierung von Zellbestandteilen unter einem Fluoreszenzmikroskop analysieren lässt. Leitet man eGFP in die Mitochondrien, die sich mittels Farbstoff unter dem Mikroskop sehr gut anfärben lassen, so sollte es einen deutlichen Unterschied zwischen jungen bzw. mittelalten und seneszenten Pilzzellen bzgl. der Lokalisierung des eGFP-Signals und der Co-Lokalisierung mit dem Signal eines Mitochondrienfarbstoffs geben. Bis zum Eintritt in die Seneszenz sollten beide Signale deckungsgleich sein, dann aber sollte eGFP nicht mehr nur auf die Mitochondrien beschränkt sein.

Für den Transport des eGFP in Matrix der Mitochondrien ist eine sog. MTS („mitochondrial targeting sequence“ – engl. „mitochondriale Ziel-Sequenz“) zuständig. Diese kurze Peptidsequenz wird nach erfolgreichem Import abgespalten. Bislang war für *P. anserina* keine definierte MTS bekannt, so dass hier auf die veröffentlichte MTS-Sequenz des Proteins MPP („mitochondrial processing peptidase“) des nahen Verwandten *N. crassa* zurückgegriffen wurde (Arretz *et al.* 1994). Die dafür kodierende DNA-Sequenz wurde mittels PCR aus genomischer DNA von *N. crassa* amplifiziert. Über eine eingefügte Schnittstelle für *NcoI* wurde die Sequenz des *eGfp*-Leserahmens - aus pSM1 (Pöggeler *et al.* 2003) – im selben Leseraster angefügt. Das fertige Überexpressionsplasmid besteht aus dem Rückgrat des Plasmids pEX(ble), dem Promotor und Transkriptionsterminator des *PaMt1*-Gens, die die Expression des mit der MTS-Sequenz fusionierten *eGfp*-Gens regulieren und einer Hygromycin-Resistenzkassette zur Selektion transformierter Pilzprotoplasten (pEX-NcMTS-eGFP-hph - Abb. 20).

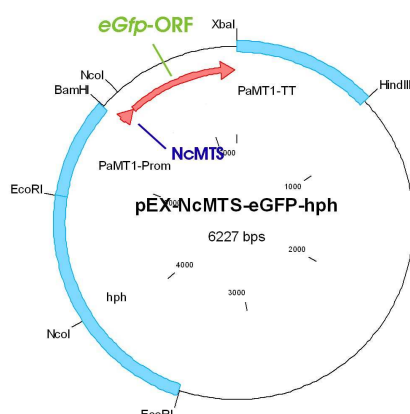


Abb. 20: Plasmid zur Expression von eGFP, welches mittels MTS in die Mitochondrien transportiert wird. Das Plasmid pEX-NcMTS-eGFP-hph verfügt über den Promotor und Transkriptionsterminator des *PaMt1*-Gens (PaMT1-Prom und PaMT1-TT) und eine Hygromycin-Resistenzkassette (hph). Die für die MTS der MPP aus *N. crassa* kodierende Sequenz wurde im gleichen Leseraster an den *eGfp*-Leserahmen (aus pSM1 – Pöggeler *et al.* 2003) fusioniert. Der PaMT1-Promotor führt zu einer starken Überexpression.

Ergebnisse

Protoplasten von *P. anserina* wurden mit pEX-NcMTS-eGFP-hph transformiert und insgesamt 13 Hygromycin-resistente Primärtransformanten selektiert. Von diesen wurden Deckglaskulturen für die mikroskopische Analyse der grünen Fluoreszenz angezogen. Exemplarisch sind in Abbildung 21 drei Aufnahmen der Transformante GFP 8 dargestellt.

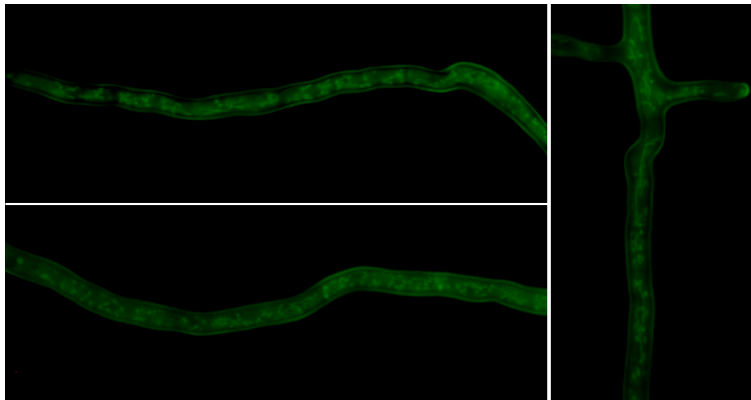


Abb. 21:
Fluoreszenzmikroskopische
Aufnahmen der
Primärtransformante GFP 8.
Die Bilder wurden unter insgesamt
1000-facher Vergrößerung
aufgenommen.
Anzuchtbedingungen,
Anregungswellenlängen und Filter
siehe Material & Methoden 2.3.1.4

In den Hyphen der Primärtransformante GFP 8 sind eindeutig grün fluoreszierende Strukturen rundlicher bis filamentöser Form zu erkennen, charakteristisch für Mitochondrien in *P. anserina* (Sellem *et al.* 2006; Scheckhuber *et al.* 2007). Somit scheint die verwendete MTS tatsächlich das eGFP in die Mitochondrien von *P. anserina* zu leiten. Neben der Gegenfärbung der Mitochondrien mit dem Farbstoff „MitoTracker® red CMXRos“ (s.u. - Abb. 23) sollte auch durch protein-biochemische Methoden der Nachweis der korrekten Funktionalität der MTS erbracht werden. Nur durch diese Experimente ist es möglich, das genaue Sub-Kompartiment innerhalb der Mitochondrien – in diesem Fall die Matrix – in das das eGFP durch die Lokalisierungssequenz sortiert wird, zu verifizieren. Durch rein mikroskopische Aufnahmen wäre dies aufgrund mangelnder Auflösung nicht zweifelsfrei möglich. Zu diesem Zweck wurde ein sog. „Digitonin-Assay“ (basierend auf Hartl *et al.* 1986) etabliert und durchgeführt. Dabei werden frisch isolierte Mitochondrien mit unterschiedlichen Mengen des milden Detergens' Digitonin behandelt und anschließend durch Zentrifugation in Überstand- und Sediment-Fraktion getrennt. In der Reihenfolge äußere Membran → Intermembranraum → innere Membran → Matrix werden bei ansteigender Digitonin-Menge die Proteine in den jeweiligen Sub-Kompartimenten aus dem Sediment in den Überstand übergehen. Durch

Ergebnisse

Markerproteine lassen sich die einzelnen Sub-Kompartimente identifizieren; hier wurde als Marker für die mitochondriale Matrix ein Antikörper gegen die MnSOD eingesetzt.

Der Vergleich der Ergebnisse mit α -MnSOD-Antikörper und α -eGFP-Antikörper zeigen eine klare Übereinstimmung (Abb. 22), was einen starken Hinweis darauf liefert, dass beide untersuchten Proteine im gleichen Sub-Kompartiment lokalisiert sind. Die eingesetzte MTS funktioniert somit wie erwartet, auch wenn sie aus *N. crassa* stammt. Da für das eGFP nur eine Bande der Größe 27 kDa zu detektieren ist, wird die MTS nach erfolgreichem Eintransport abgespalten, da im anderen Falle ein um 4 kDa (Molekulargewicht des MTS-Peptids) größeres Protein nachzuweisen wäre.

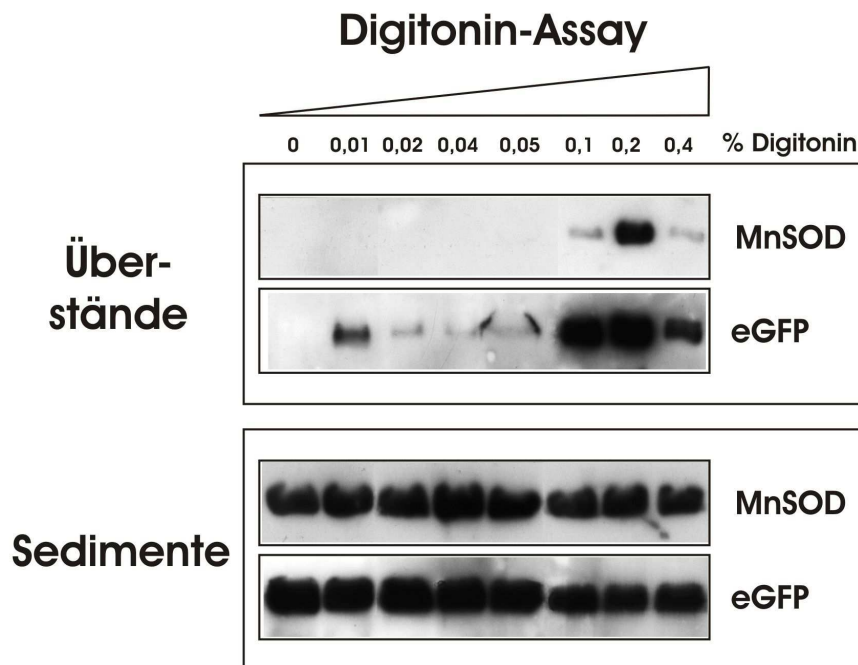


Abb. 22: Digitonin-Assay (nach Hartl *et al.* 1986) zum Nachweis der korrekten Funktionalität der verwendeten MTS der MPP von *N. crassa* (Arretz *et al.* 1994). Je 100 μ g frisch isolierter Mitochondrien (aus GFP 8) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Digitonin behandelt und anschließend in Überstand und Sediment aufgetrennt. Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE und Transfer auf eine PVDF-Membran wurde mit den entsprechenden Antikörpern eGFP und als Marker für die mitochondriale Matrix MnSOD detektiert. Beide Proteine zeigen ein gleiches Verteilungsmuster, d.h. erst bei 0,1 % Digitonin gehen sie aus dem Sediment in den Überstand über. Der Versuch zeigt außerdem, dass die nach der Methode von Gredilla *et al.* 2006 aufgereinigten Mitochondrien vollständig intakt sind, da ohne Digitonin keine Matrixproteine im Überstand detektierbar sind.

Das erfolgreich in die mitochondriale Matrix eingebrachte eGFP ermöglichte nun, zu untersuchen, ob sich der Inhalt der Matrix inklusive des sich dort befindlichen Kupfers im Alter in das Cytosol ergießt. Für die Erhebung dieses Befundes ist Dank

Ergebnisse

der Verwendung von eGFP keine Isolierung von Zellbestandteilen notwendig und kann somit mit nur minimalen experimentellen Eingriffen erfolgen, was vor allem bei seneszenten Pilzkulturen von großem Vorteil ist und die Gefahr von experimentellen Artefakten minimiert. Die Primärtransformanten wurden solange auf BM-Medium kultiviert, bis sie das Wachstum einstellten und alle phänotypischen Zeichen der Seneszenz (Hyperpigmentierung, nur geringes Luftmycel) zeigten. Anschließend wurden mikroskopische Präparate von mittelalten und seneszenten Kulturen hergestellt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. In Abb. 23 sind zwei unabhängige Primärtransformanten („GFP 8“ und „GFP 9“) dargestellt.

Werden während der Seneszenz die Inhalte der mitochondrialen Matrix in das Cytosol freigesetzt, so sollte sich die Lokalisierung des eGFP-Signals von strukturiert und auf die Mitochondrien beschränkt in mittel-alten Pilzen hin zu homogen innerhalb der Zelle verteilt in seneszenten Kulturen verändern. Genau dies ist in den untersuchten Pilzen zu dokumentieren (Abb. 23). Um auszuschließen, dass in den seneszenten Hyphen bereits alle zellulären Strukturen und Kompartimente zusammengebrochen sind und dies die gleichmäßige Verteilung des eGFP bedingt, wurden die Mitochondrien spezifisch mit dem Farbstoff „MitoTracker® red CMXRos“ angefärbt (Abb. 23). Auf diese Weise konnten zum einen die Ergebnisse der biochemischen Analyse (Western Blot Analyse) zur korrekten Funktionalität der verwendeten MTS durch Co-Lokalisierung des grünen und des roten Fluoreszenzsignals bestätigt werden. Zum anderen sind auch in seneszenten Stämmen sehr wohl Mitochondrien mit intaktem Membranpotential – die Aufnahme von „MitoTracker® red CMXRos“ ist abhängig vom Membranpotential zwischen Matrix und Intermembranraum – nachzuweisen. Deren Morphologie verändert sich von länglich tubulär in mittel-alten hin zu kugelig und fragmentiert in alten Kulturen, eine für *P. anserina* typische und charakteristische Veränderung (Scheckhuber *et al.* 2007). Die untersuchten Pilzkulturen zeigen somit neben den augenfälligen Seneszenzmerkmalen auch diesen molekularen Marker.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es offenbar im Alter zu einer nicht länger nur auf die Mitochondrien beschränkten Verteilung des nach der Translation ausschließlich in eben diese Organellen gebrachten eGFPs kommt.

Ergebnisse

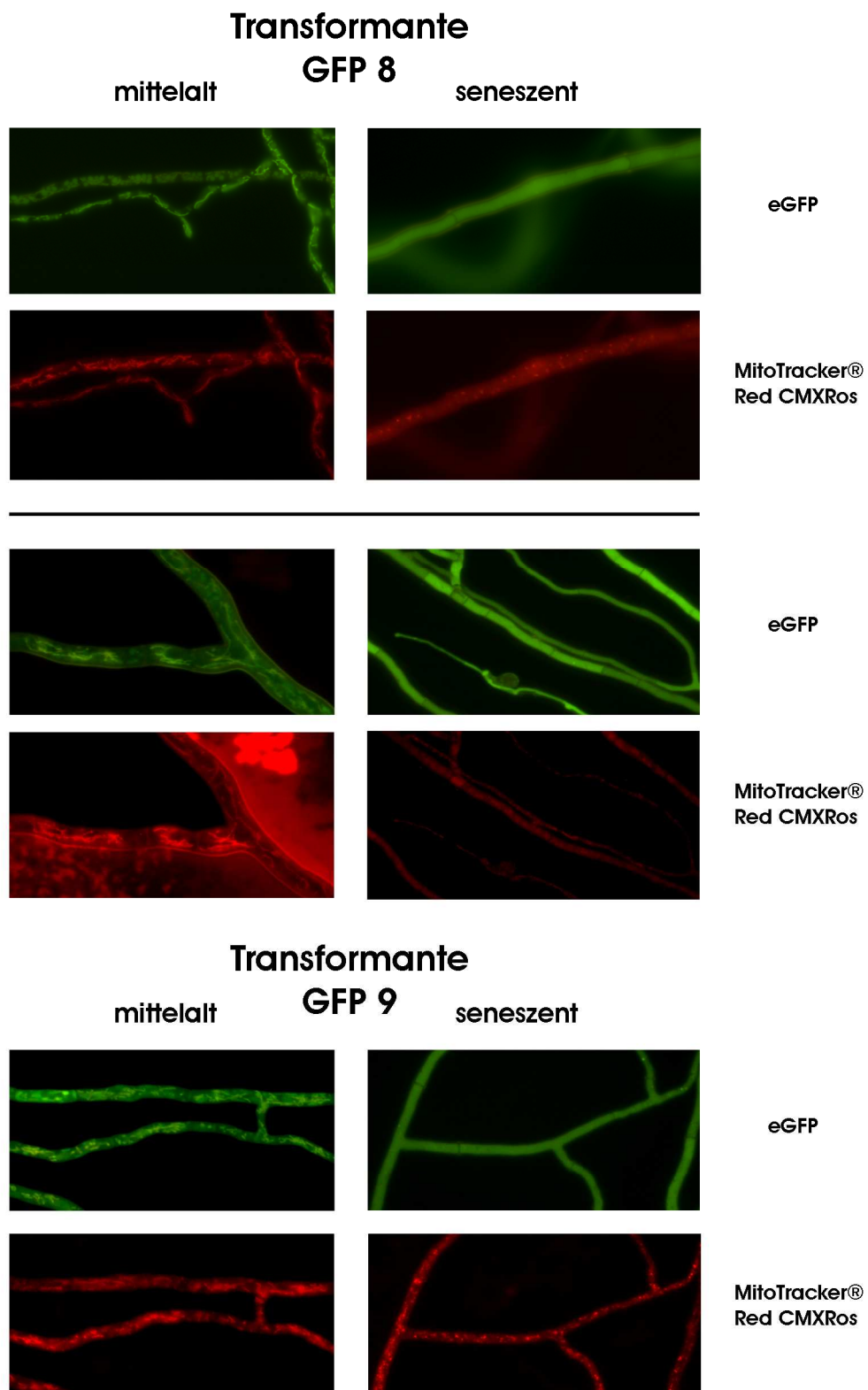


Abb. 23: Bestandteile der mitochondrialen Matrix finden sich im Alter in der gesamten Zelle wieder. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mittelalten (links) und seneszenten (rechts) Kulturen von *P. anserina*, die eGFP überexprimieren und in die mitochondriale Matrix eintransportieren. Mitochondrien wurden spezifisch mit dem Farbstoff „MitoTracker® red

Ergebnisse

CMXRos“ angefärbt. Im mittelalten Stadium kommt es zu einer sehr guten Co-Lokalisierung von eGFP- und MitoTracker-Signal (grün bzw. rot). In seneszenten Pilzen ist jedoch das eGFP homogen innerhalb der ganzen Zelle verteilt, wohingegen durch MitoTracker weiterhin kugelige, fragmentierte Mitochondrien nachweisbar sind. Somit scheint eGFP und damit auch andere Bestandteile der mitochondrialen Matrix (u.a. des sich dort befindlichen Kupfers) im Alter aus den Mitochondrien entlassen zu werden.

Es sind je zwei Aufnahmen pro Alter der Primärtransformante GFP 8 und je eine Aufnahme pro Alter der Primärtransformante GFP 9 dargestellt.

Die Bilder wurden unter insgesamt 1000-facher Vergrößerung aufgenommen. Anzuchtbedingungen, Anregungswellenlängen und Filter siehe Material & Methoden 2.3.1.4

Die mikroskopische Analyse lässt zwei Möglichkeiten als Ursache, warum eGFP in seneszenten Pilzen nicht länger nur auf die Mitochondrien beschränkt ist, zu: Der postulierte Ausstoß von Matrix-Inhalten aber auch ein veränderter Eintransport. Zur Klärung dieser Frage wurden Western Blot Analysen fraktionierter Zellbestandteile (Mitochondrien und Cytosol) mit α -eGFP-Antikörper durchgeführt. Diese bestätigten an erster Stelle die mikroskopischen Befunde einer Veränderung der Lokalisierung von strikt mitochondrial zu mitochondrial und cytoplasmatisch in seneszenten Kulturen (Abb. 24). Sie erbrachten aber auch den Nachweis, dass das im Cytoplasma von alten Proben detektierbare eGFP in den Mitochondrien sich befunden haben muss. Denn es sind zwei Banden nachweisbar, eine größere, die unprozessiertes eGFP + MTS repräsentiert und eine kleinere Bande von eGFP, von dem die MTS abgespalten wurde. Der Größenunterschied entspricht genau den 4 kDa des MTS-Peptids. Das Vorhandensein der kleineren prozessierten Form zeigt deutlich, dass diese Proteine korrekt in die Mitochondrien eintransportiert wurden, da nur dort die Abspaltung der MTS erfolgt. Sie sind offenbar erst im Nachhinein in das Cytoplasma entlassen worden. Das Vorkommen des Präproteins (eGFP+MTS) im Cytoplasma in alten Proben kann entweder von nicht erfolgtem Import, aber auch von nicht erfolgtem Abspalten der MTS nach erfolgreichem Import herrühren.

Ergebnisse

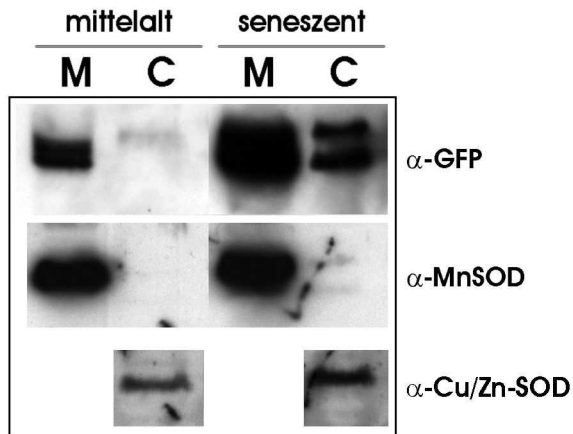


Abb. 24: Western Blot Analysen bestätigen die Ergebnisse der mikroskopischen Aufnahmen. Das eGFP kann in seneszenten Pilzen auch im Cytoplasma nachgewiesen werden. Mittelalte und seneszente Kulturen der Primärtransformante GFP 8 wurden mittels differentieller Zentrifugation fraktioniert. Je 75 µg mitochondriale (M) und 50 µg cytoplasmatische (C) Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis von eGFP erfolgte mit einem α-eGFP-Antikörper. Zur Kontrolle gleicher Beladung und zur Identifizierung der mitochondrialen bzw.

cytoplasmatischen Fraktion wurde die gleiche Membran mit Antikörpern gegen die MnSOD (Mitochondrien-Marker - mittlere Spalte) und Cu/Zn-SOD (Cytoplasma-Marker – untere Spalte) inkubiert.

Die Western Blot Analysen zeigen noch eine weitere wichtige Tatsache auf. Dadurch, dass sich die als Marker für die mitochondriale Matrix verwendete MnSOD unabhängig vom Alter stets ausschließlich in den Mitochondrien nachweisen lässt, wird deutlich, dass die Freisetzung des eGFPs im Alter in das Cytoplasma nicht durch einen unkontrollierten Zusammenbruch der Mitochondrien verursacht wird. Denn sollte dies der Fall sein, so sollte auch die MnSOD im Cytoplasma seneszenter Pilzkulturen vorkommen. Zwar unterscheiden sich die Molekulargewichte der beiden Proteine (eGFP 27 kDa – MnSOD 23 kDa) kaum, aber *in vivo* besteht die MnSOD aus einem funktionalen Tetramer (~80 kDa). Folglich handelt es sich offenbar um einen größenregulierten, kontrollierten Prozess. In verschiedenen Modellorganismen wurde ein derartiger Prozess als MPT („mitochondrial permeability transition“ – engl. „Veränderung der mitochondrialen Permeabilität“) beschrieben (zusammengefasst in Halestrap *et al.* 2002; Crompton 2004; Armstrong 2006; Bernardi *et al.* 2006), der als einer der frühesten Schritte im apoptotischen aber auch nekrotischen Zelltod abläuft. Da auch in *P. anserina* erste Hinweise auf eine wichtige Rolle der Apoptose bei der Seneszenz erarbeitet werden konnten (Hamann *et al.* 2005, Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht), stellt dieser Befund eine sehr attraktive Grundlage für weiterführende Arbeiten, die über die Erforschung der Rolle des Kupfers hinausgehen, dar.

Ergebnisse

Zusammengenommen liefern die Ergebnisse der direkten Kupfermessung mittels TXRF und den Experimenten mit in die mitochondriale Matrix transportiertem eGFP deutliche Unterstützung für die Hypothese, dass in *P. anserina* im Alter Kupfer aus der Matrix der Mitochondrien in das Cytosol ausgestoßen wird.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere Charakterisierung des molekularen Kupferstoffwechsels in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. In diesem Pilz, einem Modellorganismus der Alterungsforschung, konnte bereits mehrfach ein Zusammenhang zwischen dem Kupfermetabolismus und der Kontrolle der Lebensspanne gezeigt werden (Osiewacz und Nuber 1996; Averbeck et al 2001; Borghouts et al. 2001; Borghouts et al. 2002 A; Borghouts et al. 2002 B). Somit führen die in diesem System erhobenen Ergebnisse zu Erkenntnissen, die über die reine Detailaufklärung der molekularen Mechanismen hinausgehen, für die andere Systeme (v. a. die Bäckerhefe *S. cerevisiae*) besser geeignet sind.

Kupfer scheint auf zwei Wegen die Lebensspanne zu beeinflussen: 1. durch die Verfügbarkeit an Kupfer wird beeinflusst, welche Endoxidase in der mitochondrialen Atmungskette verwendet wird (Prillinger und Esser 1977; Borghouts und Osiewacz 1998; Stumpferl et al. 2004).

Eine beim Ausfall der COX induzierte alternative Oxidase (AOX) führt, wahrscheinlich über die Verringerung der Menge an entstehenden ROS (Dufour et al. 2000; Lorin et al. 2001; Gredilla et al. 2006; Sellem et al. 2006), zur Verlängerung der Lebensspanne. Das Vorhandensein von Standard- und alternativen Wegen der Atmung in den Mitochondrien (v.a. COX und AOX – Gredilla et al. 2006) ist ein weiterer Vorteil des Systems *P. anserina* bei Untersuchungen bzgl. der mitochondrialen Respiration. So sind hier nicht nur „alles-oder-nichts“-Antworten auf Eingriffe in die Atmung – wie z.B. in Hefe oder menschlichen Zellen – möglich, sondern vielmehr auch abgestufte Veränderungen, die es erlauben, ein detaillierteres Bild zu erstellen.

2. scheint es aber auch einen direkten Einfluss des Kupfers zu geben, da mehrere Hinweise für eine weit reichende Veränderung in der intrazellulären Verteilung von Kupfer während des Alterungsprozesses, insbesondere hinsichtlich eines Anstiegs der cytoplasmatischen Kupferkonzentration, gesammelt werden konnten (Averbeck et al. 2001; Borghouts et al. 2001; Borghouts et al. 2002 A).

Beide Themenkomplexe wurden mit den hier durchgeführten Experimenten bearbeitet.

Diskussion

4.1 Der Transport von Kupfer zur Cytochrome c Oxidase

Die Analyse der langlebigen Mutante *grisea* erbrachte die ersten Hinweise auf die Beziehung zwischen Kupferstoffwechsel und Lebensspanne in *P. anserina* (Prillinger and Esser 1977; Osiewacz and Nuber 1996; Borghouts and Osiewacz 1998). Ursächlich für den Phänotyp von *grisea* ist der Verlust des Hochaffinitäts-Kupfertransporters PaCTR3, was zu einem generellen zellulären Kupferdefizit führt (Borghouts *et al.* 2002 A). Dadurch wird die Aktivität der COX verringert, das Verhältnis zwischen COX- und AOX-Atmung verändert sich von ca. 75% : 25% im Wildtyp hin zu 30% : 70% (Gredilla *et al.* 2006) in *grisea*. Die Menge an in den Mitochondrien produzierten ROS wird in *grisea* auf ~20% des Wildtypwertes herabgesetzt (Gredilla *et al.* 2006). Die Mutante *grisea* hat gegenüber dem Wildstamm eine um ~60% verlängerte Lebensspanne.

Ein Grund für die vergleichsweise geringe Lebensspannenverlängerung könnte darin liegen, dass weitere wichtige Enzyme neben der COX durch das generelle Kupferdefizit in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden (z.B. Cu/Zn-SOD) (Borghouts *et al.* 2002 B). Zur näheren Charakterisierung des Einflusses der COX/AOX-Atmung auf die Lebensspanne wurde versucht, speziell die Kupferversorgung der COX zu unterbrechen. Dies ist sehr spezifisch möglich, da der Transport von Kupfer zu den Zielmolekülen stets proteinvermittelt erfolgt. In *S. cerevisiae* konnten insgesamt fünf Proteine identifiziert werden, die direkt am Transportweg von Kupfer zur COX beteiligt sind: COX23, COX17, SCO1, SCO2 und COX11. Durch Deletion des durch Komplementation einer entsprechenden Hefe-Deletionsmutante identifizierten Gens *PaCox17* wurde die Funktion der COX vollständig ausgeschaltet (Stumpferl *et al.* 2004, S. Stumpferl 2005), was zu einer drastischen Verlängerung der Lebensspanne (+1250%) führt. Eine Konservierung des Transportmechanismus' vorausgesetzt, so sollten auch für die vier anderen Proteine Homologe in *P. anserina* zu finden sein.

Für PaCOX23 und PaSCO1 war dies relativ einfach mittels *in silico* Suche bzw. heterologer Hybridisierung möglich. (*PaSco1* wurde bereits durch Arbeiten von Stefan Stumpferl identifiziert – S. Stumpferl 2005)

Für PaCOX11 bedurfte es eines 5' RACE-Experiments, um die korrekte Sequenz des N-terminalen Endes des Proteins unter den drei *in silico* vorhergesagten herauszufinden. Dabei besitzt das computerbasiert, im Rahmen der Annotierung aller

Diskussion

exprimierten Gene von *P. anserina* vorhergesagte Protein (Pa_3_6850) einen um 90 Aminosäuren längeren N-Terminus. Jedoch sprechen Homologievergleich und auch *in silico*-Vorhersage von MTS und Transmembran-Domäne eindeutig für das hier manuell abgeleitete Protein. Die experimentelle Bestätigung des exakten C-Terminus steht noch aus, auch hier sind nach *in silico* Analyse mehr als eine Variante denkbar.

Für das SCO2-Protein anderer Systeme (v.a. Hefe und Mensch) konnte allerdings kein Sequenzhomolog in *P. anserina* gefunden werden, weder mittels computerbasierter Suche in der veröffentlichten Genomsequenz noch in der Gesamtheit der computer-annotierten Proteine von *P. anserina*. Die in dieser Arbeit und auch von S. Stumpferl durchgeführten Southern Blot Analysen (S. Stumpferl 2005) lassen ebenfalls nur den Schluss zu, dass es nur *PaSco1* gibt. Auch wenn in keinem anderen Modellsystem die definierte Rolle beider SCO-Proteine hinreichend aufgeklärt ist, so stellt das Vorhandensein nur eines SCO-Proteins ein Alleinstellungsmerkmal von *P. anserina* dar.

In Hefe geht man davon aus, dass SCO1 und SCO2 sich in ihrer Funktion überlappen und gegenseitig unterstützen (Glerum *et al.* 1996A). Im Gegensatz dazu sind die beiden menschlichen Isoformen (SCO1 und SCO2) in ihrer Funktion vollständig getrennt und von der jeweiligen anderen Form unabhängig (Leary *et al.* 2004).

Dies ist vor allem hinsichtlich der in letzter Zeit gefundenen Funktionen dieser beiden Proteine, die über die Versorgung der COX mit Kupfer hinausgehen, bemerkenswert. So konnte für die beiden menschlichen SCO-Proteine gezeigt werden, dass sie über eine Regulation des Efflux' einen Einfluss auf den Gesamtkupferspiegel in der Zelle haben (Leary *et al.* 2007). SCO1 in Hefe scheint weiterhin (ebenso wie COX11) eine gewisse Chaperon-Funktion für die Stabilisierung von Zwischenstufen während der Assemblierung des COX-Holoenzym unabhängig von der Kupferübertragungsfunktion zu besitzen (Khalimonchuk *et al.* 2007). Ein Verlust dieser Funktion erhöht die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid (Williams *et al.* 2005; Banting and Glerum 2006; Khalimonchuk *et al.* 2007). Interessanterweise geht man davon aus, dass es sich bei den beiden SCO-Proteinen in Hefe und Mensch um jeweils paraloge, nicht orthologe Proteine handelt; sie gehen also auf eine jeweils unabhängige Verdopplung und nicht auf zwei gemeinsame Urformen zurück (Papadopoulou *et al.* 1999; Leary *et al.* 2004). Diese Verdopplung scheint bei *P. anserina* ausgeblieben zu sein. Auch bei dem sehr nahe

Diskussion

verwandten Pilz, *Neurospora crassa*, ist nur ein SCO-Protein im Genom bzw. der Gesamtheit der vorhergesagten Proteine zu finden. Es bleibt die Frage zu klären, ob PaSCO1 die Funktionen beider SCO-Proteine übernimmt, oder ob anstelle einer Verdopplung ein anderes Protein, das in seiner Sequenz nicht ähnlich zu PaSCO1 ist, die Funktion des zweiten SCO-Proteins übernommen hat.

Da es im Rahmen dieser Arbeit trotz vielfacher Versuche auch mit unterschiedlichen Methoden nicht möglich war, *PaSco1* im Genom von *P. anserina* zu deletieren, deutet dies auf zusätzliche Funktionen von PaSCO1 hin. Es ist anzunehmen, dass diese Funktionen nicht nur für die Ausbildung einer funktionellen COX essentiell sind. Denn ein Verlust der COX-Aktivität allein ist für *P. anserina* nicht letal, da sie eine alternative Oxidase besitzt, die für die Energiegewinnung verwendet werden kann (Dufour *et al.* 2000; Borghouts *et al.* 2001; Lorin *et al.* 2001; Stumpferl *et al.* 2004; Gredilla *et al.* 2006). So konnte erfolgreich *PaCox17* deletiert werden, was zum vollständigen Verlust der COX-Aktivität führt (Stumpferl *et al.* 2004, S. Stumpferl 2005), auch wenn dies nur nach der Überprüfung einer großen Anzahl an Primärtransformanten (649) und nur über die Zwischenstufe eines Heterokaryons (d.h. eine Primärtransformante mit zwei Kernen, wovon nur einer die Deletion trägt) möglich war. Für *PaSco1* – wie auch für *PaCox23* (s.u.) - konnte jedoch keine Transformante erzeugt werden, die das Gen nicht mehr trägt.

Mit der im Arbeitskreis neu etablierten Deletions-Methode, die Cosmide mit großen den auszuschaltenden Leserahmen flankierenden Bereichen nutzt, konnten bereits mehrere Gene ausgeschaltet werden und für die Identifizierung dieser Deletionsstämme reichte bereits eine geringe Anzahl von Primärtransformanten aus (Hamann *et al.* 2005). Sie führte jedoch hier trotz der Analyse von 58 bzw. 35 Phleomycin-resistenten, Hygromycin-sensitiven Primärtransformanten für *PaSco1* bzw. *PaCox23* nicht zum Erfolg.

Weiterführende Arbeiten, z.B. im genetischen Hintergrund einer Mutante mit einer ektopisch integrierten zusätzlichen Genkopie, könnten den Nachweis bringen, dass die Deletion in *P. anserina* tatsächlich letal ist bzw. die erwünschte Deletionsmutante generieren. Diese Versuche konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden.

Dabei wird zuerst das auszuschaltende Gen als cDNA auf einem Überexpressionsplasmid in den Wildstamm gebracht. Mittels der Austausch-Cosmide kann das Endogen deletiert werden. Ist anschließend durch Kreuzung mit einem

Diskussion

Wildstamm die Trennung von Überexpressionsplasmid und den Leserahmen ersetzender Resistenz möglich, hat man das Ziel „Deletion“ erreicht, andernfalls ist der Nachweis der Letalität erbracht. Die Verwendung von cDNA für die Überexpression erleichtert die Identifikation von falsch-positiven Transformanten mittels PCR.

Dass es funktionelle Unterschiede zwischen PaSCO1 und dem SCO1 aus *S. cerevisiae* gibt, wird auch dadurch nahe gelegt, dass es nicht möglich war, einen $\Delta sco1$ -Hefestamm durch Überexpression von *PaSco1* zum Wildtyp zu revertieren. Gleiches gilt auch für die beiden menschlichen SCO-Isoformen, wo nur ein Fusionsprotein aus N-terminalem Hefe- und C-terminalem menschlichen Anteil in der Lage ist, bei einem $\Delta sco1$ -Hefestamm die Atmungskompetenz wiederherzustellen (Paret *et al.* 1999; Paret *et al.* 2000). Allerdings kann das menschliche SCO1 den Phänotyp der Überempfindlichkeit gegenüber H_2O_2 der Hefemutante beseitigen (Khalimonchuk *et al.* 2007). Diese antioxidative Funktion von SCO1 scheint somit unabhängig und zudem besser konserviert zu sein als die Funktion als Kupferchaperon. Die Durchführung dieser Komplementationsversuche mit *PaSco1* wird zeigen, ob auch PaSCO1 eine Peroxidase-Funktion besitzt, und somit weiter Aufschluss über die genaue Rolle dieses Proteins im mitochondrialen Stoffwechsel geben. Auch wenn die SCO-Proteine in verschiedenen Organismen sehr ähnliche Sequenzen aufweisen und prinzipiell die gleiche Funktion erfüllen, so scheint es doch sehr spezifische Unterschiede im Detail zu geben.

Auch für *PaCox23*, ein weiteres Gen, das in Hefe als an der Kupferversorgung der COX beteiligt identifiziert wurde (Barros *et al.* 2004), war keine Deletion – auch nicht nach dem sehr effizienten Zwei-Schritt-System (Hamann *et al.* 2005) – möglich. Der Grund hierfür mag darin liegen, dass wie PaSCO1 auch PaCOX23 eine über die Funktion des Kupfertransports zur COX hinausgehende Funktion erfüllt. Denkbar hierbei wäre, dass PaCOX23 das Kupferchaperon ist, das Kupfer aus dem Cytoplasma in die mitochondriale Matrix transportiert. Das sich dort befindliche Reservoir an Kupfer scheint als Quelle für das Kupfer, das in der COX eingebaut ist, zu dienen (K. Jezek 2005; Cobine *et al.* 2006). Da auch in *S. cerevisiae* die Rolle von COX23 noch kaum weiter bekannt ist, als dass es wohl stromaufwärts von COX17 agiert und eine Deletion zum Verlust der mitochondrialen Respiration führt (Barros *et*

Diskussion

a/ 2004), müssen weitere Experimente die genaue Rolle von COX23 (und PaCOX23) aufklären, um somit ggf. die Letalität des Verlust des Gens in *P. anserina* zu erklären.

Für beide Gene – *PaSco1* und *PaCox23* – ist auch möglich, dass das Nichtgelingen eines funktionalen „Knock-outs“ nicht in der Funktion des jeweiligen Proteins *per se* bedingt ist, sondern vielmehr in der Position der entsprechenden Gene auf dem Chromosom (z.B. sehr nach am Centromer). Aufgrund der oben genannten Argumente bzgl. der multiplen Funktionen des Proteins ist dies jedoch zumindest für *PaSco1* eher unwahrscheinlich.

Allen drei in dieser Arbeit neu identifizierten Proteinen (PaCOX23, PaSCO1 und PaCOX11) wurde ihre Funktion aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu den entsprechenden Hefeproteinen zugewiesen. Die Identifizierung von Proteindomänen wie z.B. der MTS oder der Transmembrandomänen erfolgte ausschließlich *in silico*. Zwar konnte eine experimentelle Bestätigung dieser vorhergesagten Funktion bislang nicht erfolgen, jedoch weisen Transkriptanalysen von Mutanten mit Störungen im Kupferhaushalt (*grisea* und Δ PaCox17) darauf hin, dass die genannten drei Proteine tatsächlich im gleichen Stoffwechselweg, d.h. in der Versorgung der COX mit Kupfer, wie PaCOX17 beteiligt sind. Fehlt Kupfer der Zelle im Allgemeinen (*grisea*) oder nur speziell im Transportweg zur COX (Δ PaCox17) so wird die Transkription aller drei entsprechenden Gene hochreguliert. Die Zelle scheint auf das Ausbleiben (*PaCox11* und *PaSco1*, deren Genprodukt stromabwärts von PaCOX17 benötigt wird) bzw. den Anstau (PaCOX23 ist der putative Kupferdonor für PaCOX17) von Kupfer durch Erhöhung der Transkriptmenge für diese drei putativen Kupferchaperone zu reagieren. So wird versucht, Schaden durch Ausfall der COX (*PaSco1* bzw. *PaCox11*) bzw. durch Anhäufung von ungebundenem Kupfer (das im Falle von *PaCox23* nicht weitergegeben werden kann) zu vermeiden. Nicht nur bei Störungen des Kupferhaushalts sondern auch im Alter verhalten sich alle vier putativ am Kupfertransportweg zur COX beteiligten Gene gleich: die Menge an Transkript sinkt deutlich ab. Dies korreliert direkt mit Abnahme der Transkriptmenge für die COX-Untereinheit I (Albert and Sellem 2002) und auch der enzymatischen Aktivität der COX (B. Kunstmann 2004). Ursächlich für die Abnahme an *CoxI*-Transkript ist die Amplifikation von pDNA in seneszenten Pilzkulturen (Cummings *et al.* 1979; Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984; Cummings *et al.* 1985). Mit dem Verlust der

Diskussion

strukturellen Untereinheit werden auch die für die Assemblierung des Holoenzym assoziierten Faktoren herunterreguliert.

Die Regulation der vorhandenen Menge an Kupferchaperonen scheint jedoch nicht nur auf Ebene der Transkription zu erfolgen. Es konnten Hinweise erarbeitet werden, die auf eine post-transkriptionelle bzw. translationelle Kontrolle hindeuten.

Diese Art der Regulation erlaubt eine feiner abgestimmte, aber auch schnellere Anpassung der Proteinmengen. Häufig verläuft der Mechanismus der Regulation darüber, dass die Stabilität der mRNA verändert wird (zusammengefasst in Gray und Wickens 1998; MacDonald 2001; Wilkie *et al.* 2003). Hierbei ist meist der erste Schritt des Abbaus der mRNA das Entfernen des Poly(A)-Schwanzes, woraufhin die sog. „Cap“ am 5' Ende entfernt wird und die mRNA degradiert wird (zusammengefasst in Beelman und Parker 1995; Meyer *et al.* 2004; Parker und Song 2004; Newbury 2006).

Für *PaCox11* konnte gezeigt werden, dass im Alter nur die Menge an intakter *PaCox11*-mRNA, die einen Poly(A)-Schwanz besitzt, abnimmt. Schließen lässt sich dies aus den Ergebnissen der durchgeführten RT-PCR-Experimente. Verwendet man für die cDNA-Synthese ein Oligonukleotid, das an den Poly(A)-Schwanz aller mRNAs bindet (oligo-(dT)-Primer) so weist man in seneszenten Proben deutlich weniger mRNA nach, verglichen mit juvenilen Proben. Verwendet man für die cDNA-Synthese jedoch ein Oligonukleotid, das spezifisch im 3' Bereich der *PaCox11*-mRNA bindet, so ist kein Unterschied zwischen den beiden Altersstufen feststellbar. In Northern Blot Analysen steigt sogar die Stärke des Signals in alten Pilzproben deutlich an. Da sich dieses Ergebnis aber nicht in einer „Standard“-RT-PCR mit oligo-(dT)-Primern reproduzieren lässt, scheint das starke Signal in seneszenten Stämmen von *PaCox11*-mRNA ohne Poly(A)-Schwanz herzurühren, also von einer nicht translatierbaren und wahrscheinlich durch Abspaltung des Poly(A)-Schwanzes für die Degradierung vorbereiteten Spezies an *PaCox11*-mRNA. Für *PaSco1* deuten sich ähnliche Ergebnisse an. Interessanterweise konnte in *S. cerevisiae* die mRNA von *Cox17* als Ziel eines Proteins (PUF3) identifiziert werden, dass eben diese Rate der De-Polyadenylierung reguliert (Olivas und Parker 2000; Jackson *et al.* 2004). Auch das Chaperon CCS1, das Kupfer zur Cu/Zn-SOD liefert, in menschlichen Zellen und der Hochaffinitäts-Kupfertransporter CTR1 in der Plasmamembran von Hefe unterliegen einer kupferabhängigen Proteindegradierung (Ooi *et al.* 1996; Petris *et al.* 2003; Caruano-Yzermans *et al.* 2006). Post-transkriptionelle Regulation scheint somit auch

Diskussion

bei der Regulation der Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase eine gewichtige Rolle zu spielen. In *S. cerevisiae* wird die Eisenaufnahme ebenfalls nicht nur auf Transkript- sondern auch auf Protein-Ebene reguliert (Felice *et al.* 2005).

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transkriptanalysen sprechen gegen eine Beteiligung von Kupfer-regulierten Transkriptionsfaktoren (PaGRISEA und das putative PaACE1 als Kupfer-reprimiert bzw. –aktiviert). In der Δ PaCox17-Mutante kommt es durch das Unterbrechen des Transportwegs zu einem Rückstau und somit Konzentrationsanstieg von Kupfer im Cytoplasma (Stumpferl *et al.* 2004; S. Stumpferl 2005). Auch in seneszenten Pilzstämmen steigt die Konzentration an Kupfer im Cytoplasma deutlich an (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 B; diese Arbeit – s.u.). Die Transkriptmengen der vier putativ am mitochondrialen Kupferstoffwechsel beteiligten Gene verhält sich jedoch in beiden Fällen nicht gleich; vielmehr steigen die mRNA-Spiegel von *PaCox23*, *PaSco1* und *PaCox11* in der Δ PaCox17-Mutante stark an, im Alter hingegen fallen sie – wie auch der von *PaCox17* – deutlich ab.

Ein weiteres Argument für eine post-transkriptionelle Regulation der Proteinmengen der für die Kupferversorgung und/oder Assemblierung der COX essentiellen Faktoren ist die für COX11 und SCO1 neu gefundene Rolle im Schutz gegen die Anhäufung von pro-oxidativen Zwischenprodukten in der Assemblierung der COX hinzu (Khalimonchuk *et al.* 2007), bei der eine schnelle Anpassung der Proteinmenge, wie sie durch Regulation der Translation der mRNA geschehen kann, sehr vorteilhaft ist. Sollten die beteiligten Proteine auch im gewissen Umfang als Puffer für überschüssiges Kupfer dienen (z.B. PaCOX23 in Δ PaCox17), so ist auch dafür eine translationelle Kontrolle schneller und flexibler als eine rein transkriptionelle.

Zusammengenommen können die hier präsentierten initialen Versuche den Grundstein legen für die Untersuchung der offensichtlich sehr komplexen Vorgänge bei der Regulation der Versorgung der COX mit Kupfer, dem mitochondrialen Kupferstoffwechsel im allgemeinen und dessen Implikation in Alterungsprozesse. Das Vorhandensein von nur einem SCO-Protein stellt dabei ein deutliches Alleinstellungsmerkmal von *P. anserina* gegenüber anderen Modellsystemen dar.

Diskussion

4.2 Komponenten der zellulären Kupferhomöostase

Die Veröffentlichung der Sequenz des Genoms von *P. anserina* durch das „*Podospora anserina* Genome Project“ französischer und niederländischer Arbeitsgruppen (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/index.html>) stellte eine deutliche Vereinfachung für die Charakterisierung molekularer Prozesse in diesem Hyphenpilz dar. So lassen sich per *in silico* Analyse mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.* 1997) Homologe zu Proteinen suchen, für die aus anderen Organismen eine bestimmte Funktion bekannt ist. Bereits für mehrere Beispiele war diese Herangehensweise erfolgreich (z.B. Komponenten der Apoptosemaschinerie – Hamann *et al.* 2005; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht; alternative NADH-Dehydrogenasen in der mitochondrialen Atmungskette – Gredilla *et al.* 2006). Diesem ersten Schritt in der Untersuchung bestimmter Mechanismen muss sich eine detaillierte experimentelle Analyse anschließen, um nachzuweisen, dass das in *P. anserina* gefundene Protein ähnlicher Sequenz tatsächlich exprimiert (d.h. mRNA nachweisbar ist) wird und auch in seiner Funktion dem Gesuchten entspricht. Der Einstieg in einen Stoffwechselweg wird – sofern die Suche erfolgreich ist – sehr erleichtert. Nachteil dieser Herangehensweise ist die Gefahr, dass Orthologe – d.h. Proteine die die gleiche Funktion besitzen, ohne gleichzeitig die gleiche bzw. eine sehr ähnliche Sequenz aufzuweisen, nicht gefunden werden können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Genom von *P. anserina* nach homologen Sequenzen von Proteinen durchsucht, die Ähnlichkeit zu Proteinsequenzen aufweisen, die in anderen Modellorganismen – v.a. *S. cerevisiae* – als mit dem Kupferstoffwechsel assoziiert bekannt sind. Diese Bestandsaufnahme ist die Grundvoraussetzung, um fundierte Aussagen über die molekulare Maschinerie der Kupferhomöostase und deren Regulierung und Veränderungen im Laufe der Lebensspanne zu machen. Umso mehr Komponenten man kennt, umso detailreicher wird das Bild, das entsteht. Auch in *S. cerevisiae* ist das Bild des Kupferstoffwechsels noch nicht komplett; so ist bislang z.B. der Transporter und –mechanismus, der Kupfer in das Kupfer-Reservoir der mitochondrialen Matrix bringt, unbekannt (Cobine *et al.* 2004; Cobine *et al.* 2006 B). Dennoch ist *S. cerevisiae* der bestuntersuchte Modellorganismus bezüglich der molekularen Kupferhomöostase. Dies und die Tatsache, dass *P. anserina* zu *S. cerevisiae* näher verwandt ist als zu anderen

Diskussion

Modellsystemen (z.B. Säuger), macht die Bäckerhefe zum besten Bezugspunkt für die Suche nach den Komponenten des Kupferstoffwechsels in *P. anserina*.

Bis auf zwei Ausnahmen konnte zu allen bislang in Hefe bekannten Kupfer-assoziierten Proteinen Homologe in *P. anserina* gefunden werden. In *P. anserina* scheint es nur je eine Isoform eines Nieder- und eines Hochaffinitätskupfertransporters (PaSMF1 bzw. PaCTR3) und nur eine Isoform des Kupferchaperones PaSCO1 (s.o.) zu geben. Alle anderen Schlüsselkomponenten des offensichtlich hoch-konservierten Systems aus der Bäckerhefe scheinen somit auch in *P. anserina* vorhanden zu sein. Nicht auszuschließen bleibt, dass die Aufgabe der jeweiligen zweiten Isoform in *S. cerevisiae* in *P. anserina* von orthologen Proteinen übernommen wird. Ein Beispiel dafür, dass sich im Laufe der Evolution Detailmechanismen für die molekulare Kupferhomöostase unterschiedlich entwickelt haben, ist die direkte Kontrolle der Transkription durch Kupfer. In *S. cerevisiae*, *P. anserina* und wahrscheinlich auch Pflanzen (Osiewacz und Nuber 1996; Borghouts *et al.* 2002 B; Rutherford und Bird 2004; Keller *et al.* 2005; Balamuragan und Schaffner 2006) gibt es je einen Transkriptionsfaktor, der durch Kupfer reprimiert bzw. aktiviert wird. Von Insekten bis hinzu zu Säugern ist bislang nur ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivität durch Kupfer moduliert wird, bekannt (MTF-1; Balamuragan und Schaffner 2006).

Zumindest in *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, dass jedoch dieser eine Transkriptionsfaktor auf beide Zustände - zu viel bzw. zu wenig Kupfer - reagiert (Selvaraj *et al.* 2005) und die Transkription der entsprechenden Gene kontrolliert.

Die beiden Kupfertransporter PaCTR2 und PaCTR3 und das Kupferchaperon PaCOX17 waren bereits als Homologe zu den entsprechenden Hefeproteinen bekannt und publiziert (Borghouts *et al.* 2002 B; Stumpferl *et al.* 2004). PaMT1 und GRISEA sind als Orthologe der Metallothioneine CRS5 und CUP1 bzw. des Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktors MAC1 aus *S. cerevisiae* bereits beschrieben (Osiewacz und Nuber 1996; Averbeck *et al.* 2001). Bei den Metallothioneinen ist auffällig, dass auch hier zwei Hefe-Proteinen nur ein Protein in *P. anserina* gegenübersteht.

Neben den vier oben beschriebenen Kupferchaperonen, die für den Transport von Kupfer zur COX verantwortlich zu sein scheinen, konnten auch die Chaperone identifiziert werden, die Kupfer zu zwei anderen sehr wichtigen Cupro-Enzymen in der Zelle transportieren und dort dessen Einbau bewerkstelligen: PaATX1 ist der

Diskussion

Homologie nach zu urteilen verantwortlich für den Transport von Kupfer zum post-Golgi-Netzwerk, wo Kupfer über PaCCC2 (s.u.) eintransportiert wird und dort in die Eisenoxidase PaFET3 eingebaut wird (Lin *et al.* 1997). PaCCS1 zeigt große Sequenzähnlichkeiten zu dem Kupferchaperon, das Kupfer zur Cu/Zn-SOD transportiert (Culotta *et al.* 1997). CCS1 wurde ursprünglich im Biosyntheseweg für die Aminosäure Lysin identifiziert, das kodierende Gen heißt *Lys7* (Horecka *et al.* 1995). Die Hefe-Isoform der Cu/Zn-SOD ist strikt abhängig von CCS1 für die Kupferversorgung, wohingegen diese im menschlichen Protein unabhängig von CCS1 über Glutathion erfolgen kann. Verantwortlich für diese Un-/Abhängigkeit scheinen zwei Prolin-Seitenketten nahe dem C-Terminus zu sein (Carroll *et al.* 2004): während in *S. cerevisiae* sich an den Positionen 142 und 144 je ein Prolin befindet, fehlen diese in *H. sapiens*. Interessanterweise ist in *P. anserina* eines dieser beiden konservierten Proline vorhanden (Carroll *et al.* 2004). Die Auswirkungen auf die Abhängigkeit von PaCCS1 für den Kupfereinbau sind bislang unerforscht; ein Chaperon-unabhängiger Einbau von Kupfer würde aber die Kapazität der Cu/Zn-SOD zur Pufferung überschüssigen Kupfers (Culotta *et al.* 1995) erhöhen.

Außer den erwähnten Kupfer-Chaperonen wurden durch die *in silico* Analyse drei weitere Transporter (PaCCC2, PaSMF1, PaPCA1) und ein putativer Kupfer-aktivierter Transkriptionsfaktor (PaACE1) neu identifiziert. Die beiden Transporter PaCCC2 und PaPCA1, lokalisiert in der post-Golgi-Membran bzw. Plasmamembran, könnten sich als besonders interessant herausstellen, da Homologe der beiden Proteine in menschlichen Zellen bzw. Hefe als an der Ausscheidung von überschüssigem Kupfer („Kupfer-Ventil“) beteiligt nachgewiesen werden konnten (Petris *et al.* 1996; Adle *et al.* 2007).

Alle getätigten Aussagen über Vorhandensein und Funktion der nach *in silico* Analyse identifizierten putativen Genen im Genom von *P. anserina* müssen experimentell bestätigt werden. Als erster Schritt zum Erreichen dieses Ziels wurde für ausgewählte Gene versucht, Transkripte der entsprechenden Gene nachzuweisen. Für *PaAtx1* und *PaCcs1* erfolgte dies mittels „konventioneller“ Northern Blot Analyse und RT-PCR und zeigt, dass es sich um tatsächlich transkribierte Gene handelt und die getroffenen Vorhersagen korrekt zu sein scheinen. Für die vorhergesagte Funktion muss jedoch der Beweis noch erbracht werden.

Diskussion

Als alternative Möglichkeit zum Nachweis der Transkription der vorhergesagten Gene wurde der Promotorbereich (~1,7 kb) der jeweiligen Gene genutzt, um die Expression von eGFP zu bewerkstelligen. Diese Methode wurde für *PaCcc2* und *PaCcs1* erfolgreich genutzt. Da für *PaCcs1* auch mittels Standard-Transkriptanalysen die Expression bestätigt wurde, ist dieses neu etablierte Verfahren geeignet zum Nachweis von Genexpression. Der Vorteil dieser Methode ist eindeutig darin zu sehen, dass eine Auswertung des Ergebnisses ohne jegliche präparative Eingriffe (d.h. Isolierung von Proteinen oder Gesamt-RNA) erfolgen kann. Vor allem in seneszenten Kulturen wird dadurch die Gefahr der Bildung von Artefakten und somit Verfälschung der Ergebnisse minimiert.

Würde man einen kupferinduzierbaren Promotor verwenden, so ließen sich mittels eines solchen eGFP-Reporterkonstrukts Rückschlüsse über die Kupferkonzentration im Cytoplasma ziehen, wie für andere Modellsysteme gezeigt werden konnte (Shetty *et al.* 2004; Selvaraj *et al.* 2005). Leider konnte ein derartig funktioneller Promotor in *P. anserina* bislang noch nicht kloniert werden. Da die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgt und somit keine Präparationsschritte notwendig sind, könnte der postulierte Anstieg in der cytoplasmatischen Kupferkonzentration in der Seneszenz von *P. anserina* zeitlich besser und genauer aufgelöst werden als bei den bislang verwendeten Isolierungsmethoden für seneszente Kulturen. Dort liegt aufgrund der Anzucht immer eine Mischung aus verschiedenen Altersstufen (prä-seneszent, seneszent, bereits abgestorben) vor, was eine zeitlich detaillierte Auflösung der letzten Tage der Lebensspanne von *P. anserina* sehr schwer macht und bei der Auswertung stets berücksichtigt werden muss.

Die Verwendung eines eGFP-Reporterkonstrukts ist die konsequente Weiterentwicklung der Methode, mittels welcher bislang auf die cytoplasmatische Kupferkonzentration geschlossen wurde, nämlich der Transkriptanalyse von *PaMt1* und *PaCtr3* (werden durch Kupfer induziert bzw. reprimiert – Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 B) und der Aktivitätsanalyse der Cu/Zn-SOD (Borghouts *et al.* 2001). Jedoch sind beide Methoden ein indirekter Nachweis der Kupfermenge, d.h. aufgrund anderer Parameter (Transkriptmenge, Aktivität, Fluoreszenz) wird auf die Menge an vorhandenem Kupfer geschlossen.

Diskussion

4.3 Umverteilung von Kupfer zwischen Mitochondrien und Cytoplasma in seneszenten Kulturen

Bereits seit mehreren Jahren existiert die Hypothese, dass es beim Eintritt in die Seneszenz von *P. anserina* zu einem starken Anstieg der Kupferkonzentration im Cytoplasma kommt und dass dieses Kupfer aus den Mitochondrien stammt (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A). Dafür wurden die oben erwähnten indirekten Verfahren (Transkript- und Aktivitätsanalysen) angewandt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte diese Arbeitshypothese durch zwei direkte Verfahren deutlich gestärkt werden. Zum einen konnte über eine direkte analytisch-chemische Methode (TXRF) der Kupfergehalt in Cytosol und Mitochondrien in juvenilen und seneszenten Proben bestimmt und eine Umverteilung nachgewiesen werden. Zum anderen konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer (eGFP) und biochemischer Analysen gezeigt werden, dass mitochondriale Inhalte im Alter selektiv und größenabhängig in das Cytoplasma entlassen werden. Ein derartiger Vorgang ist v.a. aus Säugersystemen unter dem Namen MPT („mitochondrial permeability transition“ – engl. „Veränderung der mitochondrialen Permeabilität“) als der erste Schritt im programmierten Zelltod bekannt (zusammengefasst in Halestrap *et al.* 2002; Crompton 2004; Armstrong 2006; Bernardi *et al.* 2006) und liefert einen weiteren deutlichen Hinweis darauf, dass Apoptose auch in der Seneszenz von *P. anserina* von Bedeutung ist, wie neuere Forschungsergebnisse (Hamann *et al.* 2005; Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht) bereits vermuten ließen. Ebendiese Veränderung in der Permeabilität der mitochondrialen Membranen stellt eine mögliche Fehlerquelle bei der verwendeten Methode zur Aufreinigung der Mitochondrien dar. Da die für die TXRF-Analysen verwendeten Mitochondrien über einen Saccharose-Gradienten fraktioniert wurden, bei dem die Proben der spezifischen Dichte nach aufgetrennt werden, ist denkbar, dass sich in der Interphase zwischen 36% und 50% Saccharose nur eine bestimmte Sub-Population von noch vollständig intakten und juvenilen Mitochondrien befindet. Das hieße, dass gerade in seneszenten Proben juvenile bzw. „noch nicht seneszente“ Mitochondrien über die Maßen angereichert werden und die seneszenten Mitochondrien, deren Membranpermeabilität sich verändert hat, nicht mehr in eben dieser Interphase bandieren und somit nicht in die Analysen mit

Diskussion

einbezogen werden. Durch den Nachweis des Biomarkers für Seneszenz „Amplifikation von pDNA“ (Kück *et al.* 1981; Osiewacz und Esser 1984; Sellem *et al.* 1993; Sainsard-Chanet *et al.* 1998) konnte jedoch zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die für die TXRF-Messungen eingesetzten Mitochondrien sehr wohl alle seneszent sind und es nicht zu einer unverhältnismäßigen Selektion auf junge Mitochondrien mit intakter mtDNA kam. Alle verwendeten Mitochondrien aus seneszenten Isolaten haben somit ein gewisses „Mindestalter“; es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die ältesten Mitochondrien, deren Morphologie (Yasuda *et al.* 2006; Scheckhuber *et al.* 2007) und Membranpermeabilität am deutlichsten verändert ist, während des Aufreinigungsvorgangs verloren gehen und somit nicht mit einbezogen werden.

Deswegen wurde auch für die TXRF-Messungen erwartet, dass zwar die cytoplasmatische Kupferkonzentration im Alter deutlich ansteigt, jedoch die Menge an Kupfer in den Mitochondrien nicht so stark abnimmt, da ja die am stärksten beschädigten Mitochondrien, die – der Hypothese folgend - den Großteil ihres Kupfers bereits ins Cytosol abgegeben haben, nicht mit einbezogen werden. Ein leichtes aber dennoch nachweisbares Absinken in der mitochondrialen Kupferkonzentration wäre somit ein weiterer Hinweis auf diese Organellen als Quelle des Kupfers, das sich im Cytosol wieder findet.

Die gemessenen Werte für die Kupferkonzentration in Mitochondrien und Cytoplasma aus juvenilen und seneszenten Kulturen von *P. anserina* lagen zwischen 0,57 nmol/mg Protein und 2,65 nmol/mg Protein. Sie stimmen sehr gut mit Ergebnissen überein, die ebenfalls mittels TXRF in kultivierten Säugerzellen (Tapia *et al.* 2003) und mittels einer anderen analytisch-chemischen Methode (ICP-OES – „Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy“ – engl. „Optische Emissionsspektrometrie mit dem induktiv gekoppelten Hochfrequenzplasma“) in Mitochondrien von *S. cerevisiae* erzielt wurden (Cobine *et al.* 2004). Dort wurden Kupferkonzentrationen zwischen 0,35 und 1,4 nmol/mg Protein in den Säugerzellen und zwischen 0,62 und 0,7 nmol/mg Protein in Mitochondrien von *S. cerevisiae* gemessen. Dass in Mitochondrien von *P. anserina* sehr ähnliche Werte gemessen wurden, zeigt deutlich, dass auch in diesem Ascomyceten offenbar sich in der mitochondrialen Matrix ein Reservoir an Kupfer befindet, welches zuvor für Hefe und

Diskussion

Mauszellen beschrieben wurde (Cobine *et al.* 2004; Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B).

Publizierte Daten aus Hefe (Cobine *et al.* 2006 B), aber auch Arbeiten im Rahmen der Diplomarbeit von Karin Jezek an *P. anserina* (K. Jezek 2005) legen die Vermutung nahe, dass das in der COX eingebaute Kupfer aus eben diesem Kupfer-Reservoir stammt. Verringert man die Menge an frei zugänglichem und verfügbarem Kupfer in der Matrix durch Bindung des Kupfers an Metallothionein, so wird die Aktivität der COX verringert, und im Falle von *P. anserina* die AOX induziert, was hier zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt.

Bei der Auswertung der Messergebnisse wurden zunächst die vier Mittelwerte (jeweils juvenile und seneszente Mitochondrien und Cytoplasma) aus den sechs untersuchten Proben gebildet und miteinander verglichen. Dies ergab einen tendenziellen Anstieg der cytoplasmatischen bei gleichzeitig moderatem Abfall der mitochondrialen Kupferkonzentration ohne jedoch statistische Signifikanz erreichen zu können. Der Grund für die mangelnde Signifikanz ist die Streuung der Einzelwerte um den jeweiligen Mittelwert. Um diese individuellen Unterschiede zu eliminieren, wurde für jeden untersuchten Stamm einzeln das Verhältnis von mitochondrialer zu cytoplasmatischer Kupferkonzentration gebildet. Dieser Schritt wird auch dadurch legitimiert, dass eine Umverteilung des Kupfers zwischen ebendiesen Kompartimenten postuliert wird. Die gemittelten Verhältnisse zwischen mitochondrialer und cytoplasmatischer Kupferkonzentration ($[Cu]_{\text{Mito}} / [Cu]_{\text{Cyto}}$) zeigen eine statistisch signifikante Abnahme im Alter, was den Anstieg im Cytoplasma und die gleichzeitige leichte Abnahme in den Mitochondrien widerspiegelt. Da bei der Aufreinigung der Mitochondrien wahrscheinlich die ältesten und am meisten geschädigten nicht mit berücksichtigt wurden, kann man davon ausgehen, dass die Kupferkonzentration in den gemessenen mitochondrialen Proben höher ist als der Realität in der Zelle entsprechend, wodurch der Wert des berechneten Quotienten im Alter noch geringer und somit die Veränderung noch deutlicher sein sollte.

Würde man nur die Ergebnisse der hier durchgeführten TXRF-Messungen betrachten, so könnte man anführen, dass all die gemessenen Unterschied nur aufgrund der Fraktionierung und Isolierung der einzelnen Zellkompartimente zustande kommen und *in vivo* von keinerlei Relevanz sind. Eindeutig widerlegen lässt sich diese Argumentation durch die verschiedenen anderen Methoden, die alle auch

Diskussion

einen Anstieg der cytoplasmatischen Kupferkonzentration aufgrund von Freisetzung des Metalls aus den Mitochondrien nahe legten. An vorderster Stelle sind hierbei die Transkriptanalysen kupferregulierter Gene in verschiedenen Organismen zu nennen. Von Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* – Himmelblau and Amasino 2000) über Pilze (*P. anserina* – Averbek *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A) bis hin zu menschlichen Zellen (HDFs – „human diploid fibroblasts“ – engl. „menschliche diploide Fibroblasten – F. Debacq-Chainiaux pers. Mitteilung) konnten Belege dafür erarbeitet werden, dass die cytoplasmatische Kupferkonzentration im Alter ansteigt. Das deutlichste Zeichen ist, dass in allen drei Systemen die Transkriptmenge für das bzw. die Metallothionein(e) im Alter drastisch ansteigt (Averbek *et al.* 2001; Guo *et al.* 2003; F. Debacq-Chainiaux pers. Mitteilung).

In *P. anserina* konnte weiterhin gezeigt werden, dass *PaCtr3*, ein Zielgen des Kupfer-reprimierten Transkriptionsfaktors GRISEA, im Alter drastisch herabreguliert wird (Borghouts *et al.* 2002 A). In *A. thaliana* erhöht sich die Transkriptmenge für die beiden Gene, die für Homologe des Kupfertransporters CCC2 (*AtRan1*) (Himmelblau and Amasino 2000) und des Chaperones ATX1 (*AtCch1*) codieren (Himmelblau *et al.* 1998). Außerdem wird die Expression des Gens für das „vegetative storage protein“ (*AtVsp2*) in der Seneszenz deutlich nach oben reguliert (Mira *et al.* 2002). Die real-time PCR-Experimente an HDFs (F. Debacq-Chainiaux pers. Mitteilung) erbrachten einen Anstieg der Transkriptmengen für das Hitzestresschaperone *Hsp70* (Murata *et al.* 1999) und das Prion-Protein *PrP* (Varela-Nallar *et al.* 2006), beide bereits bekannt als durch Kupfer induziert. In den menschlichen Zellen war der indirekte Nachweis eines Kupferanstiegs möglich sowohl in replikativ seneszenten als auch in Zellen, in denen durch UV-Licht artifiziell die Seneszenz ausgelöst wurde (SIPS – „stress induced premature senescent fibroblasts“ – engl. „Stress-induzierte frühzeitig seneszente Fibroblasten“ – Debacq-Chainiaux *et al.* 2005; Toussiant *et al.* 2002).

Unklar ist bislang, wie das Signal des ansteigenden Kupferspiegels im Cytoplasma von der Zelle aufgenommen und zum Modulator der Transkription umgewandelt wird. Denkbar ist zum einen, dass Kupfer direkt die Messgröße ist, aber zum anderen könnte auch die durch das überschüssige Kupfer entstehenden ROS als Signal dienen. Für die bislang alters- und kupferinduzierten menschlichen Gene konnte keine der beiden Möglichkeiten bislang experimentell ausgeschlossen bzw. verifiziert werden (Mattie und Freedman 2004; Song und Freedman 2005). Da aber *P. anserina* offensichtlich zwei kupfer-sensitive Transkriptionsfaktoren homolog

Diskussion

zu ACE1 und MAC1 in *S. cerevisiae* (Keller *et al.* 2005) besitzt (GRISEA und PaACE1–Osiewacz und Nuber 1996; s. Tab. 4) und die beiden Hefe-Proteine direkt mit Kupfer interagieren (Jensen and Winge 1998; Dameron *et al.* 1988) ist eine direkte Rolle des Kupfers in der Transkriptionskontrolle wahrscheinlicher. Nicht auszuschließen ist auch, dass mehrere Signalwege durch das im Alter in das Cytoplasma freigesetzte Kupfer angeschaltet werden und dadurch auf verschiedene Weise die Seneszenz einleiten oder fortführen. Für die molekulare Pathologie einer menschlichen Krankheit („Wilson Disease“), bei der es zu chronisch erhöhten cytoplasmatischen Kupferspiegeln und dadurch verursachten Zellschädigungen kommt, ist es wahrscheinlich, dass das Wirken des Kupfers nicht (nur) die Induktion von ROS durch die Fenton-Reaktion ist, sondern auch weitere noch zu identifizierende molekulare Konsequenzen hat (Armendariz *et al.* 2004; Huster *et al.* 2006; Huster *et al.* 2007).

Die Vielzahl der Beispiele kupfer- und altersinduzierter Gene, die Diversität der untersuchten Organismen und die in dieser Arbeit erstmals demonstrierten direkten Kupfermessungen weisen zusammengenommen deutlich auf eine wichtige und neue und v.a. konservierte Rolle von Kupfer in der Seneszenz von Zellen. Die genauen Reaktionsmechanismen sowohl wie Kupfer die Transkription beeinflusst als auch wie Kupfer allgemein die Zellphysiologie im Alter verändert, müssen in weiteren Arbeiten geklärt werden.

Neben den detaillierten Mechanismen war bislang auch die Quelle des Kupfers, das sich im Alter im Cytosol wiederfindet, unklar. Da für *P. anserina* bereits gezeigt werden konnte, dass die Transkriptmenge für den Hochaffinität-Kupfertransporter PaCTR3 im Alter drastisch abnimmt (Borghouts *et al.* 2002 A), ist die Kupfer-Quelle innerhalb der Zelle zu suchen. Experimente an Pflanzen legten die Vermutung nahe, dass der Anstieg der cytoplasmatischen Kupferkonzentration in seneszenten Blättern durch die Degradierung kupferhaltiger Proteine in Chloroplasten bedingt wird (Himmelblau and Amasino 2000). Als Grund der Induktion Kupfer-bindender Proteine nennen Himmelblau und Amasino ein effizientes Recyclingsystem für Kupfer (Himmelblau and Amasino 2000), das Kupfer aus seneszenten Blättern zur Speicherung in andere Pflanzenteile transportiert, von wo aus es in der nächsten Vegetationsperiode wieder verwendet werden kann. Zwei Argumente sprechen gegen die Chloroplasten als

Diskussion

alleinige Hauptquelle des Kupfers: zum einen wird hier ein allgemeiner konservierter Mechanismus, durch den Kupfer in der Seneszenz wirkt, postuliert und Pilze und tierische Zellen besitzen keine Chloroplasten. Zum anderen konnte in Hefe, in Mauszellen und hier in dieser Arbeit erstmals auch für *P. anserina* eine nicht unerhebliche Menge an frei verfügbarem Kupfer in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen werden (Cobine *et al.* 2004; Yang *et al.* 2005; Cobine *et al.* 2006 B). Dass die Mitochondrien in der Apoptose und Seneszenz eine bzw. die entscheidende Rolle spielen, konnte v.a. für Säugerzellen, aber auch für Hefe mehrfach deutlich gezeigt werden (zusammengefasst in Green and Reed 1998; Balaban *et al.* 2004; Madeo *et al.* 2004; Green 2005). Neueste Untersuchungen in *P. anserina* konnten nachweisen, dass auch in diesem Ascomyceten die molekulare Maschinerie der Apoptose vorhanden ist und auch wirkt (Hamann *et al.* 2005; Scheckhuber *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2007 zur Veröffentlichung eingereicht). Jedoch sind einige wichtige Faktoren, die aus dem Säuger-System als Teil des Apoptose-Mechanismus bekannt sind (z.B. BAX/BAK), in *P. anserina* – zumindest als Homologe - nicht vorhanden, so dass es wohl interessante Unterschiede im Detailmechanismus zu geben scheint.

Als einer der ersten Schritte in der Apoptose kommt es zur Öffnung der sog. MPTP („mitochondrial permeability transition pore“ – engl. „Pore des mitochondrialen Permeabilitätsübergangs“), die eine direkte Verbindung zwischen Matrix und Cytosol herstellt, wobei der Intermembranraum überbrückt wird (zusammengefasst in Halestrap *et al.* 2002; Crompton 2004; Armstrong 2006; Bernardi *et al.* 2006). Dadurch werden Bestandteile der mitochondrialen Matrix abhängig von ihrer Größe in das Cytosol freigesetzt. In einer relativ schnellen Reaktion (< 10 min) werden kleine Solute (<1,5 kDa) wie z.B. Ca²⁺ freigesetzt (Crompton *et al.* 1987). In einer langsameren Reaktion werden aber auch größere Bestandteile wie z.B. die Adenylatkinase (~30 kDa – Eliseev *et al.* 2002) oder die Aspartat-Aminotransferase (~45 kDa – Inoue *et al.* 1993) freigesetzt (Igbavboa *et al.* 1989; Zoratti und Szabo 1995; Greco *et al.* 1998). Es lässt sich also zu Recht argumentieren, dass auch das an einen bislang noch unbekanntem niedermolekularen Liganden gebundene Kupfer (Cobine *et al.* 2004; Cobine *et al.* 2006 B) aus der Matrix in das Cytoplasma strömt

Diskussion

und dort u.a. zu den oben genannten Veränderungen im Transkriptom kommt, die letztendlich zur Seneszenz und zum Tod führen.

Durch die Verwendung von eGFP konnte in dieser Arbeit deutlich nachgewiesen werden, dass auch in *P. anserina* in alten Pilzkulturen Bestandteile der mitochondrialen Matrix in das Cytoplasma freigesetzt werden. Sowohl Analysen unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch Western Blot Analysen in fraktionierten Zellen machten deutlich, dass mittels MTS in die mitochondriale Matrix geleitetes eGFP in mittelalten und prä-seneszenten Kulturen sich ausschließlich in der Matrix, in seneszenten Kulturen allerdings sowohl in den Mitochondrien als auch im Cytoplasma befindet. Somit scheint es auch in *P. anserina* zu einer MPT als Einleitung für apoptotische Prozesse zu kommen. Die Western Blot Analysen weisen deutlich nach, dass die Umverteilung des eGFP kein zufälliger oder durch die Präparation hervorgerufener Vorgang sondern vielmehr ein gröbenselektiver Prozess ist. Das Markerprotein für die mitochondriale Matrix, die MnSOD, die in aktiver Form *in vivo* als Tetramer von ~80kDa vorliegt, ist unabhängig vom Alter ausschließlich in der mitochondrialen Fraktion zu detektieren, es wird also nicht ins Cytoplasma entlassen.

Dies zeigt überdies, dass eGFP nicht deswegen im Alter im Cytoplasma nachzuweisen ist, weil der mitochondriale Import in seneszenten Kulturen nicht mehr funktionell ist. Untermuert wird dies dadurch, dass im Cytoplasma seneszenten Pilze sowohl eGFP mit noch nicht abgespaltener MTS als auch die reife eGFP-Form, bei der die MTS abgespalten wurde, detektierbar ist. Da die Abspaltung der MTS ausschließlich in der Matrix geschieht, ist belegt, dass diese Proteine sich in der Matrix befunden haben und von dort aus in das Cytoplasma entlassen wurden. Das Vorkommen der unprozessierten eGFP-Isoform im Cytoplasma lässt, da der Import der MnSOD problemlos funktioniert, eher auf Probleme bei der MTS-Abspaltung als beim generellen mitochondrialen Import im Alter schließen.

Es kommt also nicht zum vollständigen Zusammenbruch der Mitochondrien und einer darauf folgenden unkontrollierten Freisetzung sämtlicher Bestandteile der Matrix. Geht man davon aus, dass eGFP bei hohen Konzentrationen zur Dimerbildung (Größe des Dimers ~56 kDa) neigt (Zacharias *et al.* 2002; Shaner *et al.* 2005) und bezieht man die oben genannten Ergebnisse der Analysen freigesetzter Säugerproteine mit

Diskussion

ein, so scheint die MPTP für Proteine, die kleiner als ~55 kDa aber nicht größer als ~80 kDa sind, durchgängig zu sein.

Fasst man die Ergebnisse der TXRF-Messungen und der Analysen mit eGFP zusammen, so konnte die Hypothese einer Freisetzung mitochondrialen Kupfers in das Cytoplasma als Beginn und Einleitung der Seneszenz und des Zelltods deutlich untermauert werden. Weiterhin wurde durch den Nachweis der MPT auch in *P. anserina* ein weiterer wichtiger Schritt hin zur Aufklärung der Rolle von apoptotischen Prozessen bei der Alterung dieses Modellsystems getan.

Zur Untermauerung der hier und in anderen Arbeiten bislang erzielten Ergebnisse muss nun in folgenden Experimenten nachgewiesen werden, wie lange der Zeitraum zwischen dem Ausströmen des ligandengebundenen Kupfers ins Cytoplasma und dem Zelltod ist. So lässt sich beweisen, dass es sich um einen Prozess von Bedeutung für den weiteren Verlauf der Seneszenz und nicht nur um einen sekundären Effekt anderer Vorgänge handelt. Denn es ist auch denkbar, dass es zur Freisetzung des Kupfers nur als unvermeidbare Folge der Veränderung der Membranpermeabilität kommt. Die Daten der Transkriptionsanalysen (Averbeck *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2001; Borghouts *et al.* 2002 A; F. Debacq-Chainiaux pers. Mitteilung) zeigen aber deutlich eine aktive Reaktion der Zelle. Weitere Hinweise darauf konnten in der Diplomarbeit von Karin Jezek erarbeitet werden. Dort wurde gezeigt, dass durch Binden des Matrix-Kupfers an PaMT1 die Lebensspanne weiter verlängert werden konnte, als allein durch die Reduktion der COX-Aktivität und Induktion der AOX zu erwarten wäre (K. Jezek 2005).

Bei der Mutante *grisea*, bei der ca. 70% der mitochondrialen Respiration über die AOX laufen, wird die Menge an produzierten ROS um den Faktor vier verringert (Gredilla *et al.* 2006) und gleichzeitig verlängert sich die Lebensspanne aber nur um ~60%. Bei der Mutante, bei der PaMT1 in die Matrix eingebracht wurde, verlaufen nur ~30% der Atmung über die AOX, die Lebensspanne wird aber verdoppelt (K. Jezek 2005).

Es ist denkbar, dass die starke Bindung des Kupfers an PaMT1 die Weiterleitung des durch das Kupfer im Cytoplasma produzierten Signals abschwächt. Wie und an wen dieses Signal im Allgemeinen weitergegeben wird und was dessen molekulare Folgen sind, ist und wird Gegenstand intensiver weiterer Forschung.

5. Zusammenfassung

Das essentielle Spurenelement Kupfer ist Co-Faktor mehrerer Schlüsselenzyme (z. B. Cu/Zn-SOD, Cytochrom c Oxidase). Da es leicht Elektronen aufnehmen und abgeben kann, eignet es sich besonders gut für Redox-Reaktionen. Wenn Kupfer jedoch mit Sauerstoff reagiert, entstehen hoch cytotoxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die nach der „freien Radikaltheorie des Alterns“ ursächlich für Alterung und Zelltod sind. Um deren Bildung zu vermeiden, erfolgen alle Aspekte des Kupferstoffwechsels – Aufnahme, Transport und Speicherung - stets proteingebunden.

In dem Ascomyceten *Podospira anserina* scheint Kupfer auf zwei verschiedenen Arten Einfluss auf die Lebensspanne zu nehmen:

Zum einen mittelbar darüber, dass die Verfügbarkeit von Kupfer über die in der mitochondrialen Atmung verwendete Endoxidase entscheidet. Bei Kupfermangel wird eine Eisen-abhängige alternative Oxidase (AOX) induziert. Durch Atmung über die AOX entstehen weniger ROS, was die Lebensspanne verlängert.

Zum anderen scheint Kupfer auch eine unmittelbare Rolle in der Seneszenz von *P. anserina* zu spielen. Es konnten mehrere indirekte Hinweise (Transkript- und Aktivitätsanalysen) gesammelt werden, dass im Alter die cytoplasmatische Kupferkonzentration drastisch ansteigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bis auf drei Ausnahmen die gesamte bislang bekannte Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase aus *S. cerevisiae* auch im Genom von *Podospira anserina* mit Homologen bzw. Orthologen wiederfindet. Für mehrere der neu vorhergesagten Gene konnte eine Expression im Wildstamm nachgewiesen werden. Dazu wurden Standardtechniken (Northern Blot Analyse, RT-PCR) und auch neu etablierte eGFP-Reporterkonstrukte verwendet.

Alle drei Ausnahmen betreffen Gene bzw. Proteine, von welchen *P. anserina* nur jeweils eines besitzt, wo *S. cerevisiae* je zwei hat: A) Transporter, der Kupfer aus dem Aussenmedium in die Zelle pumpt (sowohl Hoch- als auch Niederaffinitätstransporter); B) Metallothionein: PaMT1 ↔ CUP1 + CRS5; C) PaSCO1 besitzt kein weiteres Homolog im Genom von *P. anserina*, wie es in Hefe und Mensch der Fall ist, wo es SCO1 und SCO2 gibt.

Zusammenfassung

PaSCO1 ist Teil des Transportwegs, der Kupfer zum Einbau in die COX in der inneren Mitochondrienmembran bringt. Die weiteren bekannten Beteiligten sind PaCOX23, PaCOX17 und PaCOX11. PaCOX17 wurde bereits in früheren Arbeiten kloniert und charakterisiert. Eine Deletion des entsprechenden Gens führt zum vollständigen Verlust der COX-Atmung, verlängert dafür aber die Lebensspanne um das mehr als zehnfache.

PaSco1 und *PaCox23* konnten in dieser Arbeit erfolgreich kloniert werden. Jedoch war es auch mit verschiedenen Methoden nicht möglich, die Gene im Genom von *P. anserina* zu deletieren. Dies deutet auf eine über die Kupferversorgung der COX hinaus gehende Funktion für beide Proteine hin; v.a. für SCO1 ergab sich diese Vermutung bereits in anderen Systemen. Die genaue und vollständige Sequenz von *PaCox11* konnte nicht *in silico*, aber mittels eines 5'-RACE-Experiments ermittelt werden. Für *PaCox11* ergaben sich weiterhin deutliche Hinweise, dass die Regulation nicht nur auf transkriptioneller sondern auch auf post-transkriptioneller Ebene über die Stabilität der mRNA erfolgt.

Mittels direkter analytisch-chemischer Methode (TXRF) konnte in der hier vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Kupferkonzentration direkt in isolierten Zellfraktionen gemessen und zuverlässig bestimmt werden. So konnte nachgewiesen werden, dass es im Alter – wie durch indirekte Hinweise bereits vermutet - tatsächlich zu einem Anstieg der cytoplasmatischen Kupferkonzentration kommt. Als Quelle dieses Kupfers konnten die Mitochondrien identifiziert werden. Dort existiert das bereits aus Hefe bekannte Kupfer-Reservoir in der mitochondrialen Matrix, aus welchem offenbar auch das in der COX eingebaute Kupfer stammt. Durch Verwendung von eGFP konnte in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass es beim Eintritt in die Seneszenz zur gröbenselektiven gezielten Freisetzung von Matrixinhalten (inklusive des Kupfers) kommt. Ein solcher Vorgang ist in Säugersystemen als „mitochondrial permeability transition“ (MPT) als initialer Schritt der Apoptose bekannt. Diese Ergebnisse ergänzen und erweitern somit die Hinweise darauf, dass auch in der Seneszenz von *P. anserina* apoptotische Vorgänge ablaufen, wie erst kürzlich für diesen Pilz herausgefunden wurde. Welche Rolle Kupfer in diesem Prozess spielt, werden weitere Experimente zeigen.

6. zitierte Literatur

- Adle D.J., Sinani D., Kim H., Lee J. (2007)** A cadmium-transporting P1B-type ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem 282: 947-955; vorab online veröffentlicht 14. November 2006, DOI:10.1074/jbc.M609535200
- Albert B. und Sellem C.H. (2002)** Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging. Curr Genet 40: 365-373; vorab online veröffentlicht 9. März 2002, DOI:10.1007/s00294-002-0275-1
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25: 3389-3402
- Andrews G.K. (2000)** Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. Biochem Pharmacol 59: 95-104
- Armendariz A.D., Gonzalez M., Loguinov A.V., Vulpe C.D. (2004)** Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of *Prnp* and *App*. Physiol Genomics 20: 45-54; vorab online veröffentlicht 5. Oktober 2004, DOI:10.1152/physiolgenomics.00196.2003
- Armstrong J.S. (2006)** Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. Bioessays 28: 253-260
- Arnesano F., Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Huffman D.L., O'Halloran T.V. (2001)** Characterization of the binding interface between the copper chaperone Atx1 and the first cytosolic domain of Ccc2 ATPase. J Biol Chem 276: 41365-41376; vorab online veröffentlicht 10. August 2001, DOI:10.1074/jbc.M104807200
- Arretz M., Schneider H., Guiard B., Brunner M., Neupert W. (1994)** Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. J Biol Chem 269: 4959-4967
- Attieh Z.K., Mukhopadhyay C.K., Seshadri V., Tripoulas N.A., Fox P.L. (1999)** Ceruloplasmin ferroxidase activity stimulates cellular iron uptake by a trivalent cation-specific transport mechanism. J Biol Chem 274: 1116-1123
- Averbeck N.B., Borghouts C., Hamann A., Specke V., Osiewacz H.D. (2001)** Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. Mol Gen Genet 264: 604-612
- Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. (2005)** Mitochondria, oxidants, and aging. Cell 120: 483-495
- Balamurugan K. und Schaffner W. (2006)** Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope. Biochim Biophys Acta 1763: 737-746; vorab online veröffentlicht 12. Mai 2006, DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.05.001
- Banci L., Bertini I., Cantini F., Ciofi-Baffoni S., Gonnelli L., Mangani S. (2004)** Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. J Biol Chem 279: 34833-34839; vorab online veröffentlicht 4. Juni 2004, DOI:10.1074/jbc.M403655200
- Bandy B. und Davison A.J. (1990)** Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? Free Radic Biol Med 8: 523-539
- Banting G.S. und Glerum D.M. (2006)** Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase assembly protein Cox11p. Eukaryot Cell 5: 568-578
- Barros M.H., Johnson A., Tzagoloff A. (2004)** COX23, a homologue of COX17, is required for Cytochrome c Oxidase assembly. J Biol Chem 279: 31943-31947; vorab online veröffentlicht 15. Mai 2004, DOI 10.1074/jbc.M405014200
- Beelman C.A. und Parker R. (1995)** Degradation of mRNA in eukaryotes. Cell 81: 179-183
- Beers J., Glerum D.M., Tzagoloff A. (2002)** Purification and characterization of yeast Sco1p, a mitochondrial copper protein. J Biol Chem 277: 22185-22190; vorab online veröffentlicht 10. April 2002, DOI:10.1074/jbc.M202545200

Literatur

- Bernardi P., Krauskopf A., Basso E., Petronilli V., Blachly-Dyson E., Di Lisa F., Forte M.A. (2006)** The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J* 273: 2077-2099
- Bertinato J. und L'Abbe M.R. (2004)** Maintaining copper homeostasis: regulation of copper-trafficking proteins in response to copper deficiency or overload. *J Nutr Biochem* 15: 316-322
- Bittel D., Dalton T., Samson S.L., Gedamu L., Andrews G.K. (1998)** The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem* 273: 7127-7133
- Bonawitz N.D., Rodeheffer M.S., Shadel G.S. (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., Kimpel E., Osiewacz H.D. (1997)** Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene grisea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10768-10773
- Borghouts C. und Osiewacz H.D. (1998)** GRISEA, a copper-modulated transcription factor from *Podospora anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of MAC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 260: 492-502
- Borghouts C., Kerschner S., Osiewacz H.D. (2000)** Copper-dependence of mitochondrial DNA rearrangements in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 37: 268-275
- Borghouts C., Werner A., Elthon T., Osiewacz H.D. (2001)** Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol Cell Biol* 21: 390-399
- Borghouts C., Scheckhuber C.Q., Stephan O., Osiewacz H.D. (2002 A)** Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of *PaCtr3* encoding a copper transporter. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1355-1371
- Borghouts C., Scheckhuber C.Q., Werner A., Osiewacz H.D. (2002 B)** Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology* 3: 143-153
- Bradford M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Buchman C., Skroch P., Welch J., Fogel S., Karin M. (1989)** The CUP2 gene product, regulator of yeast metallothionein expression, is a copper-activated DNA-binding protein. *Mol Cell Biol* 9: 4091-4095
- Buchwald P., Krummeck G., Rödel G. (1991)** Immunological identification of yeast SCO1 protein as a component of the inner mitochondrial membrane. *Mol Gen Genet* 229: 413-420
- Bullock W.O., Fernandez J.M., Short J.M. (1987)** XI1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-379
- Carr H.S., George G.N., Winge D.R. (2002)** Yeast Cox11, a protein essential for cytochrome c oxidase assembly, is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem* 277: 31237-31242; vorab online veröffentlicht 12. Juni 2002, DOI:10.1074/jbc.M204854200
- Carr H.S. und Winge D.R. (2003)** Assembly of cytochrome c oxidase within the mitochondrion. *Acc Chem Res* 36: 309-316
- Carr H.S., Maxfield A.B., Horng Y.C., Winge D.R. (2005)** Functional analysis of the domains in Cox11. *J Biol Chem* 280: 22664-22669; vorab online veröffentlicht 19. April 2005, DOI:10.1074/M414077200
- Carroll M.C., Girouard J.B., Ulloa J.L., Subramaniam J.R., Wong P.C., Valentine J.S., Culotta V.C. (2004)** Mechanisms for activating Cu- and Zn-containing superoxide dismutase in the absence of the CCS Cu chaperone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5964-5969; vorab online veröffentlicht 6. April 2004, DOI:10.1073/pnas.0308298101
- Caruano-Yzermans A.L., Bartnikas T.B., Gitlin J.D. (2006)** Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281: 13581-13587; vorab online veröffentlicht 10. März 2006, DOI:10.1074/jbc.M601580200

Literatur

- Casareno R.L., Waggoner D., Gitlin J.D. (1998)** The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 273: 23625-23628
- Chacinska A., Pfannschmidt S., Wiedemann N., Kozjak V., Sanjuan Szklarz L.K., Schulze-Specking A., Truscott K.N., Guiard B., Meisinger C., Pfanner N. (2004)** Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *EMBO J* 23: 3735-3746; vorab online veröffentlicht 9. September 2004, DOI: 10.1038/sj.emboj.7600389
- Chaveronche M.K., Ghigo J.M., d'Enfert C. (2000)** A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 28: E97
- Cobbett C. und Goldsbrough P. (2002)** Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159-182
- Cobine P.A., Ojeda L.D., Rigby K.M., Winge D.R. (2004)** Yeast contain a non-proteinaceous pool of copper in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem* 279 14447-14455; vorab online veröffentlicht 16. Januar 2004, DOI:10.1074/jbc.M312693200
- Cobine P.A., Pierrel F., Winge D.R. (2006 A)** Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta* 1763: 759-772; vorab online veröffentlicht 31. März 2006, DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.03.002
- Cobine P.A., Pierrel F., Bestwick M.L., Winge D.R. (2006 B)** Mitochondrial matrix copper complex used in metallation of cytochrome oxidase and superoxide dismutase. *J Biol Chem* 281: 36552-36559; vorab online veröffentlicht 28. September 2006, DOI: 10.1074/jbc.M606839200
- Cohen A., Nelson H., Nelson N. (2000)** The family of SMF metal ion transporters in yeast cells. *J Biol Chem* 275: 33388-33394; vorab online veröffentlicht 4. August 2000, DOI:10.1074/jbc.M004611200
- Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. (2002)** Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59: 627-647
- Crompton M., Costi A., Hayat L. (1987)** Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 245: 915-918
- Crompton M. (2004)** Mitochondria and aging: a role for the permeability transition? *Aging Cell* 3: 3-6
- Culotta V.C., Howard W.R., Liu X.F. (1994)** CRS5 encodes a metallothionein-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 25295-25302
- Culotta V.C., Joh H.D., Lin S.J., Slekar K.H., Strain J. (1995)** A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* 270: 29991-29997
- Culotta V.C., Klomp L.W., Strain J., Casareno R.L.B., Krems B., Gitlin J.D. (1997)** The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272: 23469-23472
- Culotta V.C., Yang M., O'Halloran T.V. (2006)** Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763: 747-758; vorab online veröffentlicht 17. Mai 2006, DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.05.003
- Cummings D.J., Belcour L., Grandchamp C. (1979)** Mitochondrial DNA from *Podospira anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. *Mol Gen Genet* 171: 239-250
- Cummings D.J., MacNeil I.A., Domenico J., Matsuura E.T. (1985)** Excision-amplification of mitochondrial DNA during senescence in *Podospira anserina*. DNA sequence analysis of three unique "plasmids". *J Mol Biol* 185: 659-680
- Dalton T.P., Bittel D., Andrews G.K. (1997)** Reversible activation of mouse metal response element-binding transcription factor 1 DNA binding involves zinc interaction with the zinc finger domain. *Mol Cell Biol* 17: 2781-2791
- Dameron C.T., Winge D.R., George G.N., Sansone M., Hu S., Hamer D. (1991)** A copper-thiolate polynuclear cluster in the ACE1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6127-6131

Literatur

- Dancis A., Haile D., Yuan D.S., Klausner R.D. (1994)** The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem* 269: 25660-25667
- Danial N.N. und Korsmeyer S.J. (2004)** Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219
- Davies K.J. (1995)** Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp* 61: 1-31
- Davies K.J. (2000)** Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50: 279-289
- Davis S.R. und Cousins R.J. (2000)** Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr* 130: 1085-1088
- de Silva D., Davis-Kaplan S., Fergestad J., Kaplan J. (1997)** Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin. *J Biol Chem* 272: 14208-14213
- Debacq-Chainiaux F., Borlon C., Pascal T., Royer V., Eliaers F., Ninane N., Carrard G., Friguet B., de Longueville F., Boffe S., Remacle J., Toussaint O. (2005)** Repeated exposure of human skin fibroblasts to UVB at subcytotoxic level triggers premature senescence through the TGF-beta1 signaling pathway. *J Cell Sci* 118: 743-758; vorab online veröffentlicht 25. Januar 2005, DOI:10.1242/jcs.01651
- Dickinson E.K., Adams D.L., Schon E.A., Glerum D.M. (2000)** A human SCO2 mutation helps define the role of Sco1p in the cytochrome oxidase assembly pathway. *J Biol Chem* 275: 26780-26785
- Dix D.R., Bridgham J.T., Broderius M.A., Byersdorfer C.A., Eide D.J. (1994)** The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269: 26092-26099
- Dufour E., Boulay J., Rincheval V., Sainsard-Chanet A. (2000)** A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4138-4143
- Egli D., Selvaraj A., Yepiskoposyan H., Zhang B., Hafen E., Georgiev O., Schaffner W. (2003)** Knockout of 'metal-responsive transcription factor' MTF-1 in *Drosophila* by homologous recombination reveals its central role in heavy metal homeostasis. *EMBO J* 22: 100-108
- Eliseev R.A., Gunter K.K., Gunter T.E. (2002)** Bcl-2 sensitive mitochondrial potassium accumulation and swelling in apoptosis. *Mitochondrion* 1: 361-370
- Esser K. (1974)** *Podospora anserina*. In: King E.C.(Herausgeber), *Handbook of Genetics*, Vol. I; Plenum Press, New York, p. 531
- Esser K. und Keller W. (1976)** Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol Gen Genet* 144: 107-110
- Felice M.R., De Domenico I., Li L., Ward D.M., Bartok B., Musci G., Kaplan J. (2005)** Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J Biol Chem* 280: 22181-22190; vorab online veröffentlicht 7. April 2005, DOI:10.1074/jbc.M414663200
- Field L.S., Furukawa Y., O'Halloran T.V., Culotta V.C. (2003)** Factors controlling the uptake of yeast copper/zinc superoxide dismutase into mitochondria. *J Biol Chem* 278: 28052-28059; vorab online veröffentlicht 14. Mai 2003, DOI:10.1074/jbc.M304296200
- Finkel T. (2003)** Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15: 247-254
- Finkel T. und Holbrook N.J. (2000)** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408: 239-247
- Fridovich I. (1978)** The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880
- Fruehauf J.P. und Meyskens F.L. Jr. (2007)** Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 13: 789-794
- Fu D., Beeler T.J., Dunn T.M. (1995)** Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* 11: 283-292

Literatur

- Fürst P., Hu S., Hackett R., Hamer D. (1988)** Copper activates metallothionein gene transcription by altering the conformation of a specific DNA binding protein. *Cell* 55: 705-717
- Furukawa Y., Torres A.S., O'Halloran T.V. (2004)** Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* 23: 2872-2881; vorab online veröffentlicht 24. Juni 2004, DOI:10.1038/sj.emboj.7600276
- Garcia S., Prado M., Degano R., Dominguez A. (2002)** A copper-responsive transcription factor, CRF1, mediates copper and cadmium resistance in *Yarrowia lipolytica*. *J Biol Chem* 277: 37359-37368; vorab online veröffentlicht 11. Juli 2002, DOI:10.1074/jbc.M201091200
- Georgatsou E., Mavrogiannis L.A., Fragiadakis G.S., Alexandraki D. (1997)** The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J Biol Chem* 272: 13786-13792
- Gietz R.D. und Woods R.A. (2002)** Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350: 87-96
- Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. (1996 A)** Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 271: 14504-14509
- Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. (1996 B)** SCO1 and SCO2 act as high copy suppressors of a mitochondrial copper recruitment defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271: 20531-20535
- Goldstein I.M., Kaplan H.B., Edelson H.S., Weissmann G. (1979)** Ceruloplasmin. A scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem* 254: 4040-4045
- Gralia E.B., Thiele D.J., Silar P., Valentine J.S. (1991)** ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:8558-8562
- Gray N.K. und Wickens M. (1998)** Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 399-458
- Greco M., Moro L., Pellicchia G., Di Pede S., Guerrieri F. (1998)** Release of matrix proteins from mitochondria to cytosol during the prereplicative phase of liver regeneration. *FEBS Lett* 427: 179-182
- Gredilla R., Grief J., Osiewacz H.D. (2006)** Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospira anserina*. *Exp Gerontol* 41: 439-447; vorab online veröffentlicht 10. März 2006, DOI:10.1016/j.exger.2006.01.010
- Green D.R. und Reed J.C. (1998)** Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-1312
- Green D.R. (2005)** Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121: 578-591
- Grotz N. und Guerinot M.L. (2006)** Molecular aspects of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Biochim Biophys Acta* 1763: 595-608; vorab online veröffentlicht 2. Juni 2006, DOI:10.1016/j.bbamcr.2006.05.014
- Günes C., Heuchel R., Georgiev O., Müller K.H., Lichtlen P., Bluthmann H., Marino S., Aguzzi A., Schaffner W. (1998)** Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the metal-responsive transcriptional activator MTF-1. *EMBO J* 17: 2846-2854
- Guo W. J., Bundithya W., Goldsbrough P. B. (2003)** Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. *New Phytologist* 159: 369-381
- Haber F. und Weiss J. (1934)** The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London Ser A* 147: 332-351
- Halestrap A.P., McStay G.P., Clarke S.J. (2002)** The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84: 153-166
- Halliwell B. und Gutteridge J.M. (1984)** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1-14

Literatur

- Hamann A., Krause K., Werner A., Osiewacz H.D. (2005)** A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Curr Genet* 48: 270-275; vorab online veröffentlicht 4. November 2005, DOI:10.1007/s00294-005-0018-1
- Hamann A., Brust D., Osiewacz H. D. (2007)** Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*. Zur Veröffentlichung eingereicht
- Hamer D.H. (1986)** Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55: 913-951
- Hamza I., Schaefer M., Klomp L.W., Gitlin J.D. (1999)** Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13363-13368
- Harman D. (1956)** Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1: 298-300
- Harman D. (1972)** The biologic clock: the mitochondria? *J Am Geriatr Soc* 20:145-147
- Hartl F.U., Schmidt B., Wachter E., Weiss H., Neupert W. (1986)** Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47: 939-951
- Hassett R. und Kosman D.J. (1995)** Evidence for Cu(II) reduction as a component of copper uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 270: 128-134
- Hassett R., Dix D.R., Eide D.J., Kosman D. J. (2000)** The Fe(II) permease Fet4p functions as a low affinity copper transporter and supports normal copper trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 351: 477-484
- Herrmann J.M. und Hell K. (2005)** Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 30: 205-211
- Heuchel R., Radtke F., Georgiev O., Stark G., Aguet M., Schaffner W. (1994)** The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J* 13: 2870-2875
- Himmelblau E., Mira H., Lin S.J., Culotta V.C., Penarrubia L., Amasino R.M. (1998)** Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117: 1227-1234
- Himmelblau E. und Amasino R.M. (2000)** Delivering copper within plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 3: 205-210
- Hirayama T., Kieber J.J., Hirayama N., Kogan M., Guzman P., Nourizadeh S., Alonso J.M., Dailey W.P., Dancis A., Ecker J.R. (1999)** RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell* 97: 383-393.
- Hiser L., Di Valentin M., Hamer A.G., Hosler J.P. (2000)** Cox11p is required for stable formation of the Cu(B) and magnesium centers of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 275: 619-623
- Horecka J., Kinsey P.T., Sprague G.F. Jr. (1995)** Cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* LYS7 gene: evidence for function outside of lysine biosynthesis. *Gene* 162: 87-92
- Hornig Y.C., Cobine P.A., Maxfield A.B., Carr H.S., Winge D.R. (2004)** Specific copper transfer from the Cox17 metallochaperone to both Sco1 and Cox11 in the assembly of yeast cytochrome C oxidase. *J Biol Chem* 279: 35334-35340; vorab online veröffentlicht 15. Juni 2004, DOI:10.1074/jbc.M404747200
- Hornig Y.C., Leary S.C., Cobine P.A., Young F.B., George G.N., Shoubridge E.A., Winge D.R. (2005)** Human Sco1 and Sco2 function as copper-binding proteins. *J Biol Chem* 280: 34113-34122; vorab online veröffentlicht 9. August 2005, DOI: 10.1074/jbc.M506801200
- Hung I.H., Casareno R.L., Labesse G., Mathews F.S., Gitlin J.D. (1998)** HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J Biol Chem* 273: 1749-1754
- Huster D., Finegold M.J., Morgan C.T., Burkhead J.L., Nixon R., Vanderwerf S.M., Gilliam C.T., Lutsenko S. (2006)** Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b-/- (Wilson disease gene) knockout mice. *Am J Pathol* 168: 423-434
- Huster D., Purnat T.D., Burkhead J.L., Ralle M., Fiehn O., Stuckert F., Olson N.E., Teupser D., Lutsenko S. (2007)** High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model

Literatur

of Wilson disease. *J Biol Chem* 282: 8343-8355; vorab online veröffentlicht 7. Januar 2007, DOI:10.1074/jbc.M607496200

Igbavboa U., Zwizinski C.W., Pfeiffer D.R. (1989) Release of mitochondrial matrix proteins through a Ca²⁺-requiring, cyclosporin-sensitive pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 161: 619-625

Inoue T., Yoshida Y., Nishimura M., Kurosawa K., Tagawa K. (1993) Ca²⁺-induced, phospholipase-independent injury during reoxygenation of anoxic mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1140: 313-320

Jackson J.S. Jr., Houshmandi S.S., Lopez Leban F., Olivas W.M. (2004) Recruitment of the Puf3 protein to its mRNA target for regulation of mRNA decay in yeast. *RNA* 10: 1625-1636; vorab online veröffentlicht 30. August 2004, DOI:10.1261/rna.7270204

Jensen L.T., Howard W.R., Strain J.J., Winge D.R., Culotta V.C. (1996) Enhanced effectiveness of copper ion buffering by CUP1 metallothionein compared with CRS5 metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271: 18514-18519

Jensen L.T., Posewitz M.C., Srinivasan C., Winge D.R. (1998) Mapping of the DNA binding domain of the copper-responsive transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 23805-23811

Jensen L.T. und Winge D.R. (1998) Identification of a copper-induced intramolecular interaction in the transcription factor Mac1 from *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 17:5400-5408

Jungmann J., Reins H.A., Lee J., Romeo A., Hassett R., Kosman D., Jentsch S. (1996) MAC1, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *EMBO J* 12: 5051-5056

Kägi J.H. und Schäffer A. (1988) Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* 27:8509-8515

Kampfenkel K., Kushnir S., Babiychuk E., Inze D., Van Montagu M. (1995) Molecular characterization of a putative *Arabidopsis thaliana* copper transporter and its yeast homologue. *J Biol Chem* 270: 28479-28486

Karin M., Najarian R., Haslinger A., Valenzuela P., Welch J., Fogel S. (1984) Primary structure and transcription of an amplified genetic locus: the CUP1 locus of yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 337-341

Keller G., Ray E., Brown P.O., Winge D.R. (2001) Haa1, a protein homologous to the copper-regulated transcription factor Ace1, is a novel transcriptional activator. *J Biol Chem* 276: 38697-38702; vorab online veröffentlicht 14. August 2001, DOI:10.1074/jbc.M107131200

Keller G., Bird A., Winge D.R. (2005) Independent metalloregulation of Ace1 and Mac1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4: 1863-1871

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257

Khalimonchuk O. und Rödel G. (2005) Biogenesis of cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 5: 363-388; vorab online veröffentlicht 29. September 2005, DOI:10.1016/j.mito.2005.08.002

Khalimonchuk O., Ostermann K., Rödel G. (2005) Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox11p, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* 47: 223-233; vorab online veröffentlicht 18. März 2005, DOI:10.1007/s00294-005-0569-1

Khalimonchuk O., Bird A., Winge D.R. (2007) Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* online veröffentlicht 12. April 2007, DOI:10.1074/jbc.M702379200

Kim R., Emi M., Tanabe K. (2006) Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57:545-553; vorab online veröffentlicht 21. September 2005, DOI:10.1007/s00280-005-0111-7

Klockenkämper R. (1997) Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis, Wiley-Interscience, New York

Klomp L.W., Lin S.J., Yuan D.S., Klausner R.D., Culotta V.C., Gitlin J.D. (1997) Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem* 272: 9221-9226

Knight S.A., Labbe S., Kwon L.F., Kosman D.J., Thiele D.J. (1996) A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 10: 1917-1929

Literatur

- Koch K.A., Pena M.M., Thiele D.J. (1997)** Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem Biol* 4: 549-560
- Kosman D.J. (2002)** FET3p, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism. *Adv Protein Chem* 60: 221-269
- Kosman D.J. (2003)** Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. *Mol Microbiol* 47: 1185-1197
- Krummeck G. und Rödel G. (1990)** Yeast SCO1 protein is required for a post-translational step in the accumulation of mitochondrial cytochrome c oxidase subunits I and II. *Curr Genet* 18: 13-15
- Kück U., Stahl U., Esser K. (1981)** Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Curr Genet* 3: 151-156
- Kück U., Osiewacz H.D., 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
- Kujoth G.C., Hiona A., Pugh T.D., Someya S., Panzer K., Wohlgenuth S.E., Hofer T., Seo A.Y., Sullivan R., Jobling W.A., Morrow J.D., Van Remmen H., Sedivy J.M., Yamasoba T., Tanokura M., Weindruch R., Leeuwenburgh C., Prolla T.A. (2005)** Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* 309: 481-488
- Labbé S., Zhu Z., Thiele D.J. (1997)** Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* 272: 15951-15958
- Labbé S., Pena M.M., Fernandes A.R., Thiele D.J. (1999)** A copper-sensing transcription factor regulates iron uptake genes in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 274: 36252-36260
- Lamb A.L., Wernimont A.K., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (1999)** Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol* 6: 724-729
- Lamb A.L., Wernimont A.K., Pufahl R.A., O'Halloran T.V., Rosenzweig A.C. (2000)** Crystal structure of the second domain of the human copper chaperone for superoxide dismutase. *Biochemistry* 39: 1589-1595
- Landis G.N. und Tower J. (2005)** Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126: 365-379
- Larin D., Mekios C., Das K., Ross B., Yang A.S., Gilliam T.C. (1999)** Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J Biol Chem* 274: 28497-29504
- Leary S.C., Kaufman B.A., Pellecchia G., Guercin G.H., Mattman A., Jaksch M., Shoubridge E.A. (2004)** Human SCO1 and SCO2 have independent, cooperative functions in copper delivery to cytochrome c oxidase. *Hum Mol Genet* 13: 1839-1848
- Leary S.C., Cobine P.A., Kaufman B.A., Guercin G.H., Mattman A., Palaty J., Lockitch G., Winge D.R., Rustin P., Horvath R., Shoubridge E.A. (2007)** The human cytochrome c oxidase assembly factors SCO1 and SCO2 have regulatory roles in the maintenance of cellular copper homeostasis. *Cell Metab* 5: 9-20
- Lichtlen P. und Schaffner W. (2001)** Putting its fingers on stressful situations: the heavy metal-regulatory transcription factor MTF-1. *Bioessays* 23: 1010-1017
- Lin S.J. und Culotta V.C. (1995)** The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3784-3788
- Lin S.J., Pufahl R.A., Dancis A., O'Halloran T.V., Culotta V.C. (1997)** A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* 272: 9215-9220
- Linnane A.W. und Eastwood H. (2006)** Cellular redox regulation and prooxidant signaling systems: a new perspective on the free radical theory of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1067: 47-55
- Lode A., Kuschel M., Paret C., Rödel G. (2000)** Mitochondrial copper metabolism in yeast: interaction between Sco1p and Cox2p. *FEBS Lett* 485: 19-24

Literatur

- Lode A., Paret C., Rödel G. (2002)** Molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Sco2p reveals a high degree of redundancy with Sco1p. *Yeast* 19: 909-922
- 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
- Lorin S., Dufour E., Sainsard-Chanet A. (2006)** Mitochondrial metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Biochim Biophys Acta* 1757: 604-610; vorab online veröffentlicht 30. März 2006, DOI:10.1016/j.bbabi.2006.03.005
- Macdonald P. (2001)** Diversity in translational regulation. *Curr Opin Cell Biol* 13: 326-331
- Madeo F., Herker E., Wissing S., Jungwirth H., Eisenberg T., Frohlich K.U. (2004)** Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol* 7: 655-660
- Martins L.J., Jensen L.T., Simon J.R., Keller G.L., Winge D.R. (1998)** Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 23716-23721
- Mattie M.D. and Freedman JH. (2004)** Copper-inducible transcription: regulation by metal- and oxidative stress-responsive pathways. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C293-301; vorab online veröffentlicht 22. Oktober 2003, DOI:10.1152/ajpcell.00293.2003
- Maxfield A.B., Heaton D.N., Winge D.R. (2004)** Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 279: 5072-5080; vorab online veröffentlicht 13. November 2003, DOI: 10.1074/jbc.M311772200
- McCarthy J.V. (2003)** Apoptosis and development. *Essays Biochem* 39: 11-24
- McDonnell T.J., Nunez G., Platt F.M., Hockenberry D., London L., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. (1990)** Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 10: 1901-1907
- McEwan A.G., Lewin A., Davy S.L., Boetzel R., Leech A., Walker D., Wood T., Moore G.R. (2002)** *PrrC* from *Rhodobacter sphaeroides*, a homologue of eukaryotic Sco proteins, is a copper-binding protein and may have a thiol-disulfide oxidoreductase activity. *FEBS Lett* 518: 10-16; vorab online veröffentlicht 9. April 2002, DOI:10.1016/S0014-5793(02)02532-2
- Meier P., Finch A., Evan G. (2000)** Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801
- Meyer S., Temme C., Wahle E. (2004)** Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 39: 197-216
- Mira H., Martinez N., Penarrubia L. (2002)** Expression of a vegetative-storage-protein gene from *Arabidopsis* is regulated by copper, senescence and ozone. *Planta* 214: 939-946; vorab online veröffentlicht 9. Januar 2002, DOI:10.1007/s00425-001-0706-0
- Mukhopadhyay C.K., Attieh Z.K., Fox P.L. (1998)** Role of ceruloplasmin in cellular iron uptake. *Science* 279: 714-717
- Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. (2004)** Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* 279: 49064-49073; vorab online veröffentlicht 17. August 2004, DOI:10.1074/jbc.M407715200
- Murata M., Gong P., Suzuki K., Koizumi S. (1999)** Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible genes. *J Cell Physiol* 180: 105-113
- Newbury S.F. (2006)** Control of mRNA stability in eukaryotes. *Biochem Soc Trans* 34: 30-34
- Nittis T., George G.N., Winge D.R. (2001)** Yeast Sco1, a protein essential for cytochrome c oxidase function is a Cu(I)-binding protein. *J Biol Chem* 276: 42520-42526; vorab online veröffentlicht 6. September 2001, DOI:10.1074/jbc.M107077200

Literatur

- Nobrega M.P., Bandeira S.C., Beers J., Tzagoloff A. (2002)** Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem* 277: 40206-40211; vorab online veröffentlicht 8. August 2002, DOI:10.1074/jbc.M207348200
- O'Brien K.M., Dirmeier R., Engle M., Poyton R.O. (2004)** Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(MnSOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage. *J Biol Chem* 279: 51817-51827; vorab online veröffentlicht 21. September 2004, DOI:10.1074/jbc.M405958200
- O'Halloran T.V. und Culotta V.C. (2000)** Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 275: 25057-25060
- Olivas W. und Parker R. (2000)** The Puf3 protein is a transcript-specific regulator of mRNA degradation in yeast. *EMBO J* 19: 6602-6611
- Ooi C.E., Rabinovich E., Dancis A., Bonifacino J.S., Klausner R.D. (1996)** Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J* 15: 3515-3523
- Osiewacz H.D. und Esser K. (1984)** The mitochondrial plasmid of *Podospira anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr Genet* 8: 299-305
- Osiewacz H.D. (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 H.D. und Nuber U. (1996)** GRISEA, a putative copper-activated transcription factor from *Podospira anserina* involved in differentiation and senescence. *Mol Gen Genet* 252: 115-124
- Osiewacz H.D. (2002)** Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res Rev* 1: 425-442
- Osiewacz H.D. und Scheckhuber C.Q. (2006)** Impact of ROS on ageing of two fungal model systems: *Saccharomyces cerevisiae* and *Podospira anserina*. *Free Radic Res* 40: 1350-1358
- Palminter R.D. (1998)** The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8428-8430
- Papadopoulou L.C., Sue C.M., Davidson M.M., Tanji K., Nishino I., Sadlock J.E., Krishna S., Walker W., Selby J., Glerum D.M., Coster R.V., Lyon G., Scalais E., Lebel R., Kaplan P., Shanske S., De Vivo D.C., Bonilla E., Hirano M., DiMauro S., Schon E.A. (1999)** Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23: 333-337
- Paret C., Ostermann K., Krause-Buchholz U., Rentzsch A., Rödel G. (1999)** Human members of the SCO1 gene family: complementation analysis in yeast and intracellular localization. *FEBS Lett* 447: 65-70
- Paret C., Lode A., Krause-Buchholz U., Rödel G. (2000)** The P(174)L mutation in the human hSCO1 gene affects the assembly of cytochrome c oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 341-347
- Parker R. und Song H. (2004)** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* 11: 121-127
- Pena M.M., Puig S., Thiele D.J. (2000)** Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* high affinity copper transporter Ctr3. *J Biol Chem* 275: 33244-33251; vorab online veröffentlicht 2. August 2000, DOI:10.1074/jbc.M005392200
- Petris M.J., Mercer J.F., Culvenor J.G., Lockhart P., Gleeson P.A., Camakaris J. (1996)** Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *EMBO J* 15: 6084-6095
- Petris M.J., Smith K., Lee J., Thiele D.J. (2003)** Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem* 278: 9639-9646; vorab online veröffentlicht 25. Dezember 2002, DOI:10.1074/jbc.M209455200
- Petrukhin K., Lutsenko S., Chernov I., Ross B.M., Kaplan J.H., Gilliam T.C. (1994)** Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* 3: 1647-1656

Literatur

- Petruzzella V., Tiranti V., Fernandez P., Ianna P., Carrozzo R., Zeviani M. (1998)** Identification and characterization of human cDNAs specific to BCS1, PET112, SCO1, COX15, and COX11, five genes involved in the formation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Genomics* 54:494-504
- Pierrel F., Cobine P.A., Winge D.R. (2007)** Metal Ion availability in mitochondria. *Biometals* 20: 675-682; vorab online veröffentlicht 16. Januar 2007, DOI:10.1007/s10534-006-9052-9
- Pilon M., Abdel-Ghany S.E., Cohu C.M., Gogolin K.A., Ye H. (2006)** Copper cofactor delivery in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 9: 256-263; vorab online veröffentlicht 17. April 2006, DOI:10.1016/j.pbi.2006.03.007
- Pöggeler S., Masloff S., Hoff B., Mayrhofer S., Kück U. (2003)** Versatile EGFP reporter plasmids for cellular localization of recombinant gene products in filamentous fungi. *Curr Genet* 43: 54-61; vorab online veröffentlicht 31. Januar 2003, DOI:10.1007/s00294-003-0370-y
- Portnoy M.E., Rosenzweig A.C., Rae T., Huffman D.L., O'Halloran T.V., Culotta V.C. (1999)** Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem* 274: 15041-15045
- Portnoy M.E., Schmidt P.J., Rogers R.S., Culotta V.C. (2001)** Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 265: 873-882; vorab online veröffentlicht 17. Mai 2001, DOI:10.1007/s004380100482
- Prillinger H. und Esser K. (1977)** The phenoloxidases of the ascomycete *Podospira anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol Gen Genet* 156: 333-345
- Pufahl R.A., Singer C.P., Peariso K.L., Lin S J., Schmidt P.J., Fahrni C.J., Culotta V.C., Penner-Hahn J.E., O'Halloran T.V. (1997)** Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* 278: 853-856
- Puig S. und Thiele D.J. (2002)** Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* 6: 171-180
- Puig S., Andres-Colas N., Garcia-Molina A., Penarrubia L. (2007)** Copper and iron homeostasis in *Arabidopsis*: responses to metal deficiencies, interactions and biotechnological applications. *Plant Cell Environ* 30: 271-290
- Punt P.J., Oliver R.P., Dingemans M.A., Pouwels P.H., van den Hondel C.A. (1987)** Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene* 56: 117-124
- Rad M.R., Kirchrath L., Hollenberg C.P. (1994)** A putative P-type Cu(2+)-transporting ATPase gene on chromosome II of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1217-1225
- Rae T.D., Schmidt P.J., Pufahl R.A., Culotta V.C., O'Halloran T.V. (1999)** Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* 284: 805-808
- Rees E.M., Lee J., Thiele D.J. (2004)** Mobilization of intracellular copper stores by the ctr2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem* 279: 54221-54229; vorab online veröffentlicht 19. Oktober 2001, DOI:10.1074/jbc.M411669200
- Reinecke F., Levanets O., Olivier Y., Louw R., Semete B., Grobler A., Hidalgo J., Smeitink J., Olckers A., Van der Westhuizen F.H. (2006)** Metallothionein isoform 2A expression is inducible and protects against ROS-mediated cell death in rotenone-treated HeLa cells. *Biochem J* 395: 405-415
- Rentzsch A., Krummeck-Weiss G., Hofer A., Bartuschka A., Ostermann K., Rödel G. (1999)** Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* 35: 103-108
- Richards M.P. (1989)** Recent developments in trace element metabolism and function: role of metallothionein in copper and zinc metabolism. *J Nutr* 119: 1062-1070
- Rigby K., Zhang L., Cobine P.A., George G.N., Winge D.R. (2007)** characterization of the cytochrome c oxidase assembly factor Cox19 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 282: 10233-10242; vorab online veröffentlicht 19. Januar 2007, DOI:10.1074/jbc.M610082200
- Rizet G. (1953)** Sur la longevite des phenomen des souches de *Podospira anserina*. *C R Acad Sci Paris* 237:1106-1109

Literatur

- Rosenzweig A.C. (2001)** Copper Delivery by Metallochaperone Proteins. *Acc Chem Res* 34: 119-128
- Rosenzweig A.C. (2002)** Metallochaperones: bind and deliver. *Chem Biol* 9: 673-677
- Rutherford J.C. und Bird A.J. (2004)** Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot Cell* 3: 1-13
- Sacconi S., Trevisson E., Pistollato F., Baldoin M.C., Rezzonico R., Bourget I., Desnuelle C., Tenconi R., Basso G., DiMauro S., Salviati L. (2005)** hCOX18 and hCOX19: two human genes involved in cytochrome c oxidase assembly. *Biochem Biophys Res Commun* 337: 832-839; vorab online veröffentlicht 29. September 2005, DOI:10.1016/j.bbrc.2005.09.127
- Sainsard-Chanet A., Begel O., d'Aubenton-Carafa Y. (1998)** Two co-existing mechanisms account for the large-scale deletions of mitochondrial DNA in *Podospora anserina* that involve the 5' border of a group-II intron. *Curr Genet* 34: 326-335
- Saraste M. (1999)** Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283: 1488-1493
- Scheckhuber C.Q., Erjavec N., Tinazli A., Hamann A., Nystrom T., Osiewacz H.D. (2007)** Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat Cell Biol* 9: 99-105; vorab online veröffentlicht 7. Dezember 2006, DOI:10.1038/ncb1524
- Schmidt P.J., Ramos-Gomez M., Culotta V.C. (1999 A)** A gain of superoxide dismutase (SOD) activity obtained with CCS, the copper metallochaperone for SOD1. *J Biol Chem* 274: 36952-36956
- Schmidt P.J., Rae T.D., Pufahl R.A., Hamma T., Strain J., O'Halloran T.V., Culotta V.C. (1999 B)** Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 274: 23719-23725
- Schulze M., Roedel G.(1989)** Accumulation of the cytochrome c oxidase subunits I and II in yeast requires a mitochondrial membrane-associated protein, encoded by the nuclear SCO1 gene. *Mol Gen Genet* 216: 37-43
- Sellem C.H., Lecellier G., Belcour L. (1993)** Transposition of a group II intron. *Nature* 366: 176-178
- Sellem C.H., Marsy S., Boivin A., Lemaire C., Sainsard-Chanet A. (2006)** A mutation in the gene encoding cytochrome c(1) leads to a decreased ROS content and to a long-lived phenotype in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal Genet Biol* online veröffentlicht 1. November 2006, DOI:10.1016/j.fgb.2006.09.005
- Selvaraj A., Balamurugan K., Yepiskoposyan H., Zhou H., Egli D., Georgiev O., Thiele D.J., Schaffner W. (2005)** Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev* 19: 891-896
- Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. (2005)** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2: 905-909
- Shetty R.S., Deo S.K., Liu Y., Daunert S. (2004)** Fluorescence-based sensing system for copper using genetically engineered living yeast cells. *Biotechnol Bioeng* 88: 664-670
- Singh A., Severance S., Kaur N., Wiltsie W., Kosman D.J. (2006)** Assembly, activation, and trafficking of the Fet3p.Ftr1p high affinity iron permease complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 281: 13355-13364; vorab online veröffentlicht 7. März 2006, DOI:10.1074/jbc.M512042200
- Singleton C. und Le Brun N.E. (2007)** Atx1-like chaperones and their cognate P-type ATPases: copper-binding and transfer. *Biometals* 20: 275-289; vorab online veröffentlicht 16. Januar 2007, DOI:10.1007/s10534-006-9068-1
- Sluse F.E. und Jarmuszkiewicz W. (1998)** Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Braz J Med Biol Res* 31: 733-747
- Smits P.H.M., de Haan M., Maat C., Grivell L.A. (1994)** The complete sequence of a 33 kb fragment on the right arm of chromosome II from *Saccharomyces cerevisiae* reveals 16 open reading frames, including ten new open reading frames, five previously identified genes and a homologue of the SCO1 gene. *Yeast* 10: S75-S80
- Song M.O. und Freedman J.H. (2005)** Expression of copper-responsive genes in HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 279: 141-147

Literatur

- Stahl U., Lemke P.A., Tudzynski P., Kück U., Esser K. (1978)** Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospira anserina*. Mol Gen Genet 162: 341-343
- Stahl U., Tudzynski P., Kück U., Esser K. (1982)** Replication and expression of a bacterial--mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospira anserina*. Proc Natl Acad Sci U S A 79: 3641-3645
- Stearman R., Yuan D.S., Yamaguchi-Iwai Y., Klausner R.D., Dancis A. (1996)** A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science 271: 1552-1557
- Steller H. (1995)** Mechanisms and genes of cellular suicide. Science 267: 1445-1449
- St-Pierre J., Buckingham J.A., Roebuck S.J., Brand M.D. (2004)** Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J Biol Chem 277: 44784-44790; vorab online veröffentlicht 16. September 2002, DOI:10.1074/jbc.M207217200
- Stumpferl S.W., Stephan O., Osiewacz H.D. (2004)** Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospira anserina* metabolism and life span, Eukaryotic Cell 3: 200-211
- Sturtz L.A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R., Culotta V.C. (2001)** A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. J Biol Chem 276: 38084-38089; vorab online veröffentlicht 10. August 2001, DOI:10.1074/jbc.M105296200
- Supek F., Supekova L., Nelson H., Nelson N. (1996)** A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 5105-5110
- Takahashi N., Ortel T.L., Putnam F.W. (1984)** Single-chain structure of human ceruloplasmin: the complete amino acid sequence of the whole molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 81: 390-394
- Tapia L., Suazo M., Hodar C., Cambiazo V., Gonzalez M. (2003)** Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells. Biometals 16: 169-174
- Terziyska N., Lutz T., Kozany C., Mokranjac D., Mesecke N., Neupert W., Herrmann J.M., Hell K. (2005)** Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions. FEBS Lett 579: 179-184
- Thiele D.J. (1988)** ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. Mol Cell Biol 8: 2745-2752
- Thornalley P.J. und Vasak M. (1985)** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. Biochim Biophys Acta 827: 36-44
- Toussaint O., Royer V., Salmon M., Remacle J. (2002)** Stress-induced premature senescence and tissue ageing. Biochem Pharmacol 64: 1007-1009
- Trifunovic A., Hansson A., Wredenberg A., Rovio A.T., Dufour E., Khvorostov I., Spelbrink J.N., Wibom R., Jacobs H.T., Larsson N.G. (2005)** Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 17993-17998; vorab online veröffentlicht 6. Dezember 2005, DOI:10.1073/pnas.0508886102
- Tudzynski P. und Esser K. (1977)** Inhibitors of mitochondrial function prevent senescence in the ascomycete *Podospira anserina*. Mol Gen Genet 153: 111-113
- Tzagoloff A., Capitanio N., Nobrega M.P., Gatti D. (1990)** Cytochrome oxidase assembly in yeast requires the product of COX11, a homolog of the *P. denitrificans* protein encoded by ORF3. EMBO J 9: 2759-2764
- Umbach A.L. und Siedow J.N. (2000)** The cyanide-resistant alternative oxidases from the fungi *Pichia stipitis* and *Neurospora crassa* are monomeric and lack regulatory features of the plant enzyme. Arch Biochem Biophys 378: 234-245
- Valko M., Morris H., Cronin MT. (2005)** Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem 12: 1161-1208
- Vanlerberghe G.C. und McIntosh L. (1997)** Alternative oxidase: from gene to function. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 48: 703-734

Literatur

- Varela-Nallar L., Toledo E.M., Larrondo L.F., Cabral A.L., Martins V.R., Inestrosa N.C. (2006)** Induction of cellular prion protein gene expression by copper in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* 290: C271-281; vorab online veröffentlicht 7. September 2005, DOI:10.1152/ajpcell.00160.2005
- Verbeet M.P., Klootwijk J., van Heerikhuizen H., Fontijn R., Vreugdenhil E., Planta R.J. (1983)** Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene* 23: 53-63
- Vulpe C.D., Levinson B., Whitney S., Packman S., Gitschier J. (1993)** Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet* 3: 7-13
- Waalkes M.P. und Goering P.L. (1990)** Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. *Chem Res Toxicol* 3: 281-288
- Wakabayashi T., Nakamura N., Sambongi Y., Wada Y., Oka T., Futai M. (1998)** Identification of the copper chaperone, CUC-1, in *Caenorhabditis elegans*: tissue specific co-expression with the copper transporting ATPase, CUA-1. *FEBS Lett* 440: 141-146
- Walker J.M., Huster D., Ralle M., Morgan C.T., Blackburn N.J., Lutsenko S. (2004)** The N-terminal metal-binding site 2 of the Wilson's Disease Protein plays a key role in the transfer of copper from Atox1. *J Biol Chem* 279: 15376-15384; vorab online veröffentlicht 30. Januar 2004, DOI:10.1074/jbc.M400053200
- Wang X. (2001)** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-2933
- Wernimont A.K., Yatsunyk L.A., Rosenzweig A.C. (2004)** Binding of copper(I) by the Wilson disease protein and its copper chaperone. *J Biol Chem* 279: 12269-12276; vorab online veröffentlicht 6. Januar 2004, DOI:10.1074/jbc.M311213200
- Wilkie G.S., Dickson K.S., Gray N.K. (2003)** Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28: 182-188
- Williams J.C., Sue C., Banting G.S., Yang H., Glerum D.M., Hendrickson W.A., Schon E.A. (2005)** Crystal structure of human SCO1: implications for redox signaling by a mitochondrial cytochrome c oxidase "assembly" protein. *J Biol Chem* 280: 15202-15211; vorab online veröffentlicht 12. Januar 2005, DOI:10.1074/jbc.M410705200
- Winge D.R., Nielson K.B., Gray W.R., Hamer D.H. (1985)** Yeast metallothionein. Sequence and metal-binding properties. *J Biol Chem* 260: 14464-14470
- Wittershagen A., Rostam-Khani P., Zickermann V., Zickermann I., Gemeinhardt S., Ludwig B., Kolbesen B. O. (1998)** Determination of metal-cofactors in respiratory chain complexes by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry (TXRF) *Fresenius J Anal Chem* 361: 326-328
- Yamaguchi-Iwai Y., Serpe M., Haile D., Yang W., Kosman D.J., Klausner R.D., Dancis A. (1997)** Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem* 272: 17711-17718
- Yang L., McRae R., Henary M.M., Patel R., Lai B., Vogt S., Fahrni C.J. (2005)** Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 11179-11184; vorab online veröffentlicht 1. August 2005, DOI: 10.1073/pnas.0406547102
- Yasuda K., Ishii T., Suda H., Akatsuka A., Hartman P.S., Goto S., Miyazawa M., Ishii N. (2006)** Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 127: 763-770; vorab online veröffentlicht 7. August 2006, DOI:10.1016/j.mad.2006.07.002
- Yuan D.S., Stearman R., Dancis A, Dunn T., Beeler T., Klausner R.D. (1995)** The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2632-2636
- Zacharias D.A., Violin J.D., Newton A.C., Tsien R.Y. (2002)** Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296: 913-916
- Zee J.M. und Glerum D.M. (2006)** Defects in cytochrome oxidase assembly in humans: lessons from yeast. *Biochem Cell Biol* 84: 859-869

Literatur

Zickermann V., Wittershagen A., Kolbesen B.O., Ludwig B. (1997) Transformation of the CuA redox site in cytochrome c oxidase into a mononuclear copper center. *Biochemistry* 36: 3232-3236

Zhang B., Egli D., Georgiev O., Schaffner W. (2001) The Drosophila homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol Cell Biol* 21: 4505-4514

Zhang B., Georgiev O., Hagmann M., Günes C., Cramer M., Faller P., Vasak M., Schaffner W. (2003) Activity of metal-responsive transcription factor 1 by toxic heavy metals and H₂O₂ in vitro is modulated by metallothionein. *Mol Cell Biol* 23: 8471-8485

Zhou J. und Goldsbrough P.B. (1994) Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. *Plant Cell* 6: 875-884

Zhou J. und Goldsbrough P.B. (1995) Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in *Arabidopsis*. *Mol Gen Genet* 248: 318-328

Zhou P.B. und Thiele D.J. (1991) Isolation of a metal-activated transcription factor gene from *Candida glabrata* by complementation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:6112-6116

Zoratti M. und Szabo I. (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241: 139-176

Diplomarbeiten

K. Jezek (2005) Untersuchungen zur Bedeutung von mitochondrialem Kupfer für die Alterung von *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften; JW Goethe Universität, Frankfurt am Main

B. Kunstmann (2004) Vergleichende Proteomanalyse bei dem Ascomyceten *Podospora anserina* unter besonderer Berücksichtigung mitochondrialer Proteine; Fachbereich Biologie, JW Goethe-Universität, Frankfurt am Main

K. Masic (2007) Untersuchungen zur Funktion der Kupfertransporter PaCTR2 und PaCTR3 in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften; JW Goethe Universität, Frankfurt am Main

Dissertationen

N. B. Averbek (1999) Die zelluläre Kupferhomöostase und Alterungsprozesse des Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biologie; JW Goethe Universität, Frankfurt am Main

A. Hamann (2000) Charakterisierung repetitiver Sequenzen bei Hyphenpilzen. Fachbereich Biologie; JW Goethe Universität, Frankfurt am Main

S. W. Stumpferl (2005) Molekulare Grundlagen des Kupfermetabolismus bei dem Ascomyceten *Podospora anserina*: Die Bedeutung von Kupfer für die mitochondriale Funktion. Fachbereich Biologie und Informatik; JW Goethe Universität, Frankfurt am Main

Abkürzungsverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
A. bid	doppelt destilliertes Wasser
ADP	Adenosin Diphosphat
AOX	alternative Oxidase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin Triphosphat
bp	Basenpaare
bzgl.	bezüglich
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA
COX	Cytochrom c Oxidase
CSPD	3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'Chloro)tricyclo [3.3.1.1.3,7]decan}-4-yl
CTP	Cytosin Triphosphat
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eGFP	enhanced green fluorescence protein (engl. „verbessertes grün-fluoreszierendes Protein“)
GTP	Guanosin Triphosphat
kb	Kilo-Basenpaare
KCN	Kalium Cyanid
kDa	Kilo-Dalton
MPT	mitochondrial permeability transition (engl. „Veränderung der mitochondrialen Permeabilität“)
mRNA	messenger-RNA (engl. „Boten-RNA“)
mtDNA	mitochondriale DNA
MTS	mitochondrial targeting sequence (engl. „mitochondriale Zielsequenz“)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
OD	optische Dichte

ORF	open reading frame (engl. „offener Leserahmen“)
PCR	polymerase chain reaction (engl. „Polymerase Kettenreaktion“)
pDNA	plasmid-like DNA (engl. „plasmid-ähnliche DNA“)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species (engl. „reaktive Sauerstoff-Spezies“)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit vorhergehender reverser Transkription mRNA → cDNA
SDS	sodium dodecylsulfat (engl. „Natrium Dodecylsulfat“)
SHAM	Salicyl-Hydroxaminsäure
s.o.	siehe oben
SOD	Superoxid Dismutase
s.u.	siehe unten
TM	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidin Triphosphat
TXRF	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Spektometrie
Upm	Umdrehungen pro Minute
v.a.	vor allem
(v/v)	volume per volume (engl. „Volumen pro Volumen“)
(w/v)	weight per volume (engl. „Gewicht pro Volumen“)

8. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Übersicht über die Maschinerie der molekularen Kupferhomöostase in *S. cerevisiae*.

Abb. 2: Die Elektronentransportkette in *P. anserina* ist eine Mischung aus Standard- und alternativen Reaktionswegen.

Abb. 3: Expressions-Analyse von *PaCcs1*, *PaAtx1* und *PaCox19*.

Abb. 4: Der Promotor des putativen Gens *PaCcc2* ermöglicht die Expression von *eGfp*.

Abb. 5: Der Promotor des putativen Gens *PaCcs1* ermöglicht die Expression von *eGfp*.

Abb. 6: Sequenzvergleich zwischen dem vorhergesagten PaCOX23 und COX23 aus *S. cerevisiae*.

Abb. 7: Sequenzvergleich zwischen dem vorhergesagten PaSCO1 und SCO1 und SCO2 aus *S. cerevisiae* bzw. *H. sapiens*.

Abb. 8: Versuch der Komplementation einer $\Delta sco1$ -Hefemutante durch PaSCO1.

Abb. 9: Sequenzvergleich zwischen dem vorhergesagten PaCOX11 und COX11 aus *S. cerevisiae* und *H. sapiens*.

Abb. 10: Vergleich der Expression von *PaCox17*, *PaCox11*, *PaCox23* und *PaSco1* im Wildstamm *s* und in den beiden Kupferstoffwechsel-Mutanten *grisea* und $\Delta PaCox17$.

Abb. 11: Altersabhängige Expression von *PaCox17*, *PaCox11*, *PaCox23* und *PaSco1* im Wildstamm *s*.

Abb. 12: Vergleich der Ergebnisse von Northern Blot Analyse und semiquantitativer RT-PCR für die Untersuchung der Expression von *PaCox11* in zwei juvenilen und seneszenten Wildstamm-Kulturen.

Abb. 13: Durch Verwendung von oligo(dT)-Primern bei der Erststrangsynthese werden *PaCox11*-mRNA-Moleküle ohne intakten Poly(A)-Schwanz nicht erfasst im Gegensatz zu Northern Blot Analysen.

Abb. 14: Schematische Darstellung des allgemeinen Austausch-Plasmids pHuB-AT-1.

Abb. 15: Southern Blot Analyse zur Verifizierung des erfolgreichen Austauschs Leserahmen \leftrightarrow Resistenzkassette auf den Cosmiden 36E11 (*PaSco1*) und 29D8 und 29G11 (beide *PaCox23*).

Abb. 16: Schematische Darstellung der PCR-Strategie zur Identifizierung Falsch-Positiver potentieller Deletionsstämme.

Abb. 17: Reorganisation der mtDNA als Biomarker für Seneszenz.

Abb. 18: Grafische Darstellung des gemittelten Kupfergehalts in Mitochondrien und Cytosol isoliert aus juvenilen und seneszenten Kulturen von *P. anserina*.

Abb. 19: Grafische Darstellung der gemittelten Verhältnisse von mitochondrialer und cytoplasmatischer Kupferkonzentration in juvenilen und seneszenten Kulturen von *P. anserina*

Abb. 20: Plasmid zur Expression von eGFP, welches mittels MTS in die Mitochondrien transportiert wird.

Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Primärtransformante GFP 8.

Abb. 22: Digitonin-Assay zum Nachweis der korrekten Funktionalität der verwendeten MTS

Abb. 23: Bestandteile der mitochondrialen Matrix finden sich im Alter in der gesamten Zelle wieder.

Abb. 24: Western Blot Analysen bestätigen die Ergebnisse der fluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen.

Danksagung

Danksagung

Ich danke

Prof. Dr. H. D. Osiewacz dafür, dass er mir dieses sehr interessante Thema für meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat und für die Finanzierung dieser Arbeit. Weiterhin bin ich ihm sehr dankbar für alles, was ich durch ihn und von ihm lernen konnte.

Prof. Dr. C. Büchel, dafür dass sie das Zweitgutachten über diese Arbeit erstellt.

allen Hochschullehrern, die für meine wissenschaftliche Ausbildung verantwortlich waren.

dem ganzen Arbeitskreis von Prof. Dr. Osiewacz. Besonders möchte ich erwähnen: Dr. Andrea Hamann, ohne die sehr vieles nicht möglich wäre und nicht laufen würde. Sie war stets das notwendige Korrektiv meiner Ideen. Karin Jezek, die mich auf ihrem Weg von der Praktikantin über Diplomandin hin zur Doktorandin stets ertragen hat. Diana Brust und Mathis Müller-Ohldach v.a. für die „ausseruniversitären“ Gespräche. Birgit Kunstmann, die sich leider kleiner macht als sie ist. Markus Bucher, Kadina Masic, Frau Tarazi, Christian Scheckhuber, Alexandra Werner, Sigi Kost und alle Diplomanden und Praktikanten.

meinen Eltern, die mich stets finanziell aber vor allem moralisch unterstützt haben, meiner Schwester und dem Rest meiner Familie.

meiner Freundin Susanne, der ich einfach nur DANKE sagen kann, weil mir für mehr die richtigen Worte fehlen.

allen, die ich vergessen habe, hier zu erwähnen.

Publikationsliste

Gredilla R, Grief J, Osiewacz HD (2006) Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp Gerontol* 41: 439–447; vorab online veröffentlicht 10. März 2006 doi:10.1016/j.exger.2006.01.010

Schmidt M, Grief J, Feierabend J (2006) Mode of translational activation of the catalase (cat1) mRNA of rye leaves (*Secale cereale L.*) and its control through blue light and reactive oxygen. *Planta* 223: 835–846; vorab online veröffentlicht 23. Februar 2006 doi: 10.1007/s00425-005-0125-8

LEBENS LAUF



Jürgen Grief
Geboren: 10. November 1977
in 92242 Hirschau
Familienstand: ledig
Eltern: Heinz und Maria Grief, geb. Regler

Schulbildung

1984 bis 1988 Grund- und Hauptschule, 92242 Hirschau
1988 bis 1997 Erasmus-Gymnasium, 92224 Amberg

Abschluss: Abitur am Erasmus-Gymnasium

Wehrdienst

01.09.1997 - 30.06.1998 2./FjgBtl 760; 92224 Amberg

Studium

10 / 1998 – 06 / 2003 Studium der Biologie
Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main

10 / 2002 - 06 / 2003 Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Feierabend,
Botanisches Institut, JW Goethe-Universität,
Frankfurt am Main
Titel der Arbeit:
"Vergleich struktureller Eigenschaften und der
Translation in vitro der mRNA einer pflanzlichen
Katalase"

Abschluss: Diplom Biologe "mit Auszeichnung" (1,0)

Promotion

01.08.2003 - 30.11.2006 Wissenschaftl. Mitarbeiter im Arbeitskreis
Prof. Dr. Osiewacz, Institut für molekulare
Biowissenschaften, JW Goethe-Universität,
Frankfurt am Main