

**Analyse differentiell-gebildeter mitochondrialer Proteine während  
des Alterns in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina*  
und Charakterisierung der O-Methyltransferase PaMTH1**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

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

von Birgit Kunstmann  
aus Hamm (Westf.)

Frankfurt am Main 2009  
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. V. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. H. D. Osiewacz
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation:

II

## **KONVENTION**

Zur Schreibweise von Genen und Proteinen in dieser Arbeit: Gene werden kursiv geschrieben, die ersten zwei Buchstaben kürzen den Artnamen ab, wenn sie einer bestimmten Spezies zugeordnet werden (z. B. *ScMdv*, *PaMth1*). Bei der Bezeichnung von Proteinen bestimmter Spezies wird ebenfalls zuerst der Artnamen abgekürzt. Bis auf den zweiten Buchstaben der Artabkürzung wird Großschrift verwendet (z.B. ScMDV1, PaMTH1). Folgende Ausnahmen gelten: *Grisea* (*P. anserina*-Gen) und GRISEA (*P. anserina*-Protein).

*„Wer fragt, ist ein Narr für eine Minute. Wer nicht fragt, ist ein Narr sein Leben lang.“*

Konfuzius (Kong Qui), 551 v. Chr.- 479 v. Chr.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>ALTERN UND MOLEKULARE ALTERNSFORSCHUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>DIFFERENTIELLE PROTEOMANALYSE MIT HILFE VON ZWEIDIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESEN.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>ENTSTEHUNG UND WIRKUNGSWEISEN REAKTIVER SAUERSTOFF-SPEZIES .....</b>	<b>4</b>
1.3.1	DIE ROS-ENTSTEHUNG IN DER MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTE .....	4
1.3.2	ENTSTEHUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES DURCH CATECHOLGRUPPEN-HALTIGE VERBINDUNGEN .....	6
<b>1.4</b>	<b>OXIDATIVE PROTEINSCHÄDEN UND BIOCHEMISCHE NACHWEISMÖGLICHKEITEN IN DER ANALYSE VON PROTEOMEN .....</b>	<b>11</b>
1.4.1	ENTSTEHUNG VON CARBONYLGRUPPEN AN PROTEINEN .....	11
1.4.2	ENTSTEHUNG VON GLYKIERUNGSENDPRODUKTEN (ADVANCED GLYCATION END PRODUCT = AGE) .....	14
1.4.3	ENTSTEHUNG VON N-FORMYLKYNURENIN DURCH OXIDATION VON TRYPTOPHAN .....	16
<b>1.5</b>	<b>MECHANISMEN ZUR ABWEHR VON PROTEINSCHÄDIGUNGEN: DIE MITOCHONDRIALE PROTEINQUALITÄTSKONTROLLE UND APOPTOTISCHE PROZESSE .....</b>	<b>17</b>
1.5.1	DIE MITOCHONDRIALE QUALITÄTSKONTROLLE .....	18
1.5.2	BEDEUTUNG APOPTOTISCHER PROZESSE IN ALTERNSPROZESSEN.....	19
<b>1.6</b>	<b>DER FILAMENTÖSE ASCOMYCET <i>PODOSPORA ANSERINA</i> IN DER ALTERNSFORSCHUNG .....</b>	<b>21</b>
1.6.1	DIE ROLLE DER LON-PROTEASE WÄHREND DES ALTERNS IN <i>P. ANSERINA</i> .....	22
1.6.2	APOPTOSE IN <i>P. ANSERINA</i> .....	23
1.6.3	PROTEOMANALYSE IN <i>P. ANSERINA</i> .....	24
<b>1.7</b>	<b>STRUKTUR UND FUNKTION VON O-METHYLTRANSFERASEN.....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>BEZUGSQUELLEN .....</b>	<b>31</b>
3.1.1	GERÄTE .....	31
3.1.2	SONSTIGE MATERIALIEN.....	32
3.1.3	STOFFE UND REAGENZIEN.....	32
<b>3.2</b>	<b>MEDIEN UND LÖSUNGEN .....</b>	<b>33</b>
3.2.1	MEDIEN.....	33
3.2.2	LÖSUNGEN.....	34
<b>3.3</b>	<b>ENZYME .....</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>KITS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.5</b>	<b>GRÖßENSTANDARDS .....</b>	<b>37</b>
<b>3.6</b>	<b>ANTIKÖRPER .....</b>	<b>38</b>
<b>3.7</b>	<b>VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE .....</b>	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>VERWENDETE PLASMIDE .....</b>	<b>40</b>
<b>3.9</b>	<b>VERWENDETE STÄMME.....</b>	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>RNA-SPEZIFISCHE METHODEN .....</b>	<b>42</b>
4.1.1	ISOLATION DER GESAMT-RNA AUS <i>P. ANSERINA</i> .....	42
4.1.2	RNA-GELELEKTROPHORESE.....	42
4.1.3	NORTHERNTRANSFER.....	43

4. 1. 4	HERSTELLUNG RADIOAKTIVER DNA-SONDEN .....	43
4. 1. 5	HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION (RADIOAKTIV MARKIERTE DNA-SONDE) .....	43
<b>4. 2</b>	<b>DNA-SPEZIFISCHE METHODEN .....</b>	<b>44</b>
4. 2. 1	ISOLIERUNG VON GENOMISCHER DNA AUS <i>P. ANSERINA</i> .....	44
4. 2. 2	POLYMERASE-KETTENREAKTION .....	44
4. 2. 3	DNASE I-VERDAU UND AUFREINIGUNG DER GESAMT-RNA VON <i>P. ANSERINA</i> FÜR DIE CDNA-SYNTHESE.....	45
4. 2. 4	TRANSKRIPTION DER GESAMT-RNA IN CDNA MIT M-MuLV-REVERSE TRANSKRIPTASE ....	45
4. 2. 5	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA.....	45
4. 2. 6	RESTRIKTION VON DNA.....	46
4. 2. 7	AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN .....	46
4. 2. 8	DNA-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	46
4. 2. 9	SOUTHERNTRANSFER .....	46
4. 2. 10	DIG-MARKIERUNG VON DNA .....	47
4. 2. 11	ÜBERPRÜFUNG DER MARKIERUNG („SPOT-BLOT“).....	47
4. 2. 12	HYBRIDISIERUNG UND DETEKTION .....	47
4. 2. 13	LIGATION VON DNA .....	48
4. 2. 14	DNA-SEQUENZIERUNG .....	48
4. 2. 15	HERSTELLUNG KOMPETENTER <i>E. COLI</i> -ZELLEN.....	48
4. 2. 16	TRANSFORMATION VON KOMPETENTEN <i>E. COLI</i> -ZELLEN .....	49
4. 2. 17	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>E. COLI</i> .....	49
<b>4. 3</b>	<b>PROTEIN-SPEZIFISCHE METHODEN.....</b>	<b>49</b>
4. 3. 1	ISOLATION VON GESAMTPROTEIN AUS <i>P. ANSERINA</i> .....	49
4. 3. 2	ISOLATION VON MITOCHONDRIEN AUS <i>P. ANSERINA</i> .....	50
4. 3. 3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN.....	51
4. 3. 4	UNTERSUCHUNG DER SUBMITOCHONDRIALEN LOKALISATION VON PROTEINEN MITTELS DIGITONIN-SOLUBILISIERUNG („DIGITONIN-ASSAY“) .....	51
4. 3. 5	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE .....	52
4. 3. 6	SILBERFÄRBUNG VON PROTEINGELEN .....	52
4. 3. 7	SOLUBILISIERUNG VON MITOCHONDRIALEN MEMBRANPROTEINEN FÜR DIE BN-PAGE.....	52
4. 3. 8	BLAU-NATIVE POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (BN-PAGE).....	53
4. 3. 9	ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (IEF) .....	54
4. 3. 10	2D-GELELEKTROPHORESE MIT RADIOAKTIV MARKIERTEN MITOCHONDRIALEN PROBEN .....	55
4. 3. 11	GENERIERUNG EINES POLYKLONALEN PEPTID-ANTIKÖRPERS GEGEN PAMTH1 .....	55
4. 3. 12	WESTERN-TRANSFER .....	56
4. 3. 13	IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN .....	56
4. 3. 14	HETEROLOGE EXPRESSION UND AUFREINIGUNG DES PAMTH1- FUSIONSPROTEINS .....	57
4. 3. 15	METHYLTRANSFERASE-AKTIVITÄTSTEST.....	58
<b>4. 4</b>	<b><i>PODOSPORA ANSERINA</i> SPEZIFISCHE METHODEN .....</b>	<b>58</b>
4. 4. 1	REGENERATION VON <i>P. ANSERINA</i> .....	58
4. 4. 2	PROTOPLASTIERUNG VON MYZEL.....	58
4. 4. 3	TRANSFORMATION VON <i>P. ANSERINA</i> .....	59
4. 4. 4	BESTIMMUNG DER LEBENSSPANNE UND WUCHSRATE .....	60
4. 4. 5	BESTIMMUNG DER WUCHSRATE AUF PASM-MEDIUM MIT VERSCHIEDENEN KUFERSULPHAT- ODER WASSERTOFFPEROXIDKONZENTRATIONEN .....	60
4. 4. 6	KONFOKALE LASERSCANMIKROSKOPIE VON <i>P. ANSERINA</i> STÄMMEN (CLSM).....	60
4. 4. 7	BESTIMMUNG DER WEIBLICHEN FERTILITÄT VON <i>P. ANSERINA</i> .....	60
4. 4. 8	BESTIMMUNG DER MÄNNLICHEN FERTILITÄT VON <i>P. ANSERINA</i> .....	61
4. 4. 9	BESTIMMUNG DES SAUERSTOFFVERBRAUCHS IN <i>P. ANSERINA</i> GESAMT-MYZEL .....	61

<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG VON DIFFERENTIELL GEBILDETEN PROTEINEN WÄHREND DES ALTERNS IM MITOCHONDRIALEN PROTEOM VON <i>PODOSPORA ANSERINA</i>-WILDSTÄMMEN.</b>	<b>62</b>
5.1.1	ANALYSE MITOCHONDRIALER PROTEINE AUS JUVENILEN UND SENESZENTEN <i>P. ANSERINA</i> - WILDSTÄMMEN MIT HILFE VON EINDIMENSIONALER SDS-, BN-GELELEKTROPHORESEN UND NICHT-RADIOAKTIVEN ZWEIDIMENSIONALEN GELELEKTROPHORESEN .....	63
5.1.2	DIFFERENTIELLE PROTEOMANALYSE MITOCHONDRIALER PROTEINE AUS <i>P. ANSERINA</i> WILDSTAMM S MIT HILFE EINER MARKIERUNG MIT RADIOAKTIVEN IOD-ISOTOPEN UND ANSCHLIEßENDER 2D-GELELEKTROPHORESE .....	68
<b>5.2</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG VON PAMTH1, EINEM PROTEIN, DAS IN <i>P. ANSERINA</i> SENESZENZSPEZIFISCH GEBILDET WIRD .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	EINORDNUNG VON PAMTH1 IN DIE PROTEINSUPERFAMILIE DER METHYLTRANSFERASEN ....	74
5.2.2	ANALYSE DER <i>PAMTH1</i> -TRANSKRIPT- UND DER PAMTH-PROTEINMENGE IM JUVENILEN UND SENESZENTEN <i>P. ANSERINA</i> -WILDSTAMM .....	76
5.2.3	DIE ZELLULÄRE LOKALISATION VON PAMTH1 IN <i>P. ANSERINA</i> .....	78
5.2.4	HETEROLOGE EXPRESSION VON PAMTH1 ZUR UNTERSUCHUNG DER SUBSTRAT- SPEZIFIZITÄT VON PAMTH1 .....	85
5.2.5	ÜBEREXPRESSION VON <i>PAMTH1</i> IN <i>P. ANSERINA</i> .....	91
5.2.6	DELETION VON <i>PAMTH1</i> IN <i>P. ANSERINA</i> .....	102
5.2.7	REVERSION DER <i>PAMTH1</i> -DELETIONSSTÄMME .....	110
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>AUSBLICK .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>135</b>
<b>10</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>143</b>
<b>10.1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>143</b>
<b>10.2</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>144</b>
<b>10.3</b>	<b>SEQUENZVERGLEICH DER FLAVOHÄMOGLOBINE AUS <i>P. ANSERINA</i> UND <i>A. ORYZAE</i> .....</b>	<b>146</b>
<b>11</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>147</b>
<b>12</b>	<b>PUBLIKATIONSLISTE.....</b>	<b>148</b>
<b>13</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>149</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Altern und molekulare Alternsforschung

Biologisches Altern ist ein fortschreitender irreversibler Prozess. Während des Alterns kommt es zur kontinuierlichen Abnahme physiologischer Funktionen und zu einer Zunahme der Krankheitshäufigkeit (Morbidität) sowie der Sterblichkeit (Mortalität) des alternden Organismus (Kirkwood und Austad, 2000). Der Prozess des Alterns wird durch unregulierte, zufällige Schädigungen der Zellen, beispielsweise ausgelöst durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), beschleunigt (Harman, 1956). Diesen Prozessen schließen sich z. T. molekular regulierte, zelluläre Kompensationsmechanismen (s. u.) an (Kirkwood, 2002). Um die negativen Auswirkungen des Alterns beeinflussen zu können, wurde schon früh mit der Erforschung des Alterns auf molekularer Ebene begonnen.

Eine der ersten Alternstheorien stammt aus dem Jahr 1928, die so genannte „rate of living“-Theorie (Pearl, 1928), die von dem amerikanischen Alternsforscher Raymond Pearl postuliert wurde. In dieser wird angenommen, dass die „rate of living“, die unter anderem durch die Energie-Zufuhr und den Umsatz bestimmt wird, so klein wie möglich gehalten werden muss, um die Lebenszeit zu verlängern.

Das Interesse an der Alternsforschung hat heute aufgrund der demographischen Entwicklung in der Bevölkerung der Industrieländer noch zugenommen: Die Zahl der älteren Menschen im Verhältnis zu der Anzahl der jüngeren Menschen, die die Älteren finanziell und sozial versorgen können, nimmt aufgrund der niedrigen Geburtenrate in diesen Ländern drastisch zu. Eines der primären Ziele der Alternsforschung ist es deshalb, die Bedingungen für ein gesundes Altern, die im Vergleich zu früheren Zeiten schon verbessert wurden, noch weiter zu optimieren. Dies ist nur durch die Verminderung gesundheitlicher Beeinträchtigungen und durch die damit verbundene Verbesserung der Lebensqualität im Alter möglich. Eine Bedingung für das Erreichen dieser Ziele ist das Verständnis der Mechanismen des Alterns mit Hilfe von Analysen auf molekularer Ebene. Für den größten Teil der erforderlichen experimentellen Untersuchungen werden aus ethischen Gründen Modellorganismen genutzt, mit denen beispielsweise leicht Kreuzungen angesetzt werden können. In vielen Modellsystemen wurde gezeigt, dass sich sowohl die Genexpression als auch die Bildung bestimmter Proteine während des Alterns verändern und die Auswirkungen dieser Veränderungen wurden weiter untersucht. In einigen Organismen konnten durch

Erkenntnisse, die mit Hilfe der molekularbiologischen Modulation der Expression bestimmter Gene erhalten wurden, der Prozess des Alterns verzögert werden. Dies ist beispielsweise in dem filamentösen Ascomyceten *Podospora anserina* (Prillinger und Esser, 1977; Stumpferl et al., 2004) und bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Kenyon et al., 1993) gelungen, die beide schon lange als Modellsystem in der Altersforschung eingesetzt werden. Erst in neueren Analysen werden die Proteinbildung und die Zusammenstellung der vorhandenen Proteine in einem Organismus zu einem bestimmten Zeitpunkt, beispielsweise durch differentielle Proteomanalysen untersucht. Mit Hilfe dieser vielseitigen Methode werden seneszenzspezifische Unterschiede identifiziert und diese Ergebnisse bieten neue Aspekte zur Erforschung des Prozesses des Alterns in dem jeweilig untersuchten Modellsystem.

## **1. 2 Differentielle Proteomanalyse mit Hilfe von zweidimensionalen Gelelektrophoresen**

Die Untersuchung eines Proteoms eines Organells bzw. eines bestimmten Gewebes in einem Organismus unter Standardbedingungen oder unter unterschiedlichen Alters-, Stress- oder Krankheitsbedingungen wird in zahlreichen Studien mit Hilfe von Proteomanalysen durchgeführt, die auf zweidimensionalen Gelelektrophoresen basieren.

In der ersten Dimension werden die Proteine im Rahmen einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) nach ihrem isoelektrischen Punkt separiert und in der zweiten Dimension, einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), erfolgt eine größenabhängige Auftrennung. In dem erhaltenen Gel erscheinen die Proteine nicht als Banden sondern als Punkte oder sogenannte „spots“. Interessante Proteine werden mit Hilfe von MALDI/TOF (MALDI = Matrix-assisted-Laser-Desorption-Ionisation, TOF = time of flight) oder mit anderen massenspektrometrischen Methoden charakterisiert und identifiziert.

Die Massenspektrometriemethode MALDI/TOF dient der Identifizierung der Proteine in den „Protein-spots“ eines 2D-Gels. Die Proteine werden isoliert und mit Trypsin verdaut. Anschließend werden sie an eine Matrix gebunden, ionisiert und dann in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die Ionisierung und Ablösung der großen Moleküle von der festen Matrix wird mit Hilfe von Laser-Impulsen möglich: Die Energie wird zunächst von der Matrix aufgenommen und dann in das adsorbierte Proteinmolekül übertragen. Entsprechend ihrer Masse fliegen die ionisierten beschleunigten Proteinfragmente unterschiedlich lang. Aus den Flugzeiten durch das Vakuum, das innerhalb des Massenspektrometers erzeugt wird, können die Massen der Moleküle berechnet werden. Die Proteine werden so nach ihren Molekülmassen sortiert. Die Größe der Fragmente hängt jeweils von der Sequenz des gesamten Proteins ab. Die erhaltenen Fragmentgrößen werden mit Hilfe von Protein-Datenbanken mit den Größen von anderen Proteinen auf Homologien hin verglichen. Somit können unbekannte Proteine identifiziert werden.

Auf diese Weise wird ein Überblick über das jeweilig aufgetrennte Proteom eines bestimmten Organs, wie z. B. des Gehirnes der Ratte oder Organellen, wie beispielsweise der Mitochondrien gewonnen. Dies wurde in einer frühen Proteomanalyse bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe von zweidimensionalen Gelelektrophoresen und anschließender Massenspektrometrie erreicht. In dieser Analyse von 2003 wurde eine mitochondriale Proteomkarte dieses Modellsystems erstellt (Sickmann et al., 2003). Es wurden weitgehend alle bekannten mitochondrialen Proteine identifiziert, z. B. die Untereinheiten aller acht Proteine, die auf der mitochondrialen DNA kodiert sind und alle Enzyme des Tricarbonsäurezyklus. Neben den bekannten Proteinen, von denen circa 20 % am Energiestoffwechsel der Zelle beteiligt sind, ist die Funktion von etwa 25 % noch nicht erforscht.

In späteren Analysen wurden differentiell-gebildete Proteine unter verschiedenen Bedingungen charakterisiert. Dabei gibt es differentielle Proteomanalysen, die das Proteom eines ganzen Organs umfassen und andere Studien, in denen das Proteom eines Organells untersucht wird. Im letzten Jahr wurden beispielsweise die Auswirkungen einer Kalorie-Restriktion auf die Proteomzusammensetzung der gesamten Leber weiblicher und männlicher Ratten (Valle et al., 2008) oder der altersabhängigen Änderungen im Gesamtproteom von Maus-Nieren (Chakravarti et al., 2009) untersucht.

Es existieren zusätzlich einige Analysen, die gezielt differentiell gebildete Proteine im Proteom der Mitochondrien unterschiedlicher Modellsysteme unter verschiedenen Bedingungen untersuchen. So wurden beispielsweise Mitochondrien aus Leber, Herz und Skelettmuskeln junger und alter Ratten charakterisiert, die entweder jeweils mit oder ohne Kalorienrestriktion (CR) aufgezogen wurden (Chang et al., 2007). Es sollten in dieser Studie von 2007 seneszenz- und CR-spezifisch differentiell gebildete Proteine gefunden werden. Die meisten differentiell gebildeten Proteine wurden in den Lebermitochondrien identifiziert. Diese gehören z. B. zum Aminosäure-Abbau (Glutamat-Dehydrogenase), zum Zitratzyklus (Malat-Dehydrogenase) und zur Atmungskette (ATP-Synthase). Außerdem wurde in den Mitochondrien aus den alten Ratten eine größere Menge des Hitzeschockproteins 60 gefunden, das für die Proteinfaltung und für die Abwehr gegen oxidativen Stress zuständig ist (Cabiscol et al., 2002; Di et al., 2005). Passend zu diesem Befund wurde eine erhöhte Menge des Prohibitins gefunden, das eine Chaperonfunktion bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe ausübt (Nijtmans et al., 2000; Mitumoto et al., 2002).

Diese Daten zeigen, dass es sehr wahrscheinlich in allen drei untersuchten Geweben während des Alterns zu Schädigungen der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe und

wahrscheinlich auch noch vieler anderer Proteine aufgrund von erhöhtem oxidativen Stress kommt. Bei einer zu starken Schädigung werden diese durch Proteasen abgebaut (s. u.) und somit ändert sich die Proteomzusammensetzung in den Mitochondrien alter Organismen. Mit Hilfe der 2D-PAGE können somit u. a. Zielproteine der oxidativen Schädigung identifiziert werden, die meist in einer verringerten Menge in den Mitochondrien alter Organismen vorliegen. Ein zusätzlicher Vorteil dieser ungerichteten Analyse ist die Möglichkeit zur Identifizierung neuer Signalwege, die während des Alterns im Mitochondrium bedeutend sind.

Darüber hinaus können Proteinschädigungen, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) während der Alterns ausgelöst werden, anhand von 1D- und 2D-Gelelektrophoresen und entsprechenden anschließenden Nachweismethoden gezeigt werden (s. Kap. 1. 4). Die Kenntnis der durch ROS geschädigten Kandidatenproteine und eventuell auch ihrer genauen Lokalisation im Organell bieten Hinweise auf den Mechanismus, der zu dieser Schädigung führt und somit können anschließend die Gründe erforscht werden. Schädigende reaktive Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel die sehr gefährlichen Hydroxylradikale, werden in der Zelle vor allem in den Mitochondrien produziert.

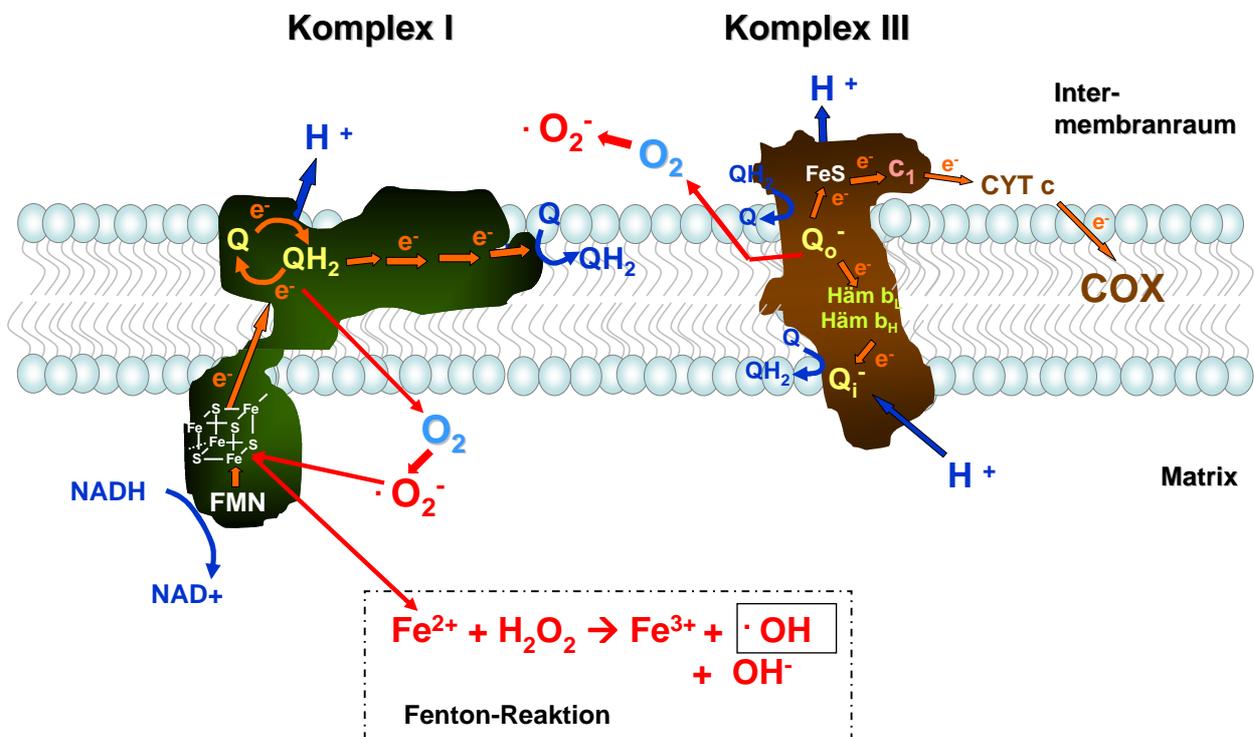
### **1. 3 Entstehung und Wirkungsweisen reaktiver Sauerstoff-Spezies**

Zu den ROS gehören u. a. das Superoxid-Anion  $\cdot\text{O}_2^-$  und auch das etwas stabilere Wasserstoffperoxid  $\text{H}_2\text{O}_2$  aus dem allerdings im Rahmen der Fentonreaktion, wie unten beschrieben wird, Hydroxylradikale ( $\cdot\text{OH}$ ) gebildet werden können. Diese schädigen Zellkomponenten wie DNA, Proteine, Lipide und andere Zellbestandteile. Im folgenden Abschnitt werden Möglichkeiten der ROS-Entstehung in den Mitochondrien (Kapitel 1. 3. 1) dargestellt. In Kapitel 1. 3. 2 werden die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies und auch das Abfangen dieser schädlichen Verbindungen durch Catechol-haltige Substanzen beschrieben.

#### **1. 3. 1 Die ROS-Entstehung in der mitochondrialen Atmungskette**

Ca. 0,4-4 % des verbrauchten zellulären Sauerstoffs werden in den Mitochondrien zu ROS umgewandelt (Chen et al., 2005). Diese entstehen hauptsächlich an den Atmungskettenkomplexen I und III. Durch die Übertragung von Einzelelektronen auf

Ubichinon entsteht Semiubichinon und über den fehlerhaften Transport einzelner Elektronen vom Semiubichinon auf Sauerstoff kommt es zur Bildung von Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ). Diese Superoxid-Anionen werden sowohl in die mitochondriale Matrix als auch in den Intermembranraum freigesetzt (Dröse and Brandt, 2008). Es wurde gezeigt, dass diese fehlerhafte Elektronenübertragung während des Alterns zunimmt (Schieke et al., 2006). Dieser Zusammenhang zwischen der mitochondrialen Funktion und dem biologischen Altern wurde in der „Mitochondrialen Theorie des Alterns“ dargestellt (Harman, 1956). Die ersten Ziele, die durch ROS geschädigt werden, sind die membrangebundenen Komplexe der Atmungskette in den Mitochondrien selbst. Superoxid schädigt z. B. das (4 Fe-4 S)- Eisen-Schwefel-Zentrum im ersten Komplex (Flint et al., 1993), indem es ein Eisenatom aus dem Komplex freisetzt. Ein freies Eisen(II)-Ion kann während der Fenton-Reaktion weitere ROS generieren (Halliwell and Gutteridge, 1984; Gutteridge et al., 1985).

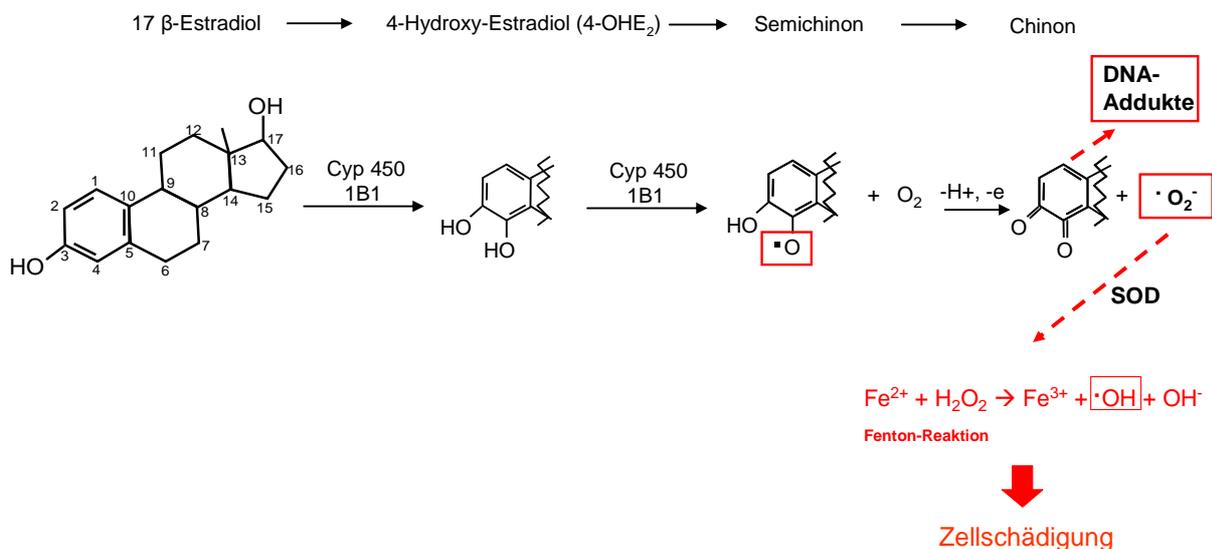


**Abb. 1: Entstehung von ROS an den Atmungskettenkomplexen I und III.** In der inneren mitochondrialen Membran liegen die Atmungskettenkomplexe I (grün) und III (braun). Angegeben sind die Substrate, Kofaktoren sowie Elektronenfluss (orangene Pfeile im Komplex, rote Pfeile bei ROS-Entstehung und Schädigung). Durch das Pumpen der Protonen an beiden Komplexen wird ein Membranpotential aufgebaut (blaue Pfeile). Superoxidradikale ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) entstehen in beiden Komplexen durch die fehlerhafte Übertragung einzelner Elektronen auf Sauerstoffmoleküle. Diese Superoxid-Anionen werden an Komplex I in die mitochondriale Matrix (rote Pfeile) und an Komplex III in den Intermembranraum (gestrichelte rote Pfeile) freigesetzt (Dröse and Brandt, 2008). Abkürzungen: Ubiquinol ( $\text{UQH}_2$ ); (Q): Ubichinon; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid; FMN: Flavinmononukleotid; Fe-S: Eisen-Schwefel-Zentrum;  $\text{Q}_o$  &  $\text{Q}_i$ : äußere und innere Chinon Bindungsseite; Cyt.bL & Cyt. bH: Cytochrom b mit niedrigem und hohem Potential (H);  $c_1$  & CYTc: Cytochrom  $c_1$  und C; COX: Komplex IV. Das gebildete Superoxidradikal schädigt die Eisen-Schwefel-Zentren verschiedener Proteine (hier: Komplex I) und setzt dabei Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) frei, das in der Fentonreaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zum Hydroxylradikal (Kästchen) reagiert. Die Stöchiometrien der Elektronen- und Protonenflüsse werden nicht dargestellt. Modifiziert nach Dröse and Brandt (2008).

Neben der beschriebenen mitochondrialen ROS-Bildung existieren in der Zelle zusätzlich andere Möglichkeiten der ROS-Entstehung. Diese können beispielsweise unter bestimmten Voraussetzungen durch Catecholgruppen-haltige Verbindungen entstehen.

### 1. 3. 2 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Catecholgruppen-haltige Verbindungen

Zu den Catecholgruppen-haltigen Metaboliten gehören sehr viele Substanzen, die entweder sofort eine Catecholgruppe, also einen Benzolring mit zwei benachbarten Dihydroxyl-Gruppen (vicinale OH-Gruppen) besitzen (s. Abb. 2; 3; 4) oder die erst im Organismus zu einem Produkt umgewandelt werden, das diese Eigenschaften aufweist. Zu diesen Stoffen gehören bestimmte polyaromatische Kohlenwasserstoffe (werden z. B. durch die Luft aufgenommen), Flavonoide und Östrogene. Das Hormon Estradiol kann beispielsweise im Körper durch Cytochrom P450 1B1 in das gefährliche 4-Hydroxy-Estradiol umgewandelt werden (s. Abb. 2).



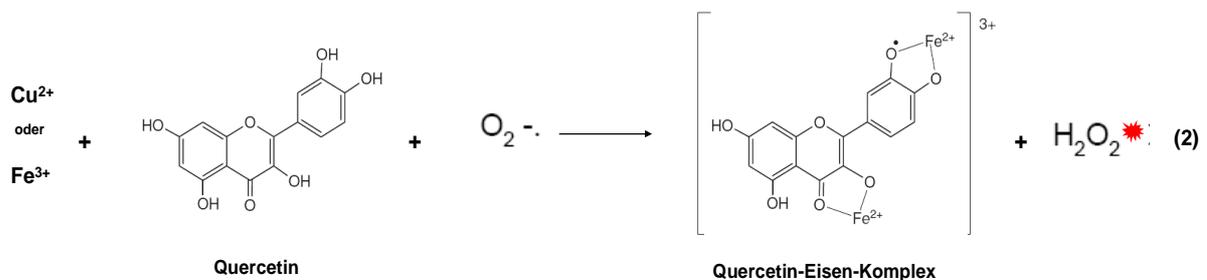
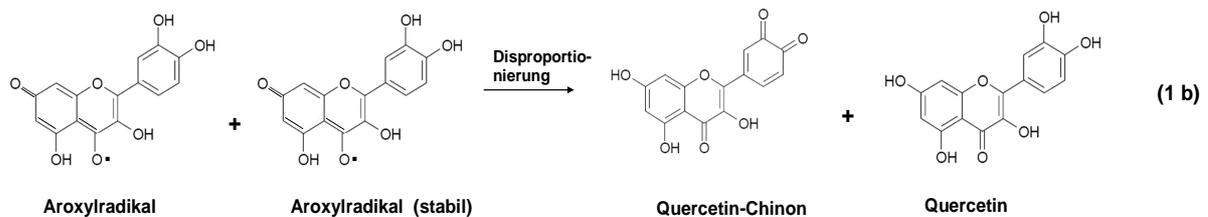
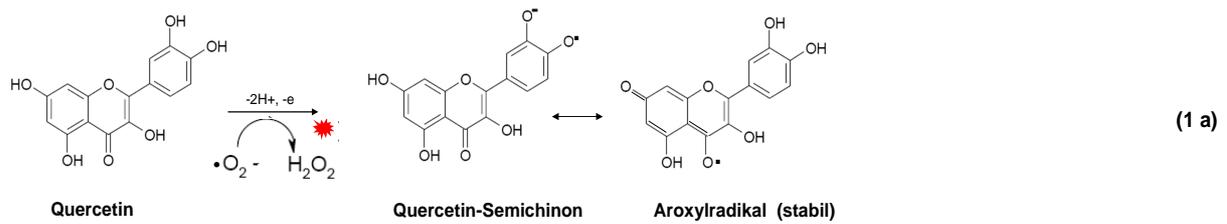
**Abb. 2: ROS-Bildung an den Catecholgruppen des 17  $\beta$ -Estradiols** (A) 17  $\beta$ -Hydroxy-Estradiol wird durch Cytochrom 1B1 in 4-Hydroxy-Estradiol umgewandelt, das zwei benachbarte OH-Gruppen besitzt, die leicht durch Peroxidasen oder einer anderen Oxidation in ein Semichinon umgewandelt werden können. Dieses bildet mit Sauerstoff Superoxidanione, die durch Superoxiddismutasen in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden. Dieses reagiert mit Übergangsmetallen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) in der Fenton-Reaktion zum sehr gefährlichen Hydroxylradikal, das Zellschädigung verursacht. Das Estradiol-Semichinon schädigt durch die direkte Addukt-Bildung die DNA. Die gebildeten, instabilen Addukte werden durch Reparatur entfernt und es entstehen apurine Stellen. Modifiziert nach Parl et al. (2009).

Die Catecholgruppe dieses Stoffes wird durch die Reaktion mit Sauerstoffradikalen oder durch Cyp 450 1B1 zu einem Semichinon umgewandelt, das in der Reaktion mit Sauerstoff Superoxidanionen generieren kann (Liehr und Roy, 1990; Parl et al., 2009). Diese werden

spontan oder durch Superoxiddismutasen in Wasserstoffperoxid umgewandelt, das mit Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer im Rahmen der Fenton-Reaktion zum sehr gefährlichen Hydroxylradikal reagiert (Halliwell und Gutteridge, 1984; Gutteridge et al., 1985). Dieser Mechanismus wird als ein Grund für die cancerogene Wirkung von Estradiol angesehen (Parl et al., 2009). Daneben können die Chinone in Reaktionen mit DNA Addukte bilden (Devanesan et al., 2001) und nach der anschließenden Entfernung dieser Addukte durch Depurinierungen entstehen apurine Stellen (Cavalieri et al., 2000).

Auch Stoffe, für die eigentlich gezeigt wurde, dass sie *in vitro* antioxidative Eigenschaften besitzen, können unter bestimmten Umständen wie beispielsweise einer zu hohen ROS-Konzentration eher schädigend wirken.

Dies wurde für einige pflanzliche Flavonoide wie z. B. Quercetin gezeigt. Dieser pflanzliche Stoff wird in Nahrungsmitteln als zell-schützender Zusatz verwendet, da er unter anderem in der Lage ist, Radikale wie das Superoxidanionradikal abzufangen. Für die Wirkung als Radikalfänger ist das Vorhandensein einer Catecholgruppe am „B-Ring“ des Flavonoids wichtig. Zusätzlich zählt zu den wichtigen Strukturmerkmalen die Doppelbindung zwischen C-2 und C-3 im „Ring C“ des Quercetins, die in Konjugation zur 4-Oxo-Gruppe treten kann. Ein optimiertes Radikalfängerpotential wird durch zusätzliche Hydroxylgruppen erreicht. Unter normalen Bedingungen reagiert die OH-Gruppe im Catechol des Quercetins beispielsweise mit dem Superoxidanionradikal und aus Quercetin entsteht ein Aroxyradikal bzw. ein Semichinon. Durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms aus einer OH-Gruppe, und der Bereitstellung eines Elektrons entsteht über weitere Schritte aus dem Superoxidradikal schließlich Wasserstoffperoxid. Das Antioxidanz Quercetin trägt in diesem Fall zwar selbst ein ungepaartes Elektron, das Aroxyradikal ist jedoch im Gegensatz zum Superoxidradikalen reaktionsträge (Bravo, 1998) (s. Abb. 3). Im zweiten Schritt entsteht durch die Reaktion dieses Aroxyradikals mit einem weiteren Aroxyradikal ein stabiles Chinon und wieder Quercetin (Galek et al., 1990; Bors et al., 1990; Rice-Evans et al., 1996; Pietta, 2000). Somit werden Superoxidradikale durch die Reaktion mit Quercetin weggefangen und es entsteht ein antioxidativer Schutz. Neben den aufgeführten strukturellen Voraussetzungen spielt die Chelatisierung von Metallionen, beispielsweise Kupfer und Eisen (s. Abb. 3), eine wesentliche Rolle in der Inhibierung von Metallionen-katalysierten Radikalbildungsprozessen (Morel et al., 1994; Perron und Brumaghim, 2009).



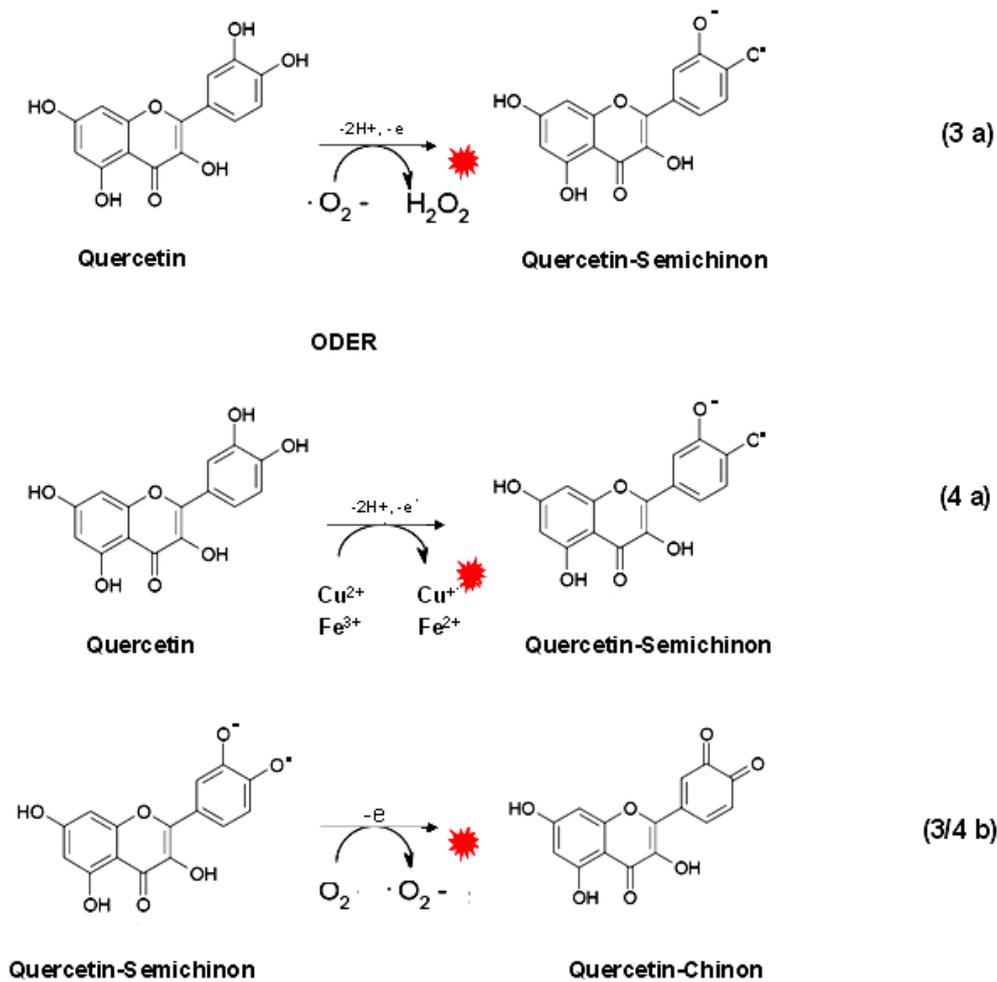
★ : Beteiligung an der Hydroxyl-Radikalbildung

**Zellschutz**

**Abb. 3: Antioxidative Wirkung von Quercetin.** (1 a): Unter normalen Bedingungen reagiert die OH-Gruppe im Catechol des Quercetins mit dem Superoxidationradikal und durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms, und der Bereitstellung eines Elektrons entsteht über weitere Schritte aus dem Superoxidradikal Wasserstoffperoxid. Aus diesem wird bei hohen Konzentrationen von freien Metallionen im Rahmen der Fentonreaktion ein Hydroxylradikal gebildet. Aus Quercetin entsteht ein Semichinon bzw. die tautomerisierte Form, das Aroxyradikal. (1 b) Im zweiten Schritt entsteht durch die Reaktion des Aroxyradikals mit einem weiteren Aroxyradikal ein stabiles Chinon und wieder Quercetin (Galek *et al.*, 1990; Bors *et al.*, 1990; Rice-Evans *et al.*, 1996; Pietta, 2000). Somit werden Superoxidradikale durch die Reaktion mit Quercetin weggefangen und es entsteht ein antioxidativer Schutz. (2) Zusätzlich ist das Quercetin-Semichinon in der Lage, Chelate mit Metallionen zu bilden und somit die Fentonreaktion freier Metallionen mit Wasserstoffperoxid (rote Markierung) zu verhindern (Morel *et al.*, 1994; De Souza *et al.*, 2003). Modifiziert nach Perron und Brumaghim (2009).

Im Gegensatz dazu wurde jedoch auch gezeigt, dass Quercetin prooxidativ wirkt (Metodiewa *et al.*, 1999; Robaszekiewicz *et al.*, 2007). Dies geschieht vor allem in Gegenwart hoher Konzentrationen von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer oder zu großer Superoxidradikalmengen. Unter diesen Bedingungen wird Quercetin im ersten Schritt (s. Abb. 4), genauso wie unter normalen Bedingungen, in der Reaktion mit dem Superoxidradikal zum

Semichinon bzw. dem Aroxyradikal oxidiert. Jedoch entgiftet dieses Semichinon bei hohen Konzentrationen von Metallionen nicht das Superoxidradikal, sondern reagiert mit molekularem Sauerstoff (Brown et al., 1998; Metodiewa et al., 1999) und generiert somit durch die Elektron-Übertragung auf diesen Sauerstoff weitere Superoxidradikale. Diese werden durch Superoxiddismutasen in Wasserstoffperoxid umgewandelt, das in der Fentonreaktion mit reduzierten Übergangsmetallen sehr schädliche Hydroxylradikale bildet (s. o.). Zusätzlich wird die Bildung der Semichinone durch hohe Eisen oder Kupfer-Konzentrationen noch weiter vorangetrieben, denn das Quercetin chelatiert Eisen oder Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$ ) nicht nur, sondern es wird durch die Metalle oxidiert und reduziert diese im Gegenzug (s. Abb. 4). Bei dieser Oxidation entstehen demnach weitere Quercetin-Semichinone und reduzierte Metalle ( $\text{Cu}^+$  und  $\text{Fe}^{2+}$ ) (Cao et al., 1997; Brown et al., 1998a). Die Semichinone generieren anschließend in der Reaktion mit Sauerstoff Superoxidradikale (Canada et al., 1990) (s. Abb. 4). Aus den entstandenen Superoxidradikalen wird durch Superoxiddismutasen wieder Wasserstoffperoxid gebildet, das in der Fentonreaktion mit reduzierten Metallionen Hydroxylradikale bildet. Diese Fenton-Reaktion läuft unter Beteiligung der entstandenen reduzierten Metalle aus der Reaktion des Quercetins mit oxidierten Metallen ab. In vielen Untersuchungen wurde deshalb die Mutagenität dieses Stoffes gezeigt (s. u.).



★ : Beteiligung an der Hydroxyl-Radikalbildung

↓  
**Zellschädigung**

**Abb. 4: Prooxidative Wirkung von Quercetin.** (3 a) Quercetin besitzt zwei benachbarte OH-Gruppen, die leicht durch die Abstraktion von zwei Wasserstoffen und einem Elektron in der Reaktion mit dem Superoxidradikal zu einem Semichinon oxidiert werden können. Aus dem Superoxidradikal wird Wasserstoffperoxid (roter Stern) gebildet, das bei hohen Konzentrationen reduzierter Metallionen im Rahmen der Fenton-Reaktion zu dem sehr reaktiven Hydroxyl-Radikal reagiert. (3 b). Somit entsteht aus dem Quercetin ein Semichinonradikal, das vor allem bei Vorhandensein von hohen Metallionenkonzentrationen mit molekularem Sauerstoff zum Chinon reagiert und ein weiteres Superoxidradikal (roter Stern) generiert. Dieses trägt durch Umwandlung in Wasserstoffperoxid zur Bildung von metallkatalysierten Bildung von Hydroxylradikalen in der Fentonreaktion bei. (4 a) Zusätzlich wird das Quercetin durch Metallionen oxidiert und reduziert diese im Gegenzug. Bei dieser Oxidation entstehen weitere Quercetin-Semichinone und reduzierte Metalle (Cu<sup>+</sup> und Fe<sup>2+</sup>) (Cao *et al.*, 1997). (4 b) Die Semichinone generieren anschließend in der Reaktion mit Sauerstoff Superoxidradikale (roter Stern), die in Wasserstoffperoxid und später in Hydroxylradikale umgewandelt werden.

Die Proteinschädigungen durch das entstandene Hydroxylradikal sind vielfältig, es existieren zahlreiche Angriffsstellen in Enzymen oder Proteinkomponenten mit denen das Hydroxylradikal aufgrund seines großen Redoxpotentials reagieren kann (1. 4)

## **1. 4 Oxidative Proteinschäden und biochemische Nachweismöglichkeiten in der Analyse von Proteomen**

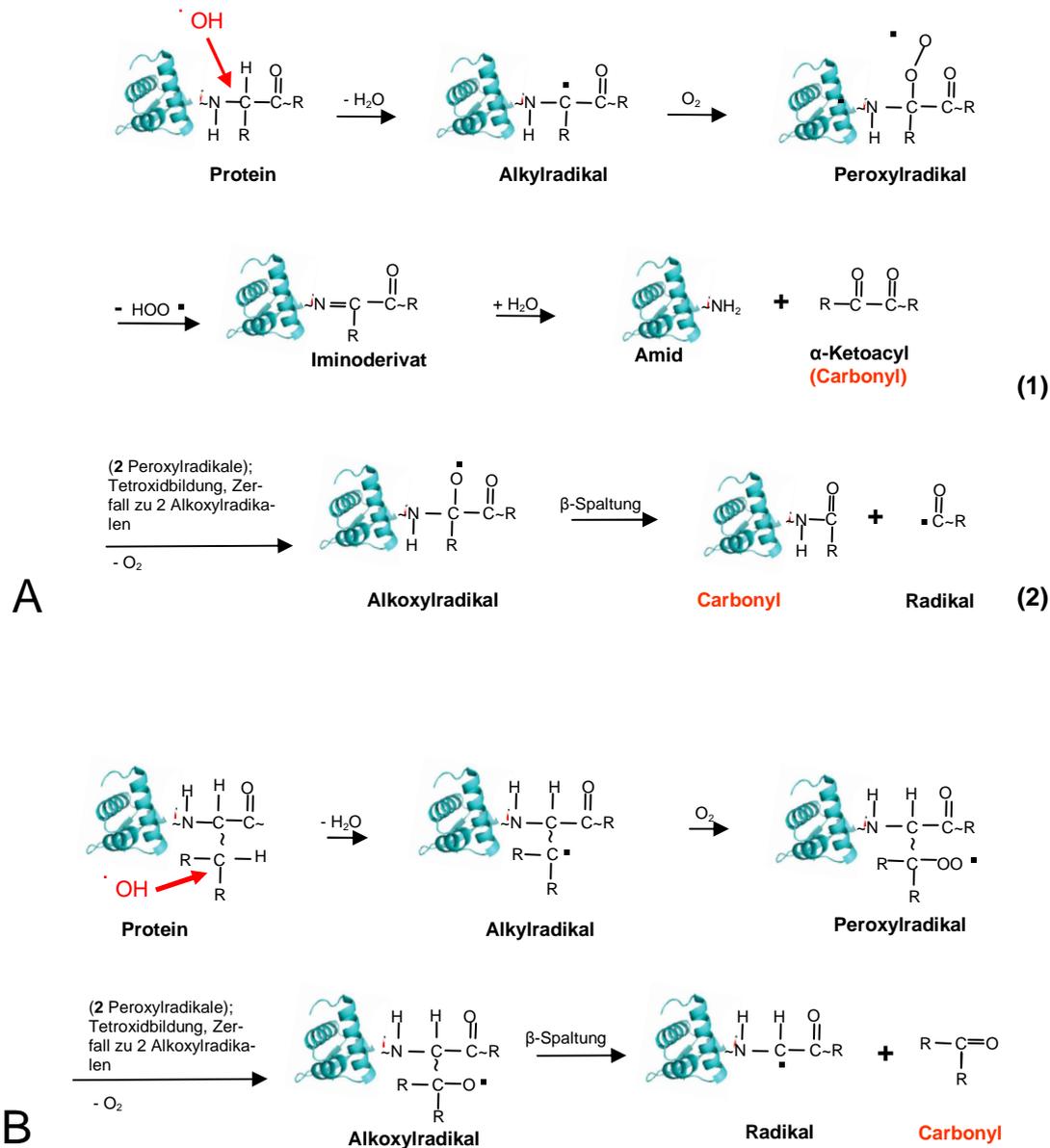
In den beiden folgenden Abschnitten werden einige Proteinschäden, die durch die Reaktion mit dem Hydroxylradikal entstanden sind und Nachweismethoden für diese Proteinschädigungen dargestellt. Ein Beispiel einer Schädigung ist die Entstehung von Carbonylen, die über radikalische Intermediate und die Spaltung der Peptidbindung an Proteinen entstehen (s. 1. 4. 1). Ein anderes Beispiel ist die Anlagerung oxidativ modifizierter Zuckerderivate an Proteine und die anschließende Bildung unlöslicher Glykierungsendprodukte (s. 1. 4. 2). Schließlich werden in Abschnitt 1. 4. 3 die Entstehung von N-Formylkynurenin durch die oxidative Tryptophanschädigung in Proteinen und ihre biologische Bedeutung dargestellt. In jedem Abschnitt wird zusätzlich eine Nachweismöglichkeit der entstehenden Schäden vorgestellt.

### **1. 4. 1 Entstehung von Carbonylgruppen an Proteinen**

Eine oxidative Proteinschädigung durch den Angriff eines OH-Radikals auf bestimmte Aminosäuren, wie z. B. Lysin ist die Entstehung von Carbonylgruppen. Bei einem Angriff auf das  $\alpha$ -C-Atom einer Aminosäure im Proteinrückrat, kommt es zu einer Fragmentierung der Peptidkette, wird dagegen ein C-Atom einer Aminosäure in einer Seitenkette angegriffen, geht diese verloren. In beiden Fällen kommt es zu Beginn unter Wasserbildung zur Abspaltung eines Wasserstoff-Atoms und zur Entstehung eines Alkyl-Radikals (s. Abb. 5). Durch die Anlagerung von Sauerstoff an dieses Radikal wird daraufhin entweder ein  $\alpha$ -C-Atom-Peroxyradikal (s. Abb. 5a) oder ein Seitenketten-Peroxy-Radikal (s. Abb. 5b) gebildet. Am Proteinrückrat kann dieses  $\alpha$ -C-Atom-Peroxyradikal unter Abspaltung eines Peroxidradikals in ein Iminoprodukt umgewandelt werden, das dann mittels Hydrolyse in ein  $\alpha$ -Ketoacyl und den entsprechenden Amidrest gespalten wird.

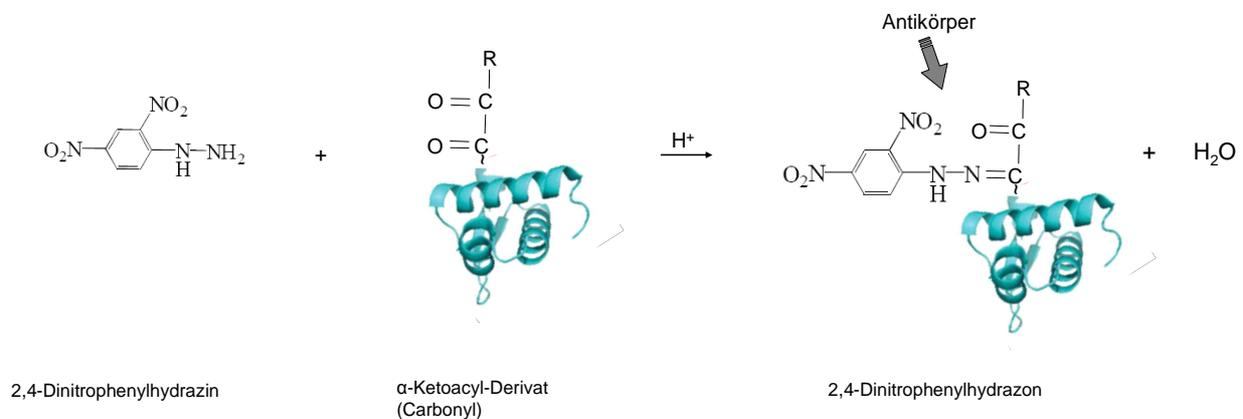
Eine andere Möglichkeit ist die Reaktion des anfänglich gebildeten  $\alpha$ -C-Atom-Peroxyradikals mit einem weiteren  $\alpha$ -C-Atom-Peroxyradikal zu einem Tetroxid, das unter Sauerstoffabspaltung in zwei Alkoxyradikale umgewandelt wird. Diese Alkoxyradikale

werden durch  $\beta$ -Spaltung in eine radikalische und in eine Carbonylverbindung gespalten. Die Peroxylradikale, die an den Seitenketten gebildet werden, können ebenfalls zum Tetroxid reagieren und es entstehen zwei tertiäre Alkoxyradikale. Durch eine  $\beta$ -Spaltung wird im nächsten Reaktionsschritt ein Alkylrest mit einer radikalischen Komponente am Proteinrückgrat und ein Carbonyl aus dem Seitenkettenrest gebildet. Die Mengen dieser durch oxidativen Stress gebildeten Protein-Carbonylierung, lassen eine Aussage über den Grad der Schädigung durch ROS zu (Cao und Cutler, 1995; Übersicht bei Nyström, 2005).



**Abb. 5: Bildung der Carbonyl-Gruppe an einem Protein mittels Oxidation durch das Hydroxyl-Radikal.** (A) (1) Durch den Angriff der Hydroxylgruppe auf das  $\alpha$ -C-Atom entsteht über Zwischenstufen ein Iminoderivat, das Proteinrückgrat wird gespalten und das  $\alpha$ -Ketoacyl-Derivat wird gebildet. (2) Alternativ kann ein Alkoxyradikal gebildet werden, aus dem durch eine  $\beta$ -Spaltung eine Carbonyl- und eine Radikalkomponente entstehen. (B) Oxidierte Seitenketten werden nach der Bildung eines tertiären Alkoxyradikals durch  $\beta$ -Spaltung als Carbonyl abgespalten (Cao und Cutler, 1995; Übersicht bei Nyström, 2005). Modifiziert nach Dean et al. (1997).

Diese Art der oxidativen Schädigung von Proteinen wurde schon in zahlreichen Geweben bzw. subzellulären Fraktionen unterschiedlicher Modellorganismen während des Alterns oder bei neurodegenerativen Krankheiten mittels „Oxyblot“-Analysen (Aksenov et al., 2001; Johansson et al., 2004) gezeigt. Der Nachweis und die Identifizierung von carbonylierten Proteinen geschehen in vielen Analysen mit Hilfe der so genannten „Oxyblot –Methode“. Hierbei werden die Proteine vor einer Auftrennung in einer denaturierenden SDS-PAGE mit dem Reagenz 2,4-Dinitrophenyl-Hydrazin derivatisiert. Dieses bildet selektiv an den Carbonylgruppen der geschädigten Proteine das 2,4-Dinitrophenyl-Hydrizon. Dieser Stoff kann von einem spezifischen Antikörper im Rahmen einer Westernblot-Analyse detektiert werden (s. Abb. 6).



**Abb. 6: Nachweisprinzip der „Oxyblot“-Methode.** Die Carbonylgruppe des oxidierten Proteins reagiert während der Derivatisierung mit 2, 4-Dinitrophenylhydrazin (DNP) unter Bildung von Wasser zu 2, 4-Dinitrophenylhydrazon. Dies geschieht durch die Reaktion der Aminogruppe im DNP mit der Carbonylgruppe im Protein. Das 2, 4-Dinitrophenylhydrazon wird in der anschließenden Westernblot-Analyse von einem spezifischen Antikörper detektiert. Modifiziert nach Nyström, 2005.

In frühen Analysen wurde beispielsweise mit Hilfe dieser Methode in *D. melanogaster* die altersabhängige Schädigung der mitochondrialen Aconitase gezeigt (Yan et al., 1997) und seitdem ist in späteren Publikationen in unterschiedlichen Modellorganismen immer wieder gezeigt worden, dass dieses Protein ein Ziel verschiedener oxidativer Modifikationen darstellt. Der Nachweis der carbonylierten Aconitase in *D. melanogaster* wurde 1997 mit Hilfe einer eindimensionalen SDS-PAGE und einer anschließenden Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Methode hat den Nachteil, dass die Auflösung der Proteinauftrennung häufig nicht ausreicht, um aus einer Bande ein einzelnes Protein zu isolieren. Deshalb wird in neueren Analysen die Derivatisierung der Proteinproben mit einer zweidimensionalen Gelelektrophorese bestehend aus isoelektrischer Fokussierung und SDS-PAGE gekoppelt.

Nach der Westernblot-Analyse können oxidierte Proteine isoliert und mittels massenspektrometrischer Methoden identifiziert werden (s. o.). Dieses Verfahren zeigt neue Angriffspunkte oxidativer Carbonylierungen. Gleichzeitig wird gezeigt, wie sich die Proteinmenge im Vergleich zur Carbonylierung verhält. Aus diesen Ergebnissen können Schlussfolgerungen über die Proteinqualitätskontrolle und den Abbau gezogen werden. In Zellen aus alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden beispielsweise mit Hilfe einer 2D-„Oxyblot“-Analyse von 2004 15 Zielproteine für die oxidative Carbonylierung identifiziert (Johansson et al., 2004). Unter diesen Proteinen befanden sich die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase und die mitochondrialen Hitzeschockproteine HSP60 und das SSC1 (Abb. 7).

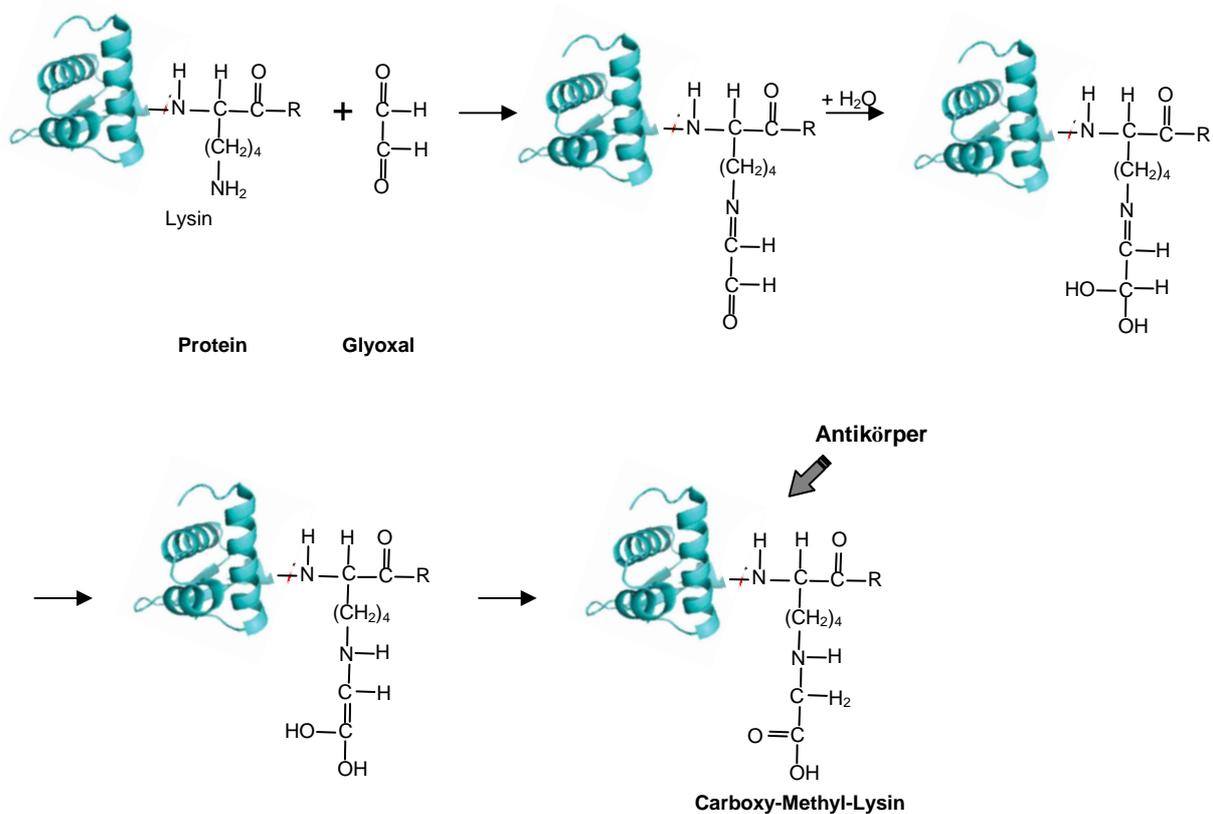
Glykolyse-Enzyme	Funktion	Lokalisation
Eno2	Enolase	Cytoplasma
Pdc1	Pyruvat Decarboxylase	Cytoplasma
Tdh1	Glyceraldahyde-3-Phosphat-Dehydrogenase	Cytoplasma
Fba1	Fructose-biphosphat Aldolase	Cytoplasma
Adh1	Alkohol Dehydrogenase	Cytoplasma
Tpi1	Triose Phosphat Isomerase	Cytoplasma
<b>Hitzeschockproteine</b>		
Hsp60	Hsp60	Mitochondrien
Ssa1	Hsp76	Cytoplasma
Ssb1	Hsp75	Cytoplasma
Ssc1	Hsp70	Mitochondrien
Sse1	Hsp78	Cytoplasma
<b>Andere</b>		
Atp2	$\beta$ -ATPase	Mitochondrien
Act1	Aktin	Cytoplasma
Met6	Methionin Synthase	Cytoplasma
Tk11	Transketolase	Cytoplasma

**Abb. 7: Identifizierung carbonylierter Proteine mit Hilfe einer 2D-„Oxyblot“-Analyse in alten *A. thaliana*-Pflanzen.** Unter den Kandidatenproteinen befinden sich mitochondriale Hitzeschockproteine und die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase (Johansson et al., 2004).

#### 1. 4. 2 Entstehung von Glykierungsendprodukten (advanced glycation end product = AGE)

Eine ähnlich durchgeführte Analyse von geschädigten Proteinen ist die Detektion von so genannten „advanced glycation endproducts“, abgekürzt „AGE“. Diese Modifikation an Proteinen stellt eine oxidative Schädigung dar, die häufig entweder den Abbau oder einen Funktionsverlust des geschädigten Proteins zur Folge hat. AGE bzw. Glykierungsendprodukte sind nicht mehr abbaubare langkettige Verbindungen, die durch die eine ROS-vermittelte

Reaktion von Zuckern, z. B. Glucose mit Aminosäuren in Proteinen entstehen (Monnier *et al.*, 1992). In der Reaktion von Lysin mit Glyoxal, das aus dem oxidativen Abbau von Glucose in Verbindung mit Übergangsmetallen wie Kupfer hervorheht, entsteht über viele Umlagerungsschritte das Glykierungsendprodukt Carboxy-Methyl-Lysin (Abb. 8). Im Rahmen weiterer „Maillardreaktionen“ bilden sich Quervernetzungen zwischen diesen entstandenen „AGE“-Produkten und es kommt zur Bildung immer größerer unlöslicher Komplexe. Die Quantifizierung des Carboxy-Methyl-Lysins wurde in unterschiedlichen Studien als Merkmal für oxidativen Stress und der Proteinschädigung verwendet. Die Bildung von „AGE“-Produkten wurde beispielsweise während der Alzheimer-Demenz (AD) beobachtet (Takeda *et al.*, 2001; Dei *et al.*, 2002). Außerdem wird die Polymerisation des  $\beta$ -Amyloids durch Quervernetzung von AGE-Produkten beschleunigt (Kuhla *et al.*, 2007).



**Abb. 8: Entstehung von Glykierungsendprodukten („AGE“) an Aminosäureseitenketten.** Zuckerderivate wie Glyoxal binden z. B. an das  $\epsilon$ -N-Atom der Amidgruppe der Lysinseitenkette. Daraufhin entsteht über Wasseranlagerung und einigen Umlagerungen Carboxy-Methyl-Lysin, das mit einem spezifischen Antikörper im Rahmen einer Westernblot-Analyse nachgewiesen wird. Modifiziert nach Glomb und Pfahler (2001).

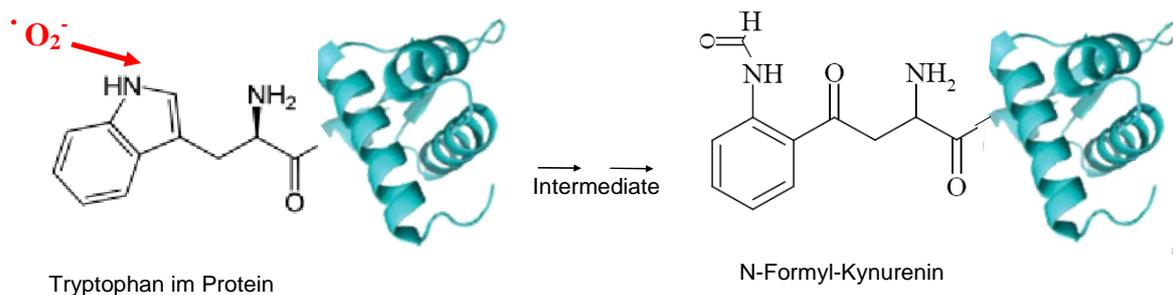
Eine andere Studie zeigt die „AGE“-Bildung an Kollagen und während des Alterns und auch im Kollagen wurde ein seneszenzspezifischer Anstieg dieser Produkte gezeigt (Verzijl *et al.*, 2000). In Skelettmuskel-Zellen aus Ratten wurde die Suche nach altersspezifisch-modifizierten Proteinen mit Hilfe einer differentiellen Proteomanalyse mit 2D-

Gelelektrophoresen und anschließenden Westernblot-Analysen durchgeführt (Snow *et al.*, 2007). Es wurde ein Anstieg der „AGE“-Produkte in den Proteinproben gefunden und einige Zielproteine mit MALDI-TOF-Analysen identifiziert. Es wurden Proteine detektiert, die am Energiestoffwechsel beteiligt sind, z. B. die  $\beta$ -Enolase, und der mitochondriale VDAC, in dem in einer vorherigen Analyse das Vorhandensein von Nitrotyrosin als posttranslationale Modifikation während des Alterns entdeckt wurde (Kanski *et al.*, 2005).

### 1. 4. 3 Entstehung von N-Formylkynurenin durch Oxidation von Tryptophan

Ein weiteres Ziel oxidativer Schädigungen durch ROS in Proteinen ist die Aminosäure Tryptophan. Schon in frühen Studien, in denen die Proteinoxidation beispielsweise in der menschlichen Augenlinse untersucht wurde, wurde die Existenz von Tryptophanoxidaionsprodukten, also z. B. N-Formyl-Kynurenin nach UV-Bestrahlung nachgewiesen (Zigler und Goosey, 1981; Roberts und Dillon, 1989). Bei der Oxidation des Tryptophans durch das Superoxidradikal kommt es zur Zerstörung der Pyrrolgruppe und über zahlreiche Intermediate wird das N-Formyl-Kynurenin gebildet.

Die Ziele dieser oxidativen Modifikationen wurden erst in späteren Analysen gezeigt: Mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen wurde das menschliche  $\alpha$ -Cristallin als ein Protein identifiziert, das an Seitenketten mit Tryptophan oxidiert wird (Finley *et al.*, 1998). Diese Oxidation wird mit der Entstehung des altersabhängigen Kataraktsyndroms (grauer Star) verbunden.



**Abb. 9: Oxidation von Tryptophan und Entstehung von N-Formyl-Kynurenin.** Bei der Oxidation des Tryptophans durch das Superoxidradikal kommt es zur Zerstörung der Pyrrolgruppe und es bildet sich über viele Zwischenprodukte das N-Formyl-Kynurenin, das massenspektrometrisch nachgewiesen werden kann (Finley *et al.*, 1998).

In einer neueren Studie wurden Proteine als Ziel der oxidativen N-Formyl-Kynurenin-Bildung mit Hilfe von 2D-PAGE und massenspektrometrischen Analysen mitochondrialer Proteinproben aus seneszenten Ratten gefunden (Hunzinger *et al.*, 2006). In den Mitochondrien aus den seneszenten Ratten wurde geschädigte Aconitase mit N-Formyl-

Kynurenin-Gruppen identifiziert. Dies zeigt, dass an diesem Protein, neben der altersabhängigen Carbonylierung, die beispielsweise in *D. melanogaster* einen Aktivitätsverlust zu Folge hat, eine weitere oxidative Schädigung vorliegt (Hunzinger et al., 2006). Zusätzlich wurde N-Formylkynurenin mittels Proteom- und MALDI-Analysen in anderen mitochondrialen Proteinen von Peroxynitrit-behandelten Menschenherz-Mitochondrien, wie z. B. in der ATPase, in der Zitratsynthase und AIF (Apoptose induzierender Factor) nachgewiesen (Taylor et al., 2003). In der Alternssforschung existieren noch nicht so viele Analysen, in denen die N-Formyl-Kynurenin-Bildung untersucht wird, sodass auf diesem Gebiet noch sehr viel unternommen werden kann.

Abschließend lässt sich feststellen, dass mittels 2D-PAGE und der anschließenden Analyse der posttranslationalen, oxidativen Modifikation die Menge und die geschädigten Schädigungen während des gleichen Experimentes sowohl gezeigt als auch identifiziert werden können.

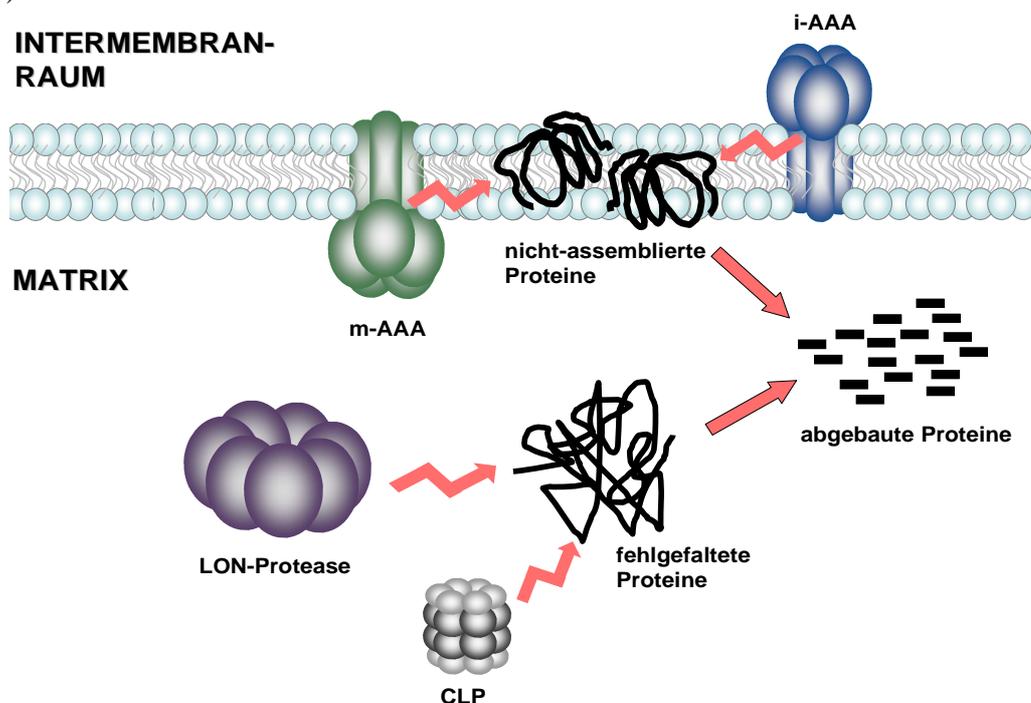
Aus den Ergebnissen der differentiellen Proteomanalyse und der Identifizierung posttranslationaler Modifikationen können somit Schlussfolgerungen über den Proteinabbau beispielsweise im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle oder über die transkriptionelle Regulation gezogen werden. Die Proteinqualitätskontrolle wird häufig als Reaktion auf Proteinschädigungen nachgeschaltet und die Proteomzusammensetzung wird beispielsweise im Alter verändert. Veränderungen im Proteom können wiederum mit Hilfe der Proteomanalyse untersucht werden.

## **1.5 Mechanismen zur Abwehr von Proteinschädigungen: Die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle und apoptotische Prozesse**

Ein Prozess, der durch die oxidative Proteinschädigung induziert bzw. beeinflusst wird, ist die Proteinqualitätskontrolle. Die Zusammensetzung des Proteoms wird wiederum u. a. maßgeblich durch die Proteinqualitätskontrolle bestimmt. Diese wird im Cytosol mit Hilfe des Proteasoms und in den Mitochondrien durch Proteasen im Rahmen der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle vollzogen. Eine weitere Folge einer gestörten Proteinhomeostase und -qualitätskontrolle ist die Induktion der Apoptose.

### 1. 5. 1 Die mitochondriale Qualitätskontrolle

Im Rahmen der Proteinqualitätskontrolle kommt es zum gezielten Abbau von falsch gefalteten oder oxidativ geschädigten Proteinen. Dies geschieht in den Mitochondrien mit Hilfe eines Netzwerks aus Chaperonen und mitochondrialen Proteasen, deren Aufgabe es ist die mitochondriale Proteinhomöostase und –funktionen aufrecht zu erhalten (Marcillat et al., 1988), ähnlich wie das Proteasom im cytoplasmatischen Teil der Zellen (Shringarpure et al., 2001). Eine ATP-abhängige Protease der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle ist neben den anderen beiden Proteaseklassen CLP und den membranständigen AAA<sup>+</sup>-Proteasen, die LON-Protease in der mitochondrialen Matrix (Van and Langer, 1999). Sie kommt in sehr konservierter Form in Bakterien und Eukaryoten vor. Das Homolog in der Hefe *S. cerevisiae* wird PIM1 genannt. Ein *Pim1*-Deletionsstamm dieser Hefe kann geschädigte mitochondriale Matrixproteine viel schlechter abbauen als der Wildstamm. Bei einer Verminderung der *Lon*-Expression in humanen Lungen-Fibroblasten wurde die Schädigung der mitochondrialen Struktur and Funktion beobachtet (Bota et al., 2005). Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Akkumulation der LON-Substratproteine im Falle einer Aktivitätsverminderung zurückzuführen. Dies wird an der Identifizierung einer erhöhten Menge oxidiertes Aconitase, ein bewiesenes Substrat der LON-Protease (Bota und Davies, 2002) in diesen Zellen deutlich.

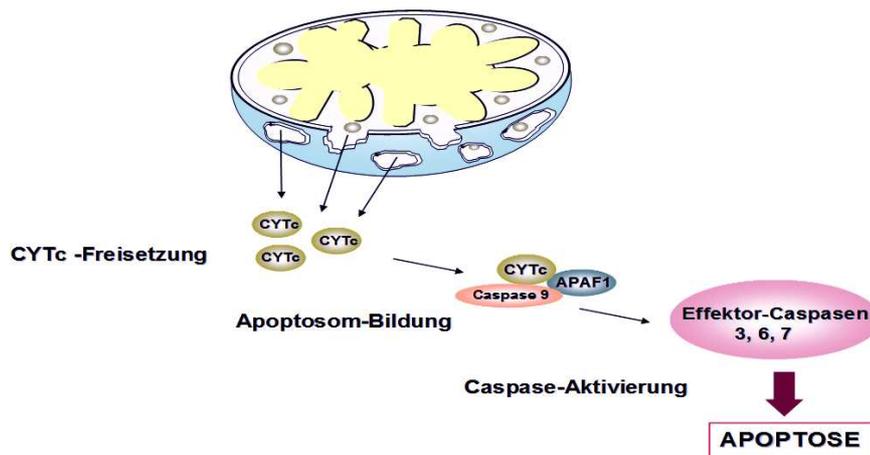


**Abb. 10: Einige Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle.** In der Matrix der Mitochondrien bauen die beiden Proteasen LON und sehr wahrscheinlich auch CLP miss-gefaltete Proteine ab, die andernfalls unter Umständen schädliche Aggregate bilden könnten. In der inneren mitochondrialen Membran sind die beiden membranständigen AAA<sup>+</sup>-Proteasen m-AAA und i-AAA lokalisiert, die hauptsächlich nicht-assemblierte Proteine abbauen. Modifiziert nach Leidhold und Voos (2007).

Diese Störung der Proteinqualitätskontrolle und die veränderte Proteomzusammensetzung, die durch die Akkumulation oxidierter Proteine verursacht wird, führen sehr wahrscheinlich zu der in den Lungen-Fibroblasten beobachteten induzierten caspase-abhängigen Apoptose (Bota et al., 2005). Ein zusätzlicher Zusammenhang zwischen der Proteinqualitätskontrolle und der Apoptose stellt die Prozessierung des Proteins OPA1 durch die Rhomboid Protease PARL dar (Ishihara et al., 2006), einer weiteren Komponente der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle. OPA1 reguliert im Rahmen der mitochondrialen Dynamik den Durchmesser der Cristae und damit die Freisetzung von Cytochrom c während der Apoptose (Frezza et al., 2006; Cipolat et al., 2006). Anhand dieser Befunde zeigen sich Zusammenhänge zwischen der Proteinqualitätskontrolle und apoptotischen Vorgängen, die beide die Proteomzusammensetzung in den Mitochondrien und damit den Prozess des Alterns beeinflussen.

### **1. 5. 2 Bedeutung apoptotischer Prozesse in Alternsprozessen**

Die Apoptose ist ein kontrollierter Prozess des programmierten Zelltodes, der u. a. für die Eliminierung entarteter Zellen eine wichtige Rolle spielt. Die Apoptose wird entweder extrinsisch (Typ I) oder intrinsisch (Typ II) initiiert. Bei der intrinsischen Initiation der Apoptose spielen Mitochondrien eine bedeutende Rolle u. a. durch die Freisetzung des Cytochrom c-Proteins aus den Mitochondrien, die durch die beiden Proteine BCL2 und BAX vermittelt wird. BCL2 ist ein Protein in der äußeren Mitochondrienmembran, das unter normalen Umständen die Apoptose inhibiert. Wenn Apoptose durchgeführt werden soll bindet BAX nach seiner Translokation zur äußeren mitochondrialen Membran an BCL2 und inhibiert die anti-apoptotische Wirkung von BCL2. Dies fördert die Schädigung der äußeren Membran und die Freisetzung von Cytochrom c (Übersicht bei: Desagher und Martinou, 2000). Nach der Cytochrom c-Freisetzung ins Cytoplasma bindet dieses an das Protein APAF1 und unter ATP-Verbrauch wird aus APAF1 und Cytochrom c mit der Caspase 9 das Apoptosom gebildet (s. Abb. 11). Caspase 9 aktiviert durch Schneiden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7. Somit wird eine sogenannte Caspase-Kaskade aktiviert und zahlreiche Proteine in der Zelle werden abgebaut. Diese Effektor-Caspasen sind Proteasen, die ihre Zielproteine an einem Aspartat-Rest schneiden und somit die ausführenden Faktoren der Apoptose darstellen.

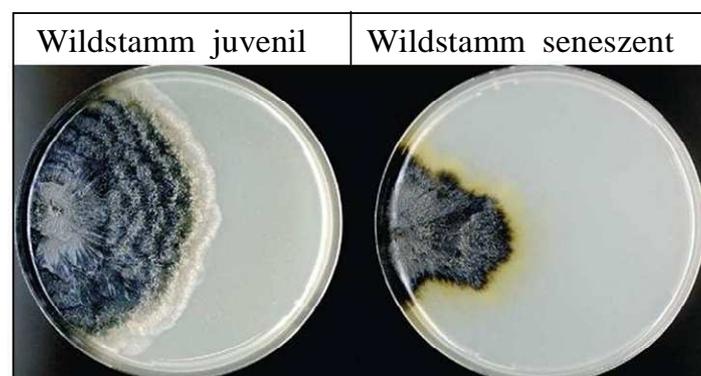


**Abb. 11: Initiierung der Apoptose.** Nach einem apoptotischen Signal kommt es zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran und zur Freisetzung von Cytochrom c (CYTc). Dieses bindet im Cytoplasma an das Protein APAF1 und unter ATP-Verbrauch wird aus APAF1 und Cytochrom c mit der Caspase 9 das Apoptosom gebildet. Dieses aktiviert durch Schneiden die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 die Caspase-Kaskade, es kommt zur Apoptose.

Neben der Caspase-abhängigen Apoptose existiert ein Caspase-unabhängiger Apoptoseweg, an dessen Auslösung die Mitochondrien noch direkter beteiligt sind. Die Mitochondrien sind in der Lage, Apoptose auszulösen, indem sie AIF freisetzen. Dieser ist unter Normalbedingungen im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert. Nach der Freisetzung aus den Mitochondrien wandert er in den Zellkern und induziert dort den Abbau der nukleären DNA. In der Folge stirbt die Zelle durch eine Caspase-unabhängige Apoptose. Es existiert noch ein ähnliches mitochondriales Protein, das AMID („AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death“). Dieses ist an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert und induziert wahrscheinlich im Zellkern apoptotische Prozesse (Wu et al., 2002). In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass apoptotische Vorgänge ebenfalls in Ascomyceten wie beispielsweise in der Hefe *S. cerevisiae* (Wissing et al., 2004) und in *Podospora anserina* existieren. *P. anserina* gehört zu den filamentösen Pilzen, in denen bis jetzt wenig über Apoptose bekannt ist. Zusätzlich ist im letzten Jahr bekannt geworden, dass neben den apoptotischen Prozessen die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle und demnach ebenfalls die Proteomzusammensetzung das Altern in diesem leicht zugänglichen Modellorganismus beeinflussen.

## 1.6 Der filamentöse Ascomycet *Podospora anserina* in der Alternsforschung

*P. anserina* wird in die Klasse der Ascomyceten (Schlauchpilze) innerhalb der Familie der Sordariaceen eingeordnet und lebt als saprovorischer (Substrat-verwertender) Organismus auf Herbivorendung. *P. anserina*-Kulturen bestehen aus einem dichten Geflecht „schlauchartiger“, miteinander verbundener Zellen (Hyphen), das in seiner Gesamtheit als Myzel bezeichnet wird. Im Gegensatz zu vielen anderen Ascomyceten, z. B. dem Schimmelpilz *Neurospora crassa* oder dem pathogenen Pilz *Aspergillus fumigatus*, zeichnet sich dieser Hyphenpilz dadurch aus, dass er sein Wachstum nach einem definierten Zeitraum einstellt (Osiewacz, 2002a). Beim Wildstamm s kommt es nach ca. 25 Tagen auf Standardmedium zu Morphologieveränderungen, wie z. B. einer Hyperpigmentierung, einer verringerten Bildung von Luftmyzel und zu einem Wachstumsstopp. *P. anserina* bietet als leicht zugänglicher Modellorganismus in der molekularen Alternsforschung zahlreiche Vorteile: Eine einfache Kultivierbarkeit, kurze Generationszeiten, und die Möglichkeit, die jeweiligen Lebensstadien phänotypisch je nach Alter in juvenil, mittelalt und seneszent einzuteilen.



**Abb. 12: Phänotyp von jungen und alten *P. anserina*-Kulturen auf Standardmedium.** Das seneszente Isolat (rechts) zeigt im Vergleich zum juvenilen Stamm (links) eine verstärkte Pigmentierung, eine Abnahme der Wachsrate (cm/Tag) und eine reduzierte Bildung von Luftmyzel (Osiewacz, 2002b).

Im Rahmen früher, genetischer Analysen des Alternsprozesses von *P. anserina*, wurde gezeigt, dass nach der Befruchtung eines seneszenten Stammes mit juvenilen Spermarien, Fruchtkörper (Perithezian) entstanden, die entweder juvenile oder seneszente Nachkommen enthielten. Somit wurde gezeigt, dass das Altern von einem cytoplasmatischen Faktor beeinflusst wird (Marcou, 1961). Bei dem cytoplasmatischen Faktor handelt es sich um die Mitochondrien.

In den Hyphen eines *P. anserina* Stammes liegen zwei verschiedene Kreuzungstyparten von haploiden Zellkernen vor: plus und minus. *P. anserina* besitzt zwar die Möglichkeit, an einem Myzel männliche und weibliche Fortpflanzungsorgane auszubilden, in einem homokaryotischen Stamm mit nur einem Kreuzungstyp kann es jedoch nicht zur Selbstbefruchtung kommen, da sich immer nur ein Spermium (Gamet) und eine Trichogyne (Empfängnishyphe), die Teil des weiblichen Gametangiums ist, aus heterokaryotischen Myzelien vereinigen können. Diese Befruchtungsart von *P. anserina* wird Gameto-Gametangiogamie genannt. Kommt es zur Karyogamie und zur Meiose, werden normalerweise vier geordnete zweikernige Ascosporen in einem sogenannten Ascus gebildet. Diese befinden sich im Fruchtkörper des Pilzes, dem Perithezium. Wenn die Ascosporen, nachdem sie aktiv aus dem Ascus herausgeschleudert wurden, keimen, wachsen sie zu Hyphen und bilden wieder ein juveniles Myzel. Es kommt relativ selten vor, dass sogenannte irreguläre Asci mit mehr als vier Sporen gebildet werden. Dies kann durch eine fehlerhafte Sporenwandbildung geschehen, bei der nur Einzelkerne umschlossen werden. Einkernige Sporen können auch wieder zu Hyphen und Myzel auswachsen. Aus diesen irregulären Asci werden somit homokaryotische Myzelien erhalten, die genetisch stabil bleiben und größtenteils für Analysen im Labor verwendet werden.

Es wurde in vielen Studien gezeigt, dass konservierte mitochondriale Mechanismen in *P. anserina* den Alternsprozess beeinflussen (Übersicht bei Osiewacz, 2002b). Aufgrund der beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften von *P. anserina* wurden zahlreiche Faktoren der mitochondrialen Rolle während der Alterns aufgedeckt: Unter anderem ändert sich die Mitochondrienmorphologie in der Seneszenz, es kommt zu mtDNA-Reorganisationen (Stahl et al., 1979) und die Mitochondrien fragmentieren und zeigen im Mikroskop eine abgekugelte Form (Scheckhuber et al., 2007). Es wurde zusätzlich gezeigt, dass in *P. anserina* eine alternsbeeinflussende, mitochondriale Proteinqualitätskontrolle (s. 1. 6. 1) und apoptotische Vorgänge (s. 1. 6. 2) existieren, welche die Proteomzusammensetzung im seneszenten Stadium des Pilzes wahrscheinlich deutlich verändern. Jedoch existieren in *P. anserina*, wie in vielen anderen Modellsystemen, erst wenige, initiale Daten, die aus einer ungerichteten Untersuchung alternsspezifischer Änderungen des Proteoms generiert wurden (s. 1. 6. 3). Ein Protein, das in *P. anserina* im Rahmen solcher Analysen als seneszenzspezifisch differentiell gebildet identifiziert wurde, gehört zu den O-Methyltransferasen (s. 1. 6. 4).

### **1. 6. 1 Die Rolle der LON-Protease während des Alterns in *P. anserina***

Die Identifizierung eines *P. anserina*-Homologs der LON-Protease PaLON im Rahmen einer *in silico*-Analyse (Luce und Osiewacz, 2009), deutete darauf hin, dass in *P. anserina* eine mitochondriale Proteinqualitätskontrolle existiert, die u. U. die Lebensspanne dieses Ascomyceten beeinflussen. Die Überexpression von *PaLon* führt zu einer signifikanten Lebensverlängerung (etwa 65%). Zusätzlich zeigt diese Mutante keine physiologischen Nachteile wie beispielsweise eine verringerte Fertilität- oder Atmungsrate wie sie in anderen langlebigen Mutanten von *P. anserina* beobachtet werden.

Um zu analysieren, ob durch die *PaLon*-Überexpression weniger oxidativ geschädigte, mitochondriale Proteine vorhanden sind, wurden im Rahmen einer „Oxyblot“-Analyse (s. o.) die oxidierten, carbonylierten Proteine quantifiziert. In mitochondrialen Proben dieses Stammes wurden 40 % weniger oxidativ geschädigte Proteine detektiert als im Wildstamm. Zusätzlich wurden weniger „advanced glycation endproducts“ (AGE) im Vergleich zum Wildstamm gefunden. Eine verbesserte Wachsrates auf Wasserstoffperoxid und weniger oxidativ geschädigte mitochondriale Aconitase zeigen, dass eine erhöhte Aktivität der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle zu einer verbesserten Funktion der Mitochondrien führt und somit zur Verlängerung der Lebensspanne beitragen. Diese Daten komplementieren LON-Protease-Deletionsstudien in anderen Modellsystemen, in denen gezeigt wurde, dass das Fehlen dieser Protease negative Auswirkungen hat (Suzuki et al., 1994; Bota et al., 2005). Anhand dieser Befunde wird demnach deutlich, dass die effektive Beseitigung geschädigter Proteine durch die mitochondriale Proteinqualitätskontrolle eine bedeutende Rolle in den Mitochondrien einnimmt und damit die Lebensspanne von *P. anserina* verlängert. Weiterhin deuten neuere Befunde darauf hin, dass nicht nur Qualitätskontrolle in *P. anserina* stattfindet, sondern, dass noch andere Schutzmechanismen gegen die Manifestierung oxidativer Schäden existieren, beispielsweise apoptotische Prozesse.

### 1. 6. 2 Apoptose in *P. anserina*

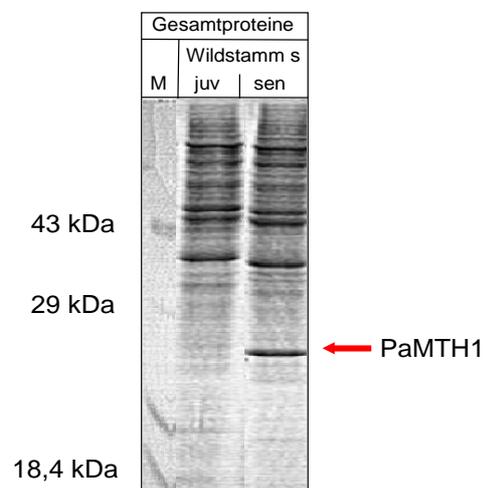
Die Identifikation und Charakterisierung der zwei Metacaspasen PaMCA1 und PaMCA2 (Hamann et al., 2007) in *P. anserina* geben Hinweise darauf, dass das Absterben der *P. anserina*-Kulturen zumindest teilweise durch Apoptose gesteuert zu sein scheint und dass auch auf diesem Weg u. U. schwer geschädigte Zellen Bereiche des Myzels absterben. Bei einer Deletion des *PaMca1*- und des *PaMca2*-Gens in *P. anserina* wird die mittlere Lebensspanne dieser Mutanten signifikant verlängert. Ein deutlicher Effekt ist vor allem bei der *PaMca1*-Deletionsmutante (148 %) zu beobachten. Im Rahmen der Analysen in *P. anserina* wurde ebenfalls ein Proteinhomolog von AMID identifiziert: PaAMID. Die verlängerte Lebensspanne von *P. anserina*-Deletionsmutanten dieses Gens zeigt wiederum eine Beteiligung der Mitochondrien an apoptotischen Prozessen in diesem Ascomyceten, die die Seneszenz sehr wahrscheinlich beschleunigen. Über die Induktion dieser Apoptose ist bis jetzt noch nicht sehr viel bekannt, allerdings wurde in *P. anserina*, wie auch in anderen Modellsystemen, gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies, z. B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Apoptose und die Fragmentierung der Mitochondrien auslösen können (A. Hamann, pers. Mitteilung). Dies

zeigt, dass z. B. eine zu große Schädigung der Zellen durch eine erhöhte ROS-Bildung, wie sie in *P. anserina* in der Seneszenz belegt wurde (Scheckhuber et al., 2007) der Auslöser der apoptotischen Vorgänge sein könnte. Die Apoptose während der Seneszenz in *P. anserina* wird in diesem Fall unter Umständen zur Beseitigung dieser sehr geschädigten Zellen benutzt, die wiederum zu einer signifikanten Veränderung der Proteomzusammensetzung führen. In *P. anserina* existieren erst wenige Analysen, in denen die differentielle Bildung von Proteinen während des Alterns, beispielsweise anhand von SDS-PAGE oder Westernblot-Analysen untersucht wird.

### 1. 6. 3 Proteomanalyse in *P. anserina*

In einer Analyse von Averbeck et al. (2000) wurde mit Hilfe einer eindimensionalen SDS-PAGE mit Gesamtproteinen eine sehr prominente Proteinbande in der Probe aus dem seneszenten Wildstamm gezeigt.

Dieses Protein wurde aus dem Gel isoliert und als die S-Adenosylmethionin abhängige O-Methyltransferase PaMTH1 identifiziert. Es stellt somit ein differentiell gebildetes Protein während der Alterns dar, das in *P. anserina* mit Hilfe einer protein-biochemischen Methode identifiziert wurde.



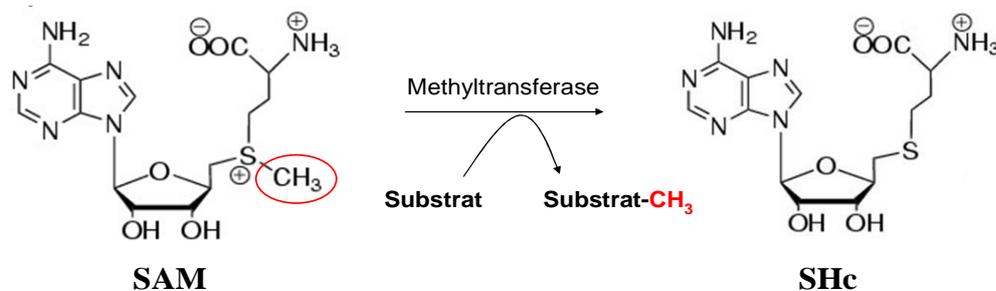
**Abb. 13: Auftrennung von Gesamtproteinen eines juvenilen und eines seneszenten Wildstammes in einer denaturierenden SDS-PAGE.** Nach der Coomassiefärbung des SDS-Gels wird deutlich, dass in der Probe aus dem seneszenten Stamm ein etwa 27 kDa großes Protein in großer Menge gefunden wird. Mit Hilfe einer Proteinsequenzierung wurde dieses als die SAM-abhängige O-Methyltransferase PaMTH1 identifiziert (modifiziert nach Averbeck et al., 2000).

Die Methyltransferase PaMTH1 wurde in dieser Arbeit näher charakterisiert (s. u.). Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel Informationen zur Struktur und Funktion der

Methyltransferasen, deren Vorkommen schon in sehr vielen Organismen gezeigt wurde, gegeben.

## 1.7 Struktur und Funktion von O-Methyltransferasen

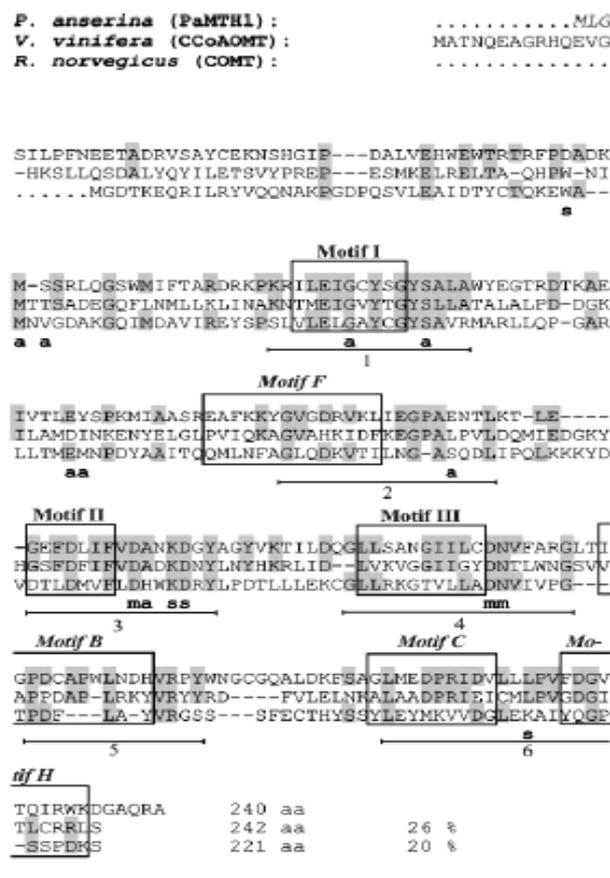
In vielen Analysen und Studien wurde gezeigt, dass so genannte S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen ubiquitär in Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen vorkommen und dass sie an der Methylierung von zahlreichen unterschiedlichen Substraten beteiligt sind (s. u.). Diese Enzyme übertragen eine Methylgruppe auf den Sauerstoff der Hydroxylgruppe ihrer Substrate (O-Methyltransferase), bei denen es sich um RNA, DNA, Proteine oder Sekundärmetabolite in der Zelle handeln kann. Bei dieser Methylierung wird S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methyl donor verwendet und nach der Abspaltung der Methylgruppe in S-Adenosyl-Homocystein (SHc) umgewandelt. Der Methyl donor SAM wurde als erstes 1951 entdeckt (Cantoni, 1951). Er entsteht durch die Übertragung von Methionin auf Adenosin-Triphosphat, die durch das Enzym Methionin-Adenosyltransferase katalysiert wird. SAM kann als Methyl donor genutzt werden, da die Methylgruppe, die mit dem Schwefelatom im Methionin verbunden ist, chemisch aktiv ist.



**Abb. 14: Funktion des S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methyl donor in Reaktionen mit Methyltransferasen.** Von dem chemisch aktiven Schwefelatom wird während der Methyltransferase-vermittelten Reaktion eine Methylgruppe abgespalten und auf das jeweilige Substrat übertragen. Das SAM wird somit in S-Adenosyl-Homocystein (SHc) umgewandelt (s. u.).

Die Proteinfamilie der O-Methyltransferasen wird aufgrund von Sequenz-, Substrat- und Strukturuntersuchungen in zwei große Klassen unterteilt: die Kation-abhängigen Methyltransferasen der Klasse I- und die Kation-unabhängigen Klasse II-Methyltransferasen. Die Methyltransferasen der ersten Klasse besitzen ein eher kleines Molekulargewicht von 25-30 kDa, die Enzyme der zweiten Klasse zeigen eine Monomer-Größe um 40 kDa (Joshi und Chiang, 1998).

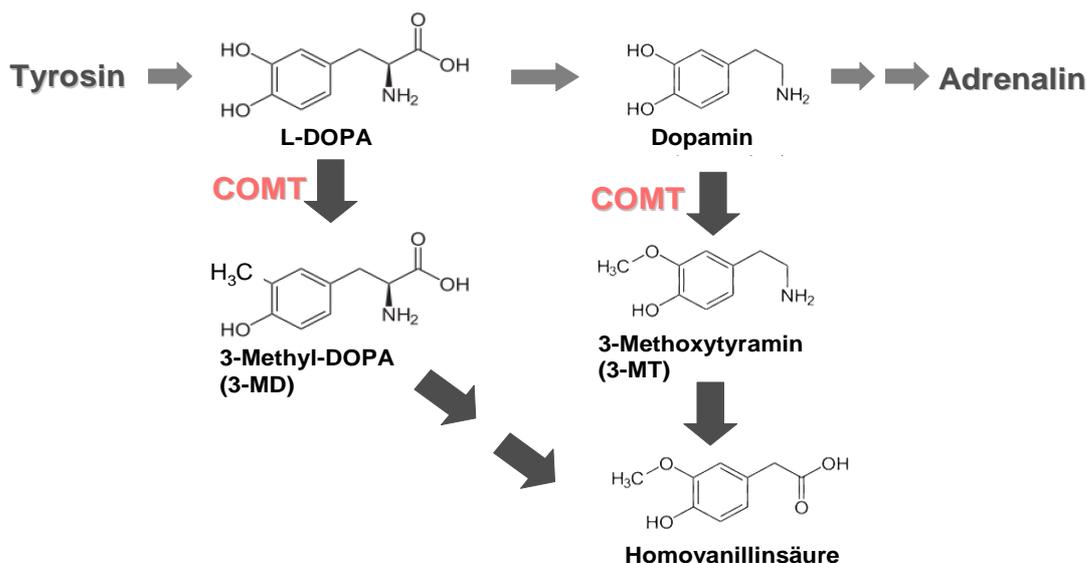
Während der initialen Analysen, die von Nicole Averbek innerhalb ihrer Dissertation zur Untersuchung von PaMTH1 durchgeführt wurden, wurde ein Vergleich der PaMTH1-Proteinsequenz mit den Proteinsequenzen von anderen bekannten Methyltransferasen erstellt. Die Untersuchung der Proteinsequenz vermittelt einen ersten Eindruck von der Ähnlichkeit von PaMTH1 mit anderen Methyltransferasen aus dieser sehr großen Proteinsuperfamilie (s. Einleitung). Für den Homologievergleich wurden die Proteinsequenz von PaMTH1 aus *P. anserina*, der pflanzlichen Caffeoyl-CoA-Methyltransferase aus *Vitis vinifera* (*V. vinifera* CCoAOMT) und der Catechol O-Methyltransferase aus der Ratte (*Rattus norvegicus* COMT) verwendet (Averbek et al., 2000). Es wird deutlich, dass in der PaMTH1-Sequenz die für die Methyltransferasen typischen Motive I-III (Kagan und Clarke, 1994) und die Motive F, B, C und H (Joshi and Chiang, 1998b) vorhanden sind (Abb. 15)



**Abb. 15: Homologievergleich verschiedener Methyltransferase-Proteinsequenzen mit der PaMTH1-Sequenz aus *P. anserina*.** Anhand des Vergleiches der Aminosäuresequenzen der PaMTH1 aus *P. anserina* (PaMTH1) der Caffeoyl-CoA-Methyltransferase aus *Vitis vinifera* (*Vitis vinifera* CCoAOMT) und der Catechol O-Methyltransferase aus der Ratte (*Rattus norvegicus* COMT), wird sichtbar, dass in der PaMTH1-Sequenz die Methyltransferase-typischen Motive I-III nach Kagan und Clarke (1994) und die Motive F, B, C und H nach Joshi und Chiang (1998) vorhanden sind. Alle mit „a“ gekennzeichneten Aminosäuren sind für die Bindung des Methyl donors S-Adenosylmethionin wichtig, alle mit „m“ gekennzeichneten Aminosäuren sind an der Bindung des Magnesiums beteiligt und alle mit „s“ gekennzeichneten Aminosäuren sind an der Substratbindung beteiligt. Die Homologieanalyse wurde mit dem Programm „ClustalW“ (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Identische Aminosäuren werden grau unterlegt (modifiziert nach Averbek et al., 2000).

Das Motiv I, (Kagan und Clarke, 1994) ist z. B. für die Wechselwirkung der Methyltransferase mit dem Methyl donor S-Adenosyl-Metionin (SAM) wichtig. Das Vorhandensein dieses Motivs zeigt deutlich, dass es sich bei PaMTH1 um ein Enzym dieser Art von SAM-abhängigen Methyltransferasen handelt. Gleichzeitig besitzen alle drei Methyltransferasen zahlreiche Aminosäuren, die an der Bindung dieser Kation-abhängigen Methyltransferasen an das Magnesium-Kation beteiligt sind. Bei dieser Analyse werden allerdings auch Unterschiede in der Homologie der verglichenen Enzyme deutlich. So unterscheidet sich PaMTH1 z. B. im Bereich zwischen den Motiven B und C deutlich von den anderen beiden Methyltransferasen. Dieser Sequenzhomologievergleich zeigt jedoch nur einen minimalen Teil der sehr großen Proteinsuperfamilie der Methyltransferasen. Der Vergleich mit der pflanzlichen und der Säuger-Methyltransferase zeigt die erwarteten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei Enzyme, gibt aber keinen Aufschluss über weitere Eigenschaften, wie z. B. Dimer-Bildung oder Substratspezifität.

Klasse I-Methyltransferasen liegen beispielsweise in Pflanzen in dimerer Form vor und sind dort an der Ligninbiosynthese beteiligt. Unter der Mitwirkung eines divalenten Metall-Ions (z. B. Magnesium), das sie zur Deprotonierung der Akzeptor-Hydroxylgruppe benötigen, methylieren sie während der Ligninbiosynthese Caffeoyl-CoA, das wichtigste und zuerst entdeckte Substrat der pflanzlichen Klasse I- Methyltransferasen (Ye et al., 1994). Im Gegensatz zu den pflanzlichen Kation-abhängigen Enzymen liegen die menschlichen und tierischen Methyltransferasen, die identifiziert und analysiert wurden, in monomerer Form vor und zeigen ebenfalls ein Molekulargewicht von etwa 25-30 kDa. Für diese Methyltransferasen wurde gezeigt, dass sie eine etwas breitere Substratspezifität im Gegensatz zu den pflanzlichen Klasse I-Enzymen besitzen. Die menschliche Catechol-O-Methyltransferase (COMT) ist beispielsweise am Abbau von Dopamin beteiligt und kann L-DOPA im zentralen Nervensystem vieler Säuger methylieren (Vieira-Coelho und Soares-da-Silva, 1993).



**Abb. 16: Hemmung der Dopamin-Synthese durch Methylierung von L-DOPA und direkte Dopamin-Methylierung durch die COMT in Nervenzellen von Säugern.** Ein Weg zur Verringerung der Dopamin-Konzentration nach einer Reizleitungsreaktion stellt die COMT-Methylierung der Dopamin-Vorstufe L-Dihydroxy-Phenylalanin (L-DOPA) dar. Dieses ist im Syntheseweg des Dopamins aus dem Ausgangsstoff Tyrosin als Zwischenprodukt vorhanden. Das Dopamin kann jedoch auch direkt in das 3-Methoxytyramin (3MT) umgewandelt werden. L-DOPA und 3MD werden schließlich zu Homovanillinsäure abgebaut. Die Methylierung dieser beiden Substanzen stellt unter bestimmten Bedingungen auch eine Entgiftung dar, weil diese beiden Stoffe aufgrund der Dihydroxyl-Gruppen prooxidativ wirken können (s. o.).

Zusätzlich zu diesen Funktionen wurde in zahlreichen Analysen gezeigt, dass die COMT andere endogene und exogene Catechole methylieren kann. Sie kann beispielsweise Catecholhaltige Östrogene, wie Estradiol, oder Tee-Catechine (Catechin und Epicatechin) methylieren (Zhu et al., 1994; Bai et al., 2007). Die Methylierung von Estradiol verhindert interessanterweise die vorher beschriebene Estradiol-vermittelte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die neben anderen Faktoren für die Krebs-erregende Wirkung des Estradiols verantwortlich gemacht wird. In molekularen Analysen wurde diese Methylierung als Schutzmechanismus beschrieben.

Für dieses Enzym wurde im Rahmen von *in vitro*-Analysen gezeigt, dass es auch Flavonoide methylieren kann, wie z. B. Quercetin (Schröder et al., 2002). Quercetin wird sogar 100 x besser akzeptiert als das Substrat L-DOPA, außerdem kann die COMT auch das Flavonoid Fisetin methylieren (Bai et al., 2007). Auch bei einigen pflanzlichen Klasse I-Methyltransferasen, die lange Zeit in ihrer Substratazeptanz als sehr eingeschränkt eingestuft wurden, wurde in neueren Analysen herausgefunden, dass einige Vertreter andere Substrate wie z. B. Flavonoide akzeptieren. Ein Beispiel für diese Methyltransferasen ist die PFOMT aus *Mesembryanthemum crystallinum* (Eispflanze), für die gezeigt werden konnte, dass sie neben Caffeoyl-CoA auch das Flavonoid Quercetin methylieren kann (Ibdah et al., 2003). Flavonoide stellen eigentlich Substrate für Methyltransferasen aus der zweiten Klasse dar.

In dieser zweiten Klasse der Methyltransferasen, die sehr viel größer ist als die erste Klasse, besitzen die Methyltransferasen eine breitere Substratakzeptanz als die Enzyme in der ersten Klasse. Klasse II-Methyltransferasen methylieren ohne Beteiligung von Metall-Ionen sehr oft in Pflanzen unterschiedlichste Arten von Flavonoiden (Kopycki et al., 2008) sowie z. B. Myoinositol (Vernon und Bohnert, 1992). Interessanterweise methylieren auch diese Enzyme zum Teil Substrate in der Lignin-Synthese, die eigentlich von Klasse I-Enzymen erkannt werden. Eine Klasse II-Methyltransferase, die mit Proteinreparatur während des Alterns verbunden wird, ist die Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase PIMT, die z. B. in Mäusegehirnen geschädigte Aspartate in  $\beta$ -Tubulin repariert (Lanthier et al., 2002). Dieses Enzym methyliert freie  $\alpha$ -Carboxylgruppen in L-Isoaspartyl-Resten von falsch gefalteten oder geschädigten Proteinen. Diese Reaktion initiiert die Umwandlung der Isoaspartyl-Reste in Aspartyl-Verbindungen, sodass wieder eine korrekte Proteinstruktur vorliegt. Die Proteinfamilie der Methyltransferasen erfüllt demnach sehr viele Aufgaben in vielen verschiedenen Organismen, Pflanzen und sogar Bakterien.

## 2 Problemstellung

Die Hauptzielsetzung dieser Arbeit war die Identifikation neuer mitochondrialer, altersabhängiger Signalwege und Funktionen mit Hilfe einer differentiellen Proteomanalyse der Mitochondrien. Dazu sollten möglichst gleich behandelte, hochreine Mitochondrien junger und alter Wildstämme isoliert und charakterisiert werden. Die Rolle der interessanten, während des Alterns differentiell-gebildeten Proteine in *P. anserina* sollte anschließend mit Hilfe von molekularbiologischen, biochemischen und physiologischen Methoden charakterisiert werden.

## 3 Material

### 3.1 Bezugsquellen

#### 3.1.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller
Autoklav	GE 446 EC-1	Geringe
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	Kelvitron Rubarth Hannover	Heraeus
Bunsenbrenner	GASI	Schütt
Chemilumineszenzgerät	Chemi Smart 5000	PeqLab
„Crosslinker“	UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Einschweißgerät		Petra
Elektrophorese	Mini SUB DNA Cell Wide-Mini SUB DNA Cell Mini Protean II Protean II	BioRad
Feinwaage	PB 303	Mettler Toledo
Filmentwickler	Protec 45 compact	Protec
Fluoreszenzmikroskop	CLSM TCS SP5	Leica
Heizbad	U3	Julabo
Heizblock	Thermomixer compact Dri-Block DB 3	Eppendorf Techne
Homogenisator	Bead-Beater <sup>TM</sup> Disruptor Genie Waring-Blendor	Roth Scientific Industries Waring
Hybridisierungsöfen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham
Kühlschrank		Liebherr
Magnetrührer	Ikameg Reo	Ikameg
Mikroskop	Laborlux S DM LB	Leitz Leica
Mikroskop-Kamera	DC 500	Leica
Mikrowelle	Jet 900w	Whirlpool
Wasseraufbereitung	Milli-Q Plus	Millipore
Minizentrifuge	C-1200	National Labnet Co.
Multiplate Reader	Infinite M1000	Tecan
NanoDrop®	ND-1000	Peqlab
Spectrometer		
Netzgeräte	GPS 200/400	GE Healthcare
pH-Meter	Calimatic 761	Knick
PCR-Geräte	TGradient 96 T1 Thermocycler 96	Biometra Biometra
Pipetten (1000µl, 200µl, 20µl, 2µl)		Abimed
“Real Time“-PCR Optik	MJ MiniOpticon	BioRad
Schüttelinkubator	HT-Infors	Infors-HT
Sterilbank	NSF 49; LF 460 EC	Clean Air
Transilluminator	CSI	Cybertech
Trockenschrank	TKE 117	EHRET
Vakuum-	LKB VacuGene XL	Pharmacia
Transferapparatur		
Vakuumzentrifuge	SpeedVac Plus SC 110A	Savant

Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Waage	PB 303	Mettler Toledo
	LC 82	Sartorius
Wasserbad	1083 (GFL), MP, U3	Julabo
Zentrifugen	5415 C mit F-45-18-11 (Festwinkelrotor)	Eppendorf
	5417 R mit FA-45-24-11 (Festwinkelrotor)	Eppendorf

### 3. 1. 2 Sonstige Materialien

Materialien	Modell	Hersteller
Cellophanfolie		BioRad
Filterpapier	3MM	Whatman
Glasperlen	0,5 mm	Biospec Products
Hybridisierungsmembran	Hybond-N	GE Healthcare
Hybridisierungsröhren	Hybridisierungsröhren	GE Healthcare
PVDF-Membran	Millipore Immobilon-P	Roth
Röntgenfilm	Hyperfilm MP	GE Healthcare
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos

### 3. 1. 3 Stoffe und Reagenzien

Substanz	Firma	Substanz	Firma
Aceton	Roth	KCl	Roth
Acrylamid	Roth	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Agar	Roth	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Agarose	Invitrogen	LiCl	Merck
Ampicillin	Boehringer	Maismehl	Aurora
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich	Maleinsäure	Merck
Biomalz	Roth	β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Blocking	Licor	Methanol	Roth
Bromphenolblau	Serva	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck
BSA	Sigma-Aldrich	MitoTrackerRed	Molecular Probes
CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck,	MnCl <sub>2</sub>	Roth
Casamino-säuren	Difco,	MnSO <sub>4</sub>	Merck
Chloroform	Roth	MOPS	Sigma-Aldrich
CsCl	Invitrogen	N-Lauroylsarkosin	Roth
α-32P-dCTP	Amersham	NaAcetat	Roth
CuSO <sub>4</sub>	Merck	NaCitrat	Roth
dATP	MBI Fermentas	NaCl	Roth
dCTP	MBI Fermentas	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck
dGTP	MBI Fermentas	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Digitonin	Sigma-Aldrich	NaOH	Roth
DMPC	Sigma-Aldrich	NH <sub>4</sub> Cl	Merck
Dithiothreitol	Merck	Polyethylenglykol	Serva
EDTA	Merck	Pepton	Roth

Essigsäure	Roth	Phenol	Roth
FeCl <sub>2</sub>	Merck	Phleomycin	Calbiochem
FeSO <sub>4</sub>	Merck	Polyvinylpyrrolidon	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth	PVDF-Membran	Millipore
Formamid	Roth	Röntgenfilm	Amersham
Glass-beads (0,5 mm)	Sigma-Aldrich	Roti-Nanoquant	Roth
Glucanex	Nordisk Ferment	Saccharose	Roth
Glucose x H <sub>2</sub> O	Merck	SDS Natriumlauryl	Roth
Glycerin	Roth	Sorbit	Serva
Glycin	Roth	TEMED	Sigma-Aldrich
GTC	Sigma-Aldrich	TRIS	Roth
HCl	Merck	Tween20	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Difco	Trypton	Difco
Heringssperma-DNA	Serva	Xylencyanol	Serva
Hybond N	Amersham	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	Merck
Hygromycin B	Calbiochem		
Isoamylalkohol	Roth		

## 3. 2 Medien und Lösungen

### 3. 2. 1 Medien

#### Ammoniumacetat-Medium

60 mM Ammoniumacetat  
in BMM-Medium  
2% (w/v) Agar  
autoklavieren

#### BMM (Biomalz Mais-Medium)

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

#### CM-Medium (*Podospora* Anzuchtmedium)

1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,5g KCl  
0,5g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
10g Glucose-Monohydrat  
3,7g NH<sub>4</sub>Cl  
2g Trypton  
2g Hefe-Extrakt  
1ml Stammlösung A  
ad 1 l H<sub>2</sub>O  
pH 6,5 (KOH)  
autoklavieren

#### PASM-Medium

10g Glucose  
0,5g KH<sub>2</sub>PO<sub>3</sub>  
0,6g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1g Harnstoff  
2% Agar  
Nach dem Autoklavieren:  
5µl Biotin (0,5mg/ml)  
200µl Thiamin (250mg/ml)  
1ml PASM Spurenelementlösung

#### Spurenelementlösung (PASM)

für 1 Liter:  
500mg CitricAcid x H<sub>2</sub>O  
500mg ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O  
100mg Fe(NH<sub>2</sub>) (SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O  
25mg CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O  
5mg MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O  
5mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>  
5mg NaMoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
in 100ml Millipore-  
Wasser sterilfiltrieren

#### Stammlösung 1 (50x, für Transformationsmedium)

7,5% (w/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
2,5% (w/v) KCl  
2,7% (w/v) MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O

**Luria-Bertani(LB)-Medium**

1% (w/v) Trypton  
 0,5% (w/v) Hefeextrakt  
 0,5% (w/v) NaCl  
 pH 7,2 (NaOH)  
 Festmedium: 2 % (w/v) Agar  
 Nach dem Autoklavieren:

**LBA:** 50 µg/ml Ampicillinlösung

**LBT:** 12,5 µg/ml Tetrazyklinlösung

**LB/X-Gal/IPTG:** 2 µl/ml X-Gal (4%) + 5 µl/ml IPTG (100 mM)

=> 0,008 % X-Gal, 0,5 mM IPTG

**Stammlösung 2 (50x, für Transformationsmedium)**

0,005% (w/v) ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
 0,005% (w/v) Fe SO<sub>4</sub>x 7 H<sub>2</sub>O  
 0,005% (w/v) CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
 0,005% (w/v) MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O

**Transformationsmedium**

3,7g Ammoniumchlorid  
 2,0g Trypton  
 1,0g Hefe-Extrakt  
 10,0g Glucose-Monohydrat  
 342,3g Saccharose  
 20ml Stammlösung 1  
 20ml Stammlösung 2  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O  
 pH 6,0 (KOH)  
 f 1,2% (w/v) bzw. 0,5 % Agar,  
 autoklavieren, 100 µg/ml Hygromycin

**3. 2. 2 Lösungen****Ampicillin**

50mg/ml in Wasser lösen  
 sterilfiltrieren

**1D-Anodenpuffer**

25 mM Imidazol  
 pH 7,0 (HCl)

**BN-Ladepuffer**

500 mM ε-Aminocaprinsäure  
 50 mM Bis/Tris  
 5 % (w/v) Coomassie Blue G250  
 pH 7,0 (nicht einstellen)

**3 x BNP-Puffer**

1,5 M ε-Aminocaprinsäure  
 75 mM Imidazol  
 pH 7,0 (HCl)

**Blotting-Puffer**

3g Tris  
 14g Glycin  
 200ml Methanol  
 ad 1 l mit H<sub>2</sub>O

**Chloroform/Isoamylalkohol**

96% (v/v) Chloroform  
 4% (v/v) Isoamylalkohol

**Coomassie-Entfärbelösung**

20% (v/v) Methanol  
 7% (v/v) Eisessig  
 34% (v/v) Glycerin

**DIG-Puffer 3**

0,1 M Tris/HCl (pH 9,5)  
 0,1 M NaCl  
 autoklavieren

**DIG-Waschpuffer**

0,3% (v/v) Tween 20  
 in DIG-Puffer 1

**DMPC-H<sub>2</sub>O**

1ml DMPC  
 + 99ml 50% Ethanol  
 ad 1 l H<sub>2</sub>O

**DNA-Ladepuffer (6x)**

0,25% (w/v) Bromphenolblau  
 0,25% (w/v) Xylencyanol  
 50% (w/v) Saccharose  
 0,1 M EDTA

**DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)**

7% (w/v) SDS  
 5 x SSC  
 0,1% (w/v) N-Lauroylsarkosin  
 2% (w/v) Blockingreagenz  
 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,0)

**DIG-Puffer 1**

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

**Coomassie-Färbelösung**

50% (v/v) Methanol  
7% (v/v) Eisessig  
0,1% (w/v) Coomassie-Brillantblau  
filtrieren

**DTT (1 M)**

3,09g DTT  
in 20ml 0,01 M NaAc (pH 5,2)  
sterilfiltrieren

**Denaturierungslösung**

1,5 M NaCl  
0,5 M NaOH  
autoklavieren

**Denaturierungsmix (RNA)**

7 % (v/v) 10 x MOPS  
9 % (v/v) Formaldehyd  
70 % (v/v) Formamid

**DIG-Puffer 2**

0,5% (w/v) Blockierungsreagenz in DIG-Puffer 1

**Entwicklerlösung (Silberfärbung)**

10g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
540µl Formaldehyd (37%)

**Extraktionspuffer (Gesamtprotein)**

50 mM HEPES (pH 7,4)  
100 mM NaCl  
0,1 % CHAPS  
1 mM DTT  
0,1 mM EDTA  
CHAPS und DTT erst nach autoklavieren

**Fixierer 1 (Silberfärbung)**

12 % (v/v) Essigsäure  
50 % (v/v) Methanol

**Fixierer 2 (Silberfärbung)**

50 % (v/v) Ethanol

**Glycin-Stripping-Puffer**

0,2 M Glycin  
0,1 % (w/v) SDS  
1% (v/v) Tween 20  
pH 2,2 (HCl)

**1D-Kathodenpuffer**

50 mM Tricin  
7,5 mM Imidazol  
pH 7,0 (nicht einstellen)  
a) 0,02 % (w/v) Coomassie  
b) 0,002 % (w/v) Coomassie

**Mitochondrien-Isolierungspuffer**

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

**MOPS (10x) (RNA)**

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

**Neutralisierungslösung**

2 M NaCl  
1 M Tris pH 5,5 (HCl)

**PBS (10x)**

1,4 M NaCl  
0,1 M KCl  
0,027 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,018 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

**PEG**

60% (w/v) PEG 4000  
50 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O  
10 mM Tris  
pH 7,5 (HCl)  
autoklavieren

**RNA-Agarosegel (1,5%)**

1,5g Agarose in 73ml Wasser aufkochen  
+10ml 10x MOPS  
+16,2ml Formaldehyd  
Gel gießen

**RNA-Ladepuffer**

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

**RNA-Probenmix (pro Probe)**

12,5µl Formamid  
4,2µl Formaldehyd  
1,2µl 10x MOPS

**RNase A-Lösung**

11mg RNase A in  
1ml 0,01 M NaAc (pH 5,2)  
15 min aufkochen, langsam auf RT abkühlen lassen  
+ 100µl 1 M Tris/HCl (pH 7,4)

**Sammelgel-Puffer (4x)**

0,5 M Tris  
pH 6,8 (HCl)  
0,04% SDS

**SDS-Laufpuffer (10x)**

0,25 M Tris  
1,9 M Glycin  
pH 8,3 (HCl)  
1 % SDS

**SDS-Ladepuffer (3x)**

7,5ml 20% SDS  
1,5ml β-Mercaptoethanol  
7,5ml Glycerin  
1% Bromphenolblau  
9,375ml 4x Sammelgel-Puffer  
ad 25ml mit H<sub>2</sub>O

**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

**Sensitizer (Silberfärbung)**

0,1g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>  
ad 500ml H<sub>2</sub>O

**Silberfärbelösung**

0,5g AgNO<sub>3</sub>  
ad 500ml H<sub>2</sub>O

**1,11 x Solubilisierungspuffer**

33,33 mM HEPES  
166,67 mM Kaliumacetat  
11,11 % (v/v) Glycerin  
ggf. 0,5 mM Pefabloc (Roth)  
pH 7,4 (nicht einstellen)

**SSC (20x)**

3 M NaCl  
0,3 M Na<sub>3</sub>Citrat  
pH 7,0 (HCl)

**STC**

1 M Sorbit (=Sorbitol)  
10 mM Tris  
50 mM CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O  
pH 7,5 (1 N HCl)

**1 x STE**

100 mM NaCl  
20 mM Tris  
10 mM EDTA  
pH 7,5 (HCl)  
autoklavieren

**STET**

8% (w/v) Saccharose  
5% (v/v) TritonX-100  
50 mM EDTA, pH 8  
10 mM Tris/HCl, pH 8  
pH 8,0 (HCl), autoklavieren

**Stopperlösung**

60% Saccharose  
20 mM EDTA pH 8  
0,025 % Bromphenolblau  
0,025% Xylencyanol

**TAE (50x Tris-acetat-EDTA)**

2 M Tris  
57,1ml Eisessig/l  
50 mM Na<sub>2</sub> EDTA, pH 8  
autoklavieren

**TE-Puffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
pH 8,0 (HCl)  
autoklavieren

**TENS-Puffer**

10 mM Tris  
1 mM EDTA  
100 mM NaCl  
2% (w/v) SDS  
pH 8,0 (HCl)

**TPS**

für 1 Liter:  
10ml Lösung A  
90ml Lösung B  
200g Saccharose  
pH 5,5 (Phosphorsäure)  
utoklavieren

### 3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Klenow-Enzym	MBI Fermentas
Lysozym	Merck
Phusion-Polymerase	NEB
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNase	Roche
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Invitrogen
M-MuLV-Reverse Transkriptase	NEB

### 3.4 Kits

„DIG-DNA labeling and detection kit“, Roche  
 „NucleoSpin-Extract II“, Macherey&Nagel  
 „Midi-/Maxi Plasmid Purification Kit“, Qiagen  
 „Western Blotting Luminol Reagent“, Santa Cruz Biotechnology  
 „Strep-tag Starter Kit“, IBA GmbH  
 „SAM265Methyltransferase Assay“ (modifiziert), GBiosciences

### 3.5 Größenstandards

Name	Verwendung	Hersteller
<b>GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus</b>	<b>DNA-Größenstandard</b>	<b>MBI Fermentas</b>
<b>Lambda DNA / HindIII Marker 2</b>	<b>DNA-Größenstandard</b>	<b>MBI Fermentas</b>
<b>PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0671</b>	<b>Protein- Molekulargewichtstandard für SDS-Polyacrylamidgele</b>	<b>MBI Fermentas</b>
<b>100bp Plus</b>	<b>DNA-Größenstandard</b>	<b>MBI Fermentas</b>
<b>Lambda DNA/HindIII, DIG-markiert</b>	<b>DNA-Größenstandard</b>	<b>Roche</b>

### 3.6 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Bezugsquelle
$\alpha$ - $\beta$ -Aktin	monoklonaler Primärantikörper aus Maus detektiertes Protein: 42 kDa in Cytoplasma/ Cytoskelett Verdünnung: 1:1000	Abcam
$\alpha$ -Cytochrom c	monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen detektiertes Protein: 13 kDa in Mitochondrien Verdünnung: 1:1000	R. Lill (Marburg)
$\alpha$ -GFP	monoklonaler Primärantikörper aus Maus detektiertes Protein: 24 kDa GFP-fusioniertes Protein Verdünnung: 1: 10000	Sigma
$\alpha$ - $\beta$ -ATP	Primärantikörper aus Kaninchen	
$\alpha$ -PaMTH1	monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen detektiertes Protein: 27 kDa in Cytoplasma und Mitochondrien Verdünnung: 1:1000	Sigma
$\alpha$ -mouse-Cy	polyklonaler Sekundärantikörper Verdünnung: 1:10000	Sigma
$\alpha$ -rabbit-Cy	polyklonaler Sekundärantikörper Verdünnung: 1:10000	Sigma

### 3.7 Verwendete Oligonukleotide

Mth_Ex_ <i>Pst</i> I_for:	ATC TGC AGA TGT TGG GCA GTA TTC TTC C	bindet etwa 10 Basen vor dem Startcodon des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Pst</i> I-Schnittstelle ein, es wird Richtung Stopcodon amplifiziert
Mth_Ex_ <i>Hind</i> III_re:	ACA AGC TTA GGT AGT TAC TAC CTG CCC C	bindet in 3'-Flanke des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Hind</i> III-Schnittstelle ein, es wird Richtung Startcodon amplifiziert
O-Met_ <i>Eco</i> RI_for	CCGAATTCGCCCCAGGTCCCCTTACC	bindet in 5'-Flanke des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Eco</i> RI-Schnittstelle ein, es wird Richtung Stopcodon amplifiziert
O-Met_ <i>Nco</i> I_rev	AACCATGGCCCGCTGAGCCCCGTCC	bindet hinter dem Stopcodon des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Nco</i> I-Schnittstelle ein, es wird Richtung Startcodon amplifiziert
Strep- <i>Sac</i> II-for	GACCGCGGGTTGGGCAGTATTCTTCC	bindet etwa 10 Basen vor dem Startcodon des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Sac</i> II-Schnittstelle ein, es wird Richtung Stopcodon amplifiziert
Strep- <i>Hind</i> III-rev	TCAAGCTTTCAAGCCCGCTGAGCCC	bindet hinter dem Stopcodon des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Hind</i> III-Schnittstelle ein, es wird Richtung Startcodon amplifiziert
primer 3'- <i>Pst</i> I-for	GGCTGCAGAACATCACGGTTGCTCGG	bindet in 3'-Flanke des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Pst</i> I-Schnittstelle ein
primer 3'-rev- <i>Xba</i> I	TATCTAGAGCGCCAGGTTCCGAGGCC	bindet in 5'-Flanke des <i>PaMth1</i> -Gens, fügt eine <i>Xba</i> I-Schnittstelle ein, es wird Richtung Stopcodon amplifiziert

### 3.8 Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAN7-1	enthält eine HygromycinB-Resistenzkassette zur Selektion von <i>P. anserina</i>	Punt et al., 1987
pMy60	enthält <i>S. carlsbergensis</i> rDNA-Locus	Verbeet et al., 1983
pKO7	Austauschvektor für die Gendeletion in <i>P. anserina</i> , enthält eine HygromycinB-Resistenzkassette	Gabe Dr. A. Hamann
pExMthph	Überexpressionsvektor für <i>P. anserina</i> enthält 0,5 Kbp großes Promotor-Fragment des Metallothionein-Gens <i>PaMthI</i> und eine Hygromycin B-Resistenzkassette	Gabe von Dr. A. Hamann
pPaMthIgfp1	<i>PaMthI</i> -Gfp-Fusionsplasmid: an das C-terminale Ende der Kassette aus dem 1 kbp-großen endogenen PaMthI-Promotorbereich und der genomischen Sequenz des PaMthI-Gens ist der offene Leserahmen für das eGfp-Gen fusioniert	diese Arbeit
pPaMthIEx1	<i>PaMthI</i> -Überexpressionsplasmid, enthält die genomische Sequenz des offenen Leserahmens und der 500 Bp großen Terminatorsequenz von <i>PaMthI</i>	diese Arbeit
pPaMthIKO1	Deletionsplasmid für <i>PaMthI</i> durch homologe Rekombination in <i>P. anserina</i> , enthält einen 1 kbp großen flankierenden Bereich aus der 5'-Region von <i>PaMthI</i> und einen entsprechenden Bereich aus der 3'-Region, die die HygromycinB-Resistenzkassette im Plasmid umschließen	diese Arbeit
pPaMthIRev1	<i>PaMthI</i> -Reversionsplasmid für <i>P. anserina</i> , enthält eine Kassette bestehend aus der 1 kbp großen Promotorregion, die genomische Sequenz des <i>PaMthI</i> -Gens und eine 0,5 kbp Terminatorsequenz zur Reversion von <i>PaMthI</i> -Deletionsmutanten	diese Arbeit
pASK-7Plus_ <i>PaMthI</i>	Plasmid zur heterologen Expression von PaMthI in <i>E. coli</i> XL Blue1, enthält die cDNA-Sequenz von <i>PaMthI</i> , an das C-terminalen Ende von <i>PaMthI</i> wurde der offene Leserahmen für den sogenannten „Strep-Tag“ unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetracyclin induzierbaren Promotors fusioniert, außerdem befindet sich auf dem Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette zur Selektion in <i>E. coli</i> .	diese Arbeit

### 3.9 Verwendete Stämme

#### *Podospora anserina*-Stämme

Wildstamm „s“, Isolate s <sup>+</sup> F18260, sF18261	(Esser, 1974)
Deletionsmutante KU17 <sup>-</sup>	(Prof. Dr. A. Sainsard-Chanet, Gif-sur-Yvette, Frankreich)
<i>ΔPaDnm1</i>	(Scheckhuber et al., 2007)
<i>PaMth1Gfp1</i>	diese Arbeit
<i>PaMth1Ex1</i>	diese Arbeit
<i>ΔPaMth1</i>	diese Arbeit
<i>PaMth1Rev1</i>	diese Arbeit

#### *Escherichia coli*-Stämme

XL1 Blue (Stratagene)	
XL1 Blue mit pASK-7Plus_ <i>PaMth1</i> (heterologe Expression von <i>PaMth1</i> ; diese Arbeit)	

## 4 Methoden

### 4.1 RNA-spezifische Methoden

#### 4.1.1 Isolation der Gesamt-RNA aus *P. anserina*

Je 10-20 Myzelstückchen wurden auf zwei PASM-Platten angeimpft und für drei Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Juveniles und mittelaltes Myzel wurde von den Platten in jeweils einen Kolben mit 200 ml CM überführt und für zwei bis drei Tage bei 27 °C und bei Dauerlicht geschüttelt (143 Upm). Myzel seneszenten Stämme wurde in Fernbachkolben mit 150 ml CM überführt und ohne Schütteln für drei bis vier Tage bei 27 °C inkubiert. Nach dem Abfiltrieren des Myzels durch zwei Lagen Mull erfolgte gründliches Mörsern in flüssigem Stickstoff. In einem Becherglas mit 20 ml 60 °C warmer GTC-Lösung wurde das Pulver gelöst und dann in ein SS34-Röhrchen mit 277 µl β-Mercaptoethanol gefüllt. Nach zehnminütiger Inkubation des Röhrchens bei 60 °C zur Lyse der Zellen wurde zentrifugiert (10 min, 10000 Upm, RT, SS34). Nachdem ca. 8 ml des Überstands vorsichtig auf ein 5,7 M CsCl-Kissen (3 ml) in ein TST41.14-Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert worden waren, wurde die RNA durch Ultrazentrifugation (18 h, 34000 Upm, 20 °C, TH-641) pelletiert. Nach dreimaligen Waschen des erhaltenen RNA-Sediments in 700 µl 70 % Ethanol/DMPC (10 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) wurde dieses anschließend in 500 µl DMPC-H<sub>2</sub>O bei 60 °C resuspendiert. Die gelöste RNA wurde in ein ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1/10 Vol. 3 M NaAc/DMPC (pH 5,0) und 2 Vol. absolutem Ethanol (4 °C) für 30 min bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol/DMPC (4 °C) gewaschen (10 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) und luftgetrocknet. Die RNA wurde schließlich je nach Sedimentgröße in 100-200 µl DMPC-H<sub>2</sub>O bei 65 °C für ca. 30 min gelöst.

#### 4.1.2 RNA-Gelelektrophorese

Für ein 1,35 % Agarosegel wurden nach dem Aufkochen von 1,5 g Agarose in 80 ml DMPC-H<sub>2</sub>O und Abkühlung auf ca. 60 °C 11 ml 10 x MOPS und 20 ml Formaldehyd hinzugesetzt und das Gel wurde gegossen. Je Probe wurden 10-20 µg RNA mit DMPC-H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 12 µl eingestellt. Nach der Zugabe von 29 µl RNA-Probenpuffer erfolgte die Denaturierung der RNA mittels zehnminütiger Inkubation bei 65 °C im Heizblock; dann 5 Minuten auf Eis. Die mit je 5 µl RNA-Ladepuffer versetzten Proben wurden in jeweils zwei Taschen des denaturierenden Agarosegels pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 1 x MOPS-Laufpuffer bei einer Spannung von 60 V für 2,5 Stunden. Eine Gelhälfte wurde für 15-30 min im Ethidiumbromidbad (1

µg/ml EtBr in Wasser) gefärbt und über Nacht im Wasserbad entfärbt, die andere Gelhälfte wurde auf eine Nylonmembran transferiert (s. 4. 1. 3). Das gefärbte Gel wurde auf dem Transilluminator analysiert und fotografiert.

#### **4. 1. 3 Northerntransfer**

Während des Northerntransfers wird aufgetrennte RNA aus einem denaturierenden Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran (Hybond-N [Amersham]) wurde zunächst kurz in 2 x SSC (DMPC) äquilibriert. Anschließend wurde das RNA-Gel in einer Transferapparatur (Pharmacia) platziert. Bei einem Unterdruck von 50 mbar erfolgte eine Überschichtung des Gels für drei Stunden mit 20 x SSC (DMPC). Danach wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Beide Seiten der Membran wurden mit UV bestrahlt (UV-Stratalinker „1800“ [Stratagene], Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“.) Zur Identifikation einer spezifischen mRNA wurde die erhaltene Membran mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert.

#### **4. 1. 4 Herstellung radioaktiver DNA-Sonden ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-Markierung)**

Zur Herstellung einer radioaktiv markierten Sonde wurden 10 µl der zu markierenden DNA (0,2-0,5 µg) mit 27 µl Wasser gemischt und 10 min in kochendem Wasser denaturiert. Nach 5 min Abkühlung auf Eis wurden 2 µl OPL I (Hexanukleotidgemisch [Pharmacia]), 3 µl OPL II-C (Desoxynukleotide ohne dCTP [Pharmacia]), 5 µl Klenow-Puffer (10x), 1 µl Klenow-Fragment (2 U/µl) (MBI Fermentas) und 2,5 µl  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) hinzugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation der Reaktion bei 37 °C, wurde die Reaktion mit 50 µl 1 x STE abgestoppt. Kleine DNA-Fragmente (< 20 bp) und ungebundene Desoxynukleotide mit „Probequant G-50“-Säulen (Amersham) nach der Anleitung des Herstellers chromatographisch entfernt.

#### **4. 1. 5 Hybridisierung und Detektion (radioaktiv markierte DNA-Sonde)**

Die Membran wurde mindestens vier Stunden bei 37 °C in formamidhaltiger Hybridisierungslösung (ohne Sonde) prähybridisiert. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungslösung mit 0,2-0,5 µg radioaktiv markierter DNA, die zuvor thermisch denaturiert wurde, bei 37 °C über Nacht. Zur Detektion wurde die Membran zwei Mal für 10 Minuten in 2 x SSC, 0,5 % SDS bei 37 °C und anschließend einmal in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 37 °C für jeweils 10 Minuten gewaschen. Die Exposition der Membran erfolgte für eine Stunde bis 3 Tage bei -80 °C auf einem Röntgenfilm (Amersham). Eine Verstärkerfolie (Suprema [Dr. Goos]) diente hierbei zur Erhöhung der Signalintensität. Zur Rehybridisierung der gleichen Membran wurde gebundene Sonde durch drei bis vier kurze Inkubationen in kochender 0,1 x SSC, 0,1 % SDS-Lösung abgewaschen.

## 4. 2 DNA-spezifische Methoden

### 4. 2. 1 Isolierung von genomischer DNA aus *P. anserina*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *P. anserina*. wurden pro Isolat etwa 10-20 Myzelstückchen auf eine BMM-Platte mit Cellophanfolie angeimpft und es folgte eine 2-3 tägige Inkubation bei Dauerlicht und 27°C. Dann wurde nach der von Lecellier und Silar publizierten Methode vorgegangen (Lecellier und Silar, 1994). Die Konzentration von genomischer DNA wurde densitometrisch bestimmt. Hierzu wurde 1µl der isolierten genomischen DNA und 250ng  $\lambda$ -HindIII-Marker mit bekannter Konzentration in einem 1%igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Mittels des Programms „Quantity One“ (BioRad) wurde die Konzentration durch die Intensität der Bande mit der Intensität der bekannten  $\lambda$ -HindIII-Fragmente-Konzentration verglichen.

### 4. 2. 2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNA diente die Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“ [PCR]). Der zu amplifizierende Genbereich wurde durch zwei ca. 20 Basenpaar lange Oligonukleotide festgelegt, die komplementär zum 5'-bzw. 3'-Ende des ausgewählten Fragments waren. Ein PCR-Ansatz mit der Taq-Polymerase enthielt folgende Komponenten: Matrizen-DNA (10 ng Plasmid-DNA, 20 ng Cosmid-DNA oder 100 ng genomische DNA), zwei Oligonukleotide (jeweils 0,5 µM), 1 x PCR-Puffer (Invitrogen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), dNTP-Lösung (0,2 mM) und Taq-Polymerase (0,05 U/µl, Invitrogen). Ein PCR-Ansatz mit der Phusion-Polymerase hingegen enthielt folgende Komponenten: Matrizen-DNA (10 ng Plasmid-DNA, 20 ng Cosmid-DNA oder 100 ng genomische DNA), zwei Oligonukleotide (jeweils 0,5 µM), 5 x PCR-Puffer (Finnzymes), dNTP-Lösung (10 mM) und Phusion-Polymerase (0,02 U/µl, Finnzymes).

Im ersten Schritt wurde die doppelsträngige DNA einmalig bei 95 °C denaturiert. Die darauf folgenden drei Schritte gehörten zu einem Zyklus, der etwa 35 x wiederholt wurde. Zuerst wurden die neugebildeten Fragmente bei 95 °C denaturiert, danach wurden die Oligo-nukleotide bei einer für sie spezifischen Temperatur an die Matrizenstränge angelagert, bei 72 °C erfolgte durch die Taq-bzw. die Phusion-Polymerase die Synthese der komplementären Stränge. Jeder dieser Schritte dauerte je nach Amplifikatlänge und Leistung der Polymerase einige Sekunden bis wenige Minuten. Abschließend wurde der Polymerase nochmals einige Minuten Zeit für die Nachsynthese bei 72 °C gegeben. Die Reaktion wurde beendet, indem der Ansatz auf 4 °C herabgekühlt wurde.

### **4. 2. 3 DNase I-Verdau und Aufreinigung der Gesamt-RNA von *P. anserina* für die cDNA-Synthese**

Zur cDNA-Synthese wurde im ersten Schritt, dem DNase I-Verdau, die Gesamt-RNA von verunreinigender DNA befreit. Dazu wurden zu 50 µg RNA 10 µl DNase I-Puffer (1 M NaAc + 50 mM MgSO<sub>4</sub>) und 1 µl DNase I pipettiert. Die Reaktionsgefäße wurden auf 100 µl mit DMPC-Wasser aufgefüllt und ca. 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die RNA im zweiten Schritt durch eine Phenol-Chloroform-Greinigung, indem die verdauten DNA sowie Proteine, Lipide und andere Zellreste entfernt wurden. Der RNA-Probe wurde 1 Volumen Phenol hinzugegeben und ca. 30 Sekunden gemischt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 8000 Upm, RT, F-45-18-11) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein Volumen Phenol:Chloroform:IAA (in einem Verhältnis von 25:24:1) wurde dem Überstand hinzugegeben und gemischt. Nach einer erneuten Zentrifugation (5 Minuten, 8000 Upm, RT, F-45-18-11) wurde dieser Schritt wiederholt und nach einer weiteren Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt. Anschließend wurde 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-DMPC und 2,5 Volumen kalter reinst Ethanol hinzugegeben und invertiert. Die RNA wurde für 15 Minuten bei -80 °C gefällt und daraufhin zentrifugiert (15 Minuten, 4 °C 15000 Upm, FA45-24-11). Danach erfolgte ein Waschen des RNA-Sediments mit einer Zugabe von 500 µl 4 °C kaltem 70%-iger Ethanol-DMPC hinzugegeben und einer erneuten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das verbleibende Sediment wurde in 20 µl DMPC-Wasser in einem Schüttler bei 65 °C rückgelöst. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **4. 2. 4 Transkription der Gesamt-RNA in cDNA mit M-MuLV-Reverse Transkriptase**

Die Angaben gelten für einen 10 µl Ansatz mit 4 µg RNA. Es wurden 1 µl Oligo(dT)-Oligonukleotidlösung (c = 0,5 µg/µl) zum RNA-Ansatz gegeben. Die RNA wurde dann 10 Minuten bei 70 °C denaturiert. Danach wurden 4 µl 5 x M-MuLV-RT-Puffer, 2 µl dNTP-Lösung (10 mM), 0,5 µl RNase-Inhibitor (20 U) und 1,5 µl DMPC-Wasser hinzugefügt. Zur Anlagerung der Oligonukleotide wurde der Ansatz 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl M-MuLV-Reverse Transkriptase dazu gegeben. Um die RNA in cDNA umschreiben zu können, wurde der Reaktionsansatz 1 Stunde bei 42 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der cDNA-Ansatz 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, anschließend mit PCR-Wasser auf 100 µl aufgefüllt und bei -80 °C gelagert.

### **4. 2. 5 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Zur Messung der Konzentrationen von Oligonukleotiden, RNA und Plasmiden wurde ein Photometer (Nanodrop® ND-1000 von Peqlab) verwendet. Die Konzentrationsbestimmungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Oligonukleotide wurden mit einer Wellenlänge von 260 nm

gemessen, um die Molarität zu bestimmen. Dabei wurde die Absorption gemessen und in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{Konzentration}_{\text{Oligos}} \text{ (mol/l)} = 2 \times \text{Absorption} / \text{Em}$$

$$\text{Em} = A \times 16000 + T \times 9600 + G \times 12000 + C \times 7000$$

Em = molare Extinktion ; A, T, G, C = Anzahl der jeweiligen Basen

#### **4. 2. 6 Restriktion von DNA**

Zur Restriktion wurde Plasmid-DNA oder genomische DNA mit den jeweiligen Restriktionsenzymen und den entsprechenden Puffern nach Herstellerangaben über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **4. 2. 7 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten bzw. nach Restriktionen wurde das „NucleoSpin Extract II“-Kit von Macherey-Nagel nach dem Hersteller-Protokoll verwendet. Die aufgereinigte DNA wurde in 25-50µl Elutionspuffer eluiert.

#### **4. 2. 8 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in 1%igen TAE-Agarosegelen. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x DNA-Ladepuffer versetzt. Für die Herstellung des Gels wurde 1 g/100 ml Agarose abgewogen und in der entsprechenden Menge 1 x TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlung der Lösung auf etwa 60 °C wurde das Gel gegossen, die vorbereiteten Proben in die Geltaschen pipettiert und die Auftrennung erfolgte zwischen 1-2 Stunden bei 80V. Bei jedem Lauf wurden neben den Proben DNA-Längenstandards verwendet. Das Gel wurde für etwa 15 Minuten in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) zum Anfärben der DNA-Banden gelegt und die angefärbte DNA wurde mit Hilfe eines Transilluminators visualisiert. Das Gel mit den ethidiumbromidhaltigen DNA-Banden wurde fotografiert, gespeichert und ausgewertet.

#### **4. 2. 9 Southerntransfer**

Mittels Southern-Hybridisierung wurden spezifische DNA-Sequenzen nachgewiesen. Hierbei wurden 0,2-1 µg der zu untersuchenden DNA mit Restriktionsenzymen über Nacht bei 37 °C in entsprechendem Puffer nach Angaben des Herstellers restringiert. Nach der Auftrennung der Fragmente in einem 1 %-igen TAE-Agarosegel wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und unter UV-Licht photographiert. Vor dem Transfer erfolgte eine ca. 10 minütige Inkubation in Wasser zur Entfernung Ethidiumbromidlösung . Eine Nylonmembran (Hybond-N [Amersham]) wurde

auf die entsprechende Gelgröße ausgeschnitten, kurz in 2 x SSC-Puffer inkubiert und in einer Vakuum-Transferapparatur (Pharmacia) platziert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und ein Vakuum von 50 mbar angelegt. Durch eine anschließende 30 minütige Behandlung mit HCl wurde die DNA depuriniert. Das HCl wurde entfernt und das Gel mit Denaturierungspuffer für die gleiche Zeit überschichtet. Das in dem Puffer enthaltene NaOH denaturierte die doppelsträngige DNA. Eine abschließende Überschichtung in Neutralisierungslösung für 20-30 min diente dem Absenken des pH-Werts unter 9 für die Bindung von DNA-Sonden in Hybridisierungsanalysen. Für den Transfer der DNA wurde das Gel 1,5 Stunden mit 20 x SSC bedeckt. Nach Beenden des Transfers wurde die Nylonmembran aus der Apparatur genommen, kurz in 2 x SSC-Puffer geschwenkt, auf „Whatman“-Papier getrocknet und zur Quervernetzung der DNA beide Seiten im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) behandelt (Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“).

#### **4. 2. 10 DIG-Markierung von DNA**

Um im Rahmen einer Southernblot-Analyse das gewünschte Zielgen auf der Nylonmembran zu detektieren, wurden DNA-Sonden, die eine Markierung mit Digoxigenin (DIG) tragen, hergestellt. Die Markierung erfolgte mit 100–500ng DNA für 20 Stunden mit dem „DIG-DNA Labeling Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben.

#### **4. 2. 11 Überprüfung der Markierung („spot-blot“)**

Um die Konzentration der markierten DNA abschätzen zu können, wurden 1ng, 100pg, 10pg, 1pg und 0,1pg DIG-markierte Kontroll-DNA (Roche) auf eine Nylonmembran pipettiert. Zum Vergleich wurde 1µl der markierten DNA aufgetragen. Nach der beidseitigen Behandlung der Nylonmembran im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) mit 1200µJoules x 100 (Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“) erfolgte die Detektion wie bei einem Southern Blot (s. 4. 2. 12). Statt CSPD wurde NBT/X-Phosphat als Farbsubstrat aufgebracht und 2-4 Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Farbentwicklung der Kontroll-DNA wurde mit der markierten DNA verglichen und diente als Maß für die Markierungseffizienz.

#### **4. 2. 12 Hybridisierung und Detektion**

Die Hybridisierung der Membran mit einer DIG-markierten Sonde erfolgte in einer Hybridisierungsröhre. Unspezifische Bindestellen wurden durch eine dreistündige Prähybridisierung bei 55°C mit „high-SDS“-Lösung mit 1/100 Volumen zuvor denaturierter Heringssperma-DNA (HS-DNA) besetzt. Unter den gleichen Bedingungen erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit 25ng denaturierter Sonde/ml „high-SDS“-Lösung und 1/100 Volumen HS-DNA. Nach der Hybridisierung wurden zwei Waschschrte in 2 x SSC, 0,5 % SDS bei RT für jeweils fünf Minuten durchgeführt. Für die Stringenzwaschungen wurde die Membran zwei Mal in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 65 °C für

jeweils 15 Minuten inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Inkubation in DIG-Puffer 2 verlief mindestens eine Stunde. Anschließend wurde die Membran 30 Minuten in 10 ml DIG-Puffer 2 mit Anti-DIG-AP-Konjugaten (1:10000) inkubiert. Es folgten zwei Waschungen in DIG-Waschpuffer für jeweils 15 Minuten. Die Membran wurde zwei Mal für jeweils 5 Minuten in DIG-Puffer 3 äquilibriert und mit 500 µl Substratlösung (1:100 CSPD in DIG-Puffer 3) für 5 Minuten bedeckt. Nach gründlicher Entfernung der Substratlösung wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Bevor der Film für die Entwicklung aufgelegt wurde, wurde die eingeschweißte Membran für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert (Aktivierung der alkalischen Phosphatase). Für 3-5 Stunden wurde ein Röntgenfilm (Amersham) auf die Membran gelegt. Der exponierte Röntgenfilm wurde mit Hilfe eines Filmentwicklungsautomaten (Protec 45 compact) entwickelt und ausgewertet. Um die DIG-markierte DNA-Sonde zu entfernen wurde die Membran kurz in Wasser gelegt und anschließend zweimal für jeweils 20 Minuten in 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Waschung der Membran in 2 x SSC (2 x 45 min).

#### **4. 2. 13 Ligation von DNA**

Bei der Ligation erfolgt die Zusammenfügung von Vektor und Insertionsfragment mit kompatiblen Enden. Zuvor wurden die Konzentrationen des Vektors und des Insertionsfragment gemessen, da diese bei der Ligation in einem molaren Verhältnis von 1:6 - 1:8 vorliegen sollen.

#### **4. 2. 14 DNA-Sequenzierung**

Die Sequenzierung wurde von der Firma „Scientific Research & Development GmbH“ nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt. Eingesetzt wurden pro Sequenzreaktion 300ng Plasmid-DNA, und 5pmol Oligonukleotid in einem Gesamtansatz von 7µl.

#### **4. 2. 15 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Es wurde eine Einzelkolonie von einer über Nacht ausgestrichenen *E. coli*-Platte entnommen und in 5ml LBT (LB mit 12,5 µg/ml Tetrazyklin) über Nacht bei 37°C im Brutschrank unter Schütteln (180Upm) inkubiert. Die 5ml-Übernachtskultur wurde zu 250ml LBT (LB mit 12,5 µg/ml Tetrazyklin) gegeben und schüttelnd (180Upm) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bis 0,7 bei 550 nm inkubiert. In dieser exponentiellen Wachstumsphase wurden die Bakterien bei 4°C 10 min 3500 Upm (GSA-Rotor) abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in einem Volumen kaltem 50 mM CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde nochmals 10 Minuten bei 3500 Upm (GSA-Rotor), 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1/10 Volumen 50 mM CaCl<sub>2</sub> vorsichtig resuspendiert und 24 Stunden auf Eis gelagert. Nach der Zugabe von 86%igen Glycerin (Endkonzentration 15% Glycerin) wurden Aliquots von 300-350µl hergestellt, welche in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Aliquots wurden bei -80°C eingelagert. Um die Lebendzellzahl zu prüfen wurden auf LBT-Platten je 100µl einer 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-6</sup> Verdünnung ausplattiert und über

Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lebendzellzahl sollte mindestens 10<sup>7</sup> Zellen/ml Zellsuspension ergeben. Um die hergestellten kompetenten Zellen auf Verunreinigungen mit Plasmiden zu überprüfen, wurden 100-200µl Zellen auf LBA-Platten ausplattiert.

#### **4. 2. 16 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen**

Die mit TE auf 50 µl aufgefüllte, zu transformierende DNA wurde zu 300µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen pipettiert, dann erfolgte eine 40 minütige Inkubation auf Eis. Nach einem dreiminütigen Hitzeschock bei 42°C wurde 1ml LB hinzugefügt und der Transformationsansatz wurde eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### **4. 2. 17 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Isolierung von größeren Mengen Plasmid-DNA mit einer hohen Reinheit und Konzentration wurde das „Plasmid Purification Kit“ von Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur schnellen Kontrolle von geeigneten *E. coli*-Klonen wurde die STET-Methode durchgeführt. Dazu wurden 5ml LBA-Flüssigmedium (50 µg/ml Ampicillin) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 Upm) inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden bei RT 10 Minuten bei 2200 g abzentrifugiert. Das Bakterien-Sediment wurde in 150µl STET aufgenommen und durch Zugabe von 12µl Lysozym (10 mg/ml) erfolgte die Lyse der Zellen. Das Enzym wurde 90 Sekunden bei 90°C inaktiviert. Danach wurde 10 min und bei 20000 g ,RT zentrifugiert und das entstandene Sediment wurde entfernt. Dem Überstand wurden 150µl Isopropanol zur Fällung der DNA hinzugefügt und 5 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach dem Fällung der DNA erfolgt eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 20000 g. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentierte Plasmid-DNA wurde in 200µl 70%igen Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum getrocknet und in 50µl Wasser (mit 0,2 mg/ml RNaseA) resuspendiert.

### **4. 3 Protein-spezifische Methoden**

#### **4. 3. 1 Isolation von Gesamtprotein aus *P. anserina***

Zur Isolierung von Gesamtproteinen wurden pro Probe je zwei BMM-Platten mit Cellophanfolie mit Myzelstückchen bei Dauerlicht und 27°C im Brutschrank inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurde das Myzel von den Platten in 200ml-Kolben mit flüssigem CM-Medium überführt. Das Myzel wurde nach zweitägiger Inkubation bei 27°C unter Schütteln und Dauerlicht über zwei Lagen Mull filtriert und es wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert. Das Myzelpulver wurde in ein SS34-

Zentrifugenröhrchen überführt und nach anschließender Zugabe des Extraktionspuffers (1 ml/g Myzel) und gründlichem fünfmaligem Vortexen mit je 30 Sekunden Pause auf Eis folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 5000 g, 4°C. Der Überstand mit dem Gesamtprotein wurde aliquotiert und die Proteinkonzentration (4. 3. 3) bestimmt.

#### **4. 3. 2 Isolation von Mitochondrien aus *P. anserina***

Für die Isolation wurden Myzelstückchen des entsprechenden Stammes auf 8-10 PASM-Platten mit Cellophanfolie 2 Tage bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Pro Platte wurde das Myzel von der Cellophanfolie in 200ml flüssiges CM-Medium in einen Weithalskolben überführt und für weitere 2 Tage bei 27°C und Dauerlicht im Schüttler inkubiert. Bei seneszenten Stämmen wurde das Myzel in einen Fernbachkolben mit 150ml flüssigem CM-Medium überführt und ohne Schütteln bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach Abfiltrieren des Myzels über zwei Lagen Mull wurde das Myzel im „Bead-Beater“<sup>TM</sup> mit Mitochondrien-Isolation-Puffer mit BSA homogenisiert. Hierzu wurde der Behälter zu einem Drittel mit sterilen Glasperlen, Myzel und Mitochondrien-Isolierungspuffer mit 0,2% BSA aufgefüllt. Um kleine Luftblasen auf der Oberfläche zu entfernen, wurden 3-4 Tropfen Antifoam-Verdünnung (1:5 Verdünnung) zugegeben. Es dürfen sich keine Luftblasen im geschlossenen Behälter befinden. Nach zwei 15- bis 20-sekundenlangen Homogenisationsschritten, mit je einer Minute Pause, wurde das Myzel durch die Glasperlen zerschlagen. Nach der Filtration des Homogenisates durch ein Nesseltuch wurde dies auf 2 GSA-Becher verteilt. Die groben Zelltrümmer wurden anschließend durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 2000 Upm, 4 °C (GSA SLA-1500) sedimentiert. Der Überstand wurde über Glaswolle filtriert und in 6 SS34-Zentrifugenröhrchen verteilt und zentrifugiert (11500 Upm, 30 min, 4°C, SS34-Rotor). Vom Überstand, die postmitochondriale Fraktion wurden 2-3 Aliquots bei -80°C eingefroren. Im Pellet befanden sich die Mitochondrien und Vakuolen, die in 1ml Mitochondrien-Isolationsspuffer ohne BSA ohne Luftblasen resuspendiert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt wurden. In der Zwischenzeit wurde der Saccharose-Gradient vorbereitet. Hierzu wurden vorsichtig 4ml einer 50%igen, 4ml einer 36%igen und 2ml einer 20%igen Saccharoselösung in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert, um ein Vermischen der einzelnen Saccharoseschichten zu vermeiden. Das in 1ml Mitochondrienpuffer (ohne BSA) resuspendierte Pellet wurde auf den Gradienten gegeben. Durch einen Ultrazentrifugationsschritt (60 min, 25000 Upm, 4°C, TH 641) wurden intakte Mitochondrien von Vakuolen und zerstörten Mitochondrien getrennt und die Mitochondrien-Bande wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette abgenommen und in ein SS34-Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde zu zwei Dritteln mit Mitochondrien-Isolierungspuffer ohne BSA aufgefüllt und bei 13000 Upm (SS34-Rotor), 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden in max. 300µl Mitochondrien-Isolierungspuffer (ohne BSA) rückgelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 4. 3. 3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Messung der Konzentration von Proteinen basierte auf der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) mit Hilfe des Roti-Nanoquant-Reagenz. Als erstes wird eine Eichgerade mit verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (1 µg/µl) erstellt (0µg; 5 µg; 10µg ; 20 µg). Nach dem Mischen wurden in einem Photometer die Absorptionen bei 450 nm und 590 nm gemessen. Die lineare Regression durch den Quotienten beider Messwerte ergibt die Eichgerade. Zur Messung der Proben wurden zu je 2 µl Probe 198 µl Wasser und 800µl fünffach verdünnte Roti-Nanoquant-Lösung gegeben. Anhand der ermittelten Quotienten und dem Vergleich mit der zuvor erstellten Eichgerade wurden die Proteinkonzentrationen bestimmt.

### 4. 3. 4 Untersuchung der submitochondrialen Lokalisation von Proteinen mittels Digitonin-Solubilisierung („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) angewandt. Je 100 µg frisch isolierte Mitochondrien wurden mit ansteigenden Mengen des Detergenz Digitonin inkubiert. Dabei werden die Membranen der Mitochondrien beginnend mit der äußeren Membran solubilisiert. Anschließend wurden die Proben durch Zentrifugation in Überstand und Sediment getrennt. Die herausgelösten Proteine sind nach einer Zentrifugation im Überstand nachweisbar, die nicht-solubilisierten Proteine befinden sich im Sediment. Dieser Übergang vom Sediment in den Überstand erfolgt in der Reihenfolge äußere Membran → Intermembranraum → innere Membran → Matrix. Mit Hilfe eines Vergleichs der Westernblot-Analyse des interessanten Proteins mit den Ergebnissen einer Westernblot-Analyse mit Antikörpern gegen Markerproteine der mitochondrialen Subkompartimente, z. B. das Cytochrom c für den Intermembranraum, kann die Lokalisation eines interessanten Proteins im Mitochondrium bestimmt werden. Für die Solubilisierung mit Digitonin wurden pro Ansatz je 100 µg frisch isolierte Mitochondrien durch Zentrifugieren (10 Minuten bei 16300 x g ; 4 °C) sedimentiert und in 100 µl SEMK-Puffer resuspendiert. Der Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Mitochondrien in 50 µl SEMK+P-Puffer resuspendiert. In separaten Reaktionsgefäßen wurden je 50 µl Digitonin-Verdünnungen in SEMK+P-Puffer hergestellt, die jeweils die doppelte Konzentration der Endkonzentration für die Solubilisierung besaßen. Diese 50 µl- Digitoninlösungen wurden jeweils zu den Mitochondrien gegeben, gemischt und exakt eine Minute auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden sieben Volumen SEMK+P-Puffer zugegeben. Die Trennung in Überstand und Sediment erfolgte durch eine zwanzigminütige Zentrifugation bei 25000 x g, 4°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 Minuten 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 und Western Blot Analysen weiter untersucht.

#### **4. 3. 5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 12%ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle gegossen. Dazu wurden die Glasplatten im Gießstand zusammengebaut und die Trenngelmischung, nach Zugabe von APS und Temed eingefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol gewaschen und die Sammelgelmischung, die vorher mit APS und Temed versetzt worden war einpipettiert und der Kamm eingesetzt. Nach der Vorbereitung des vollständig auspolymerisierten Gels lief die Gelelektrophorese in dem Elektrophorese-System „Mini-Protean II“ (BioRad). Es wurden je 10-60 µg der aufzutrennenden Proben mit Wasser auf 18 µl aufgefüllt und mit 6µl 3x SDS-Probenpuffer versetzt. Nach einem einminütigen Aufkochen bei 100 °C wurden den Proben je 2 µl 2%iges Bromphenolblau zugesetzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Neben den Proben wurden 2-5µl des Proteinmarkers #SM0671 (MBI Fermentas) mit auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1x SDS-Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde für 60-80 min bei 100V durchgeführt bis die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Gels austrat. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entweder für einen Westerntransfer verwendet oder mit Coomassie gefärbt. Nach einer 30-minütigen Inkubation in Coomassie-Färbelösung wurde das Gel über Nacht in Wasser oder Coomassie-Entfärbelösung entfärbt.

#### **4. 3. 6 Silberfärbung von Proteingelen**

Die Silberfärbung wurde für 2D-SDS-Polyacrylamidgele angewendet, da diese Färbung besser in der Lage ist, auch sehr kleine Proteinmengen zu detektieren. Coomassie kann Proteinmengen bis zu einer unteren Grenze von etwa 40 ng detektieren, Silber sogar nur etwa 1-2 ng. Bei der Färbung wurde das Gel im ersten Fixierschritt 30 Minuten in der Fixierlösung 1 inkubiert und dann 20 Minuten in Fixierlösung 2, um die Proteine zu denaturieren und auszufällen. Nach diesem Schritt wurde das Gel eine Minute in Sensitizer inkubiert, um den Hintergrund bei der Färbung gering zu halten. Dann wurde es 20 Minuten in der Silberfärbelösung inkubiert und nach dem Färben wurde für eine Minute in Wasser gewaschen. Die Entwicklung erfolgte für einige Minuten, bis die Banden gut sichtbar waren. Durch eine zehnmünütige Inkubation in 10 %iger Essigsäure wurde die Färbereaktion abgestoppt.

#### **4. 3. 7 Solubilisierung von mitochondrialen Membranproteinen für die BN-PAGE**

Für die BN-PAGE wurden 100-150 µg mitochondriale Proteine mit Digitonin solubilisiert. Die Proben wurden nach dem Auftauen auf Eis sorgfältig in 1ml 1,11 x Solubilisierungspuffer resuspendiert. Es wurde acht Minuten bei 14000 Upm bei 4 °C zentrifugiert (Eppendorf 5417 R), der Überstand abgegossen und noch einmal mit einem Milliliter 1,11 x Solubilisierungspuffer und anschließendem Zentrifugieren unter gleichen Bedingungen gewaschen. Der Überstand wurde so gut wie möglich entfernt und das Sediment resuspendiert. Das Resuspensionsvolumen richtete sich nach der Digitonin-Menge im Ansatz. Die Digitonin-Endkonzentration sollte geringfügig über 1 % für eine vollständige

Solubilisierung liegen. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und die solubilisierten Membranproteine befanden sich nach der Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, 10 min, 4 °C) im Überstand, der in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser wurde mit 1 x BN-Ladepuffer versetzt und auf ein blau-natives Gel aufgetragen.

#### 4. 3. 8 Blau-Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Pro Gel wurden zwei Trenngele und ein Sammelgel angesetzt (s. Tab. 1). Es wurden für diese Analyse große 10 x 16 cm-Gele gegossen. Dabei waren die Trenngele 4 bzw. 13 %ig und das Sammelgel 3,5%ig. Für die Mischungen wurden entgaste und stabilisierte Polyacrylamid-Lösungen (Roth) benutzt: 30 % Acrylamid, 4 % Acrylamid/ Bisacrylamid (29:1) und 2 % Bisacrylamid. Das Ansetzen und Gießen der Gele wurde bei 4 °C durchgeführt. Vor dem Gießen erfolgte die Fixierung der Kanüle mit einem kleinen Stück Klebeband. Nach der Zugabe von TEMED und APS wurde die Pumpe angeschaltet und das Gradientenmischerventil zwischen den beiden Kammern des Mischers geöffnet. Bevor das Gel gegossen werden konnte, musste der Schlauch zwischen Kanüle und Pumpe mit Wasser gefüllt sein. Dann wurden die Mischungen für jeweils ein niedrigprozentiges und ein hochprozentiges Trenngel bei 4 °C in die Kammern der Mischapparatur gefüllt und durch Öffnen des Hahnes und Anstellen der Pumpe zwischen die Glasplatten gepumpt. Durch Absinken der dichteren Acrylamidlösung und der resultierenden Unterschichtung der leichteren niederprozentigen Lösung bildet sich ein Gradient innerhalb des Trenngeles aus, und die größeren Proteinkomplexe sind somit besser in der Lage, in das Trenngel einzulaufen. Nachdem das Trenngel gegossen wurde, fand die Polymerisation bei Raumtemperatur statt. Die Sammelgelmischung wurde bei Raumtemperatur ebenfalls mit den stabilisierten Acrylamidlösungen angesetzt, nach der Zugabe von TEMED und APS zwischen die Glasplatten auf das Trenngel pipettiert und der Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgel wurde der Kamm gezogen und die Taschen mit 1 x BNP-Puffer gründlich gespült.

	BNP-Trenngel- mischung 1	BNP-Trenngel- mischung 2	Sammelgel
Acrylamidkonzentration	4 %	13 %	3,5 %
Glycerin	_____	2,41 ml	_____
30 %ige Acrylamidlösung	1,92 ml	713,6 µl	1697,5 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	_____	4,28 ml	_____
2 % Bisacrylamid	889 µl	_____	787,5 µl
3 x BNP-Puffer	4,95 ml	4,94 ml	5 ml
Wasser	7 ml	2,24 ml	7,385 ml
10 % APS	68 µl	41µl	119 µl
TEMED	6,8 µl	4,1µl	11,9 µl

**Tab. 1: Mischungen der Gradiententrenngele und des Sammelgels für die BN-PAGE.**

Vor dem Lauf des Gels wurde der Kathodentank mit 1D-Kathodenpuffer befüllt und der Anodentank mit 1D-Anodenpuffer. Der Gellauf wurde bei einer Spannung von 100 V und einer auf 10 mA limitierten Stromstärke gestartet und lief eine Stunde, bis die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren. Anschließend wurde die Spannung auf 500 V erhöht und die Stromstärke auf 15 mA limitiert, ab diesem Zeitpunkt lief das Gel noch etwa 3 Stunden. Nach einer Stunde nach dem Umstellen auf die höhere Spannung wurde von dem höher konzentrierten Kathodenpuffer (0,02 % Coomassie) auf den niedrig konzentrierten Kathodenpuffer (0,002 % Coomassie) gewechselt, damit sich die Banden während der Elektrophorese besser erkennen lassen. Das fertige Gel mit den aufgetrennten Proteinen wurde mit Coomassie gefärbt.

#### **4. 3. 9 Isoelektrische Fokussierung (IEF)**

##### *Probenvorbereitung*

##### 1. Aufschluss der Mitochondrien

Je Probe wurden 100 µg Mitochondrien durch Frier/Tau-Zyklen in Stickstoff aufgeschlossen und anschließend mit 1 µl Triton X-100 solubilisiert. Die Solubilisierung erfolgte eine halbe Stunde auf Eis. Danach wurde eine Dialyse der Proben durchgeführt, da die Salzkonzentration ansonsten zu hoch ist (> 10 mM). Dadurch können sehr hohe Stromstärken im IEF-Streifen entstehen, die diesen zerstören würden.

##### 2. Dialyse

Zur Dialyse wurde die Probe in einen etwa 6 cm langen Dialyseschlauch pipettiert, der mit Klammern verschlossen war. Nach etwa sechsständigem Rühren des Schlauchs in einem Becherglas mit 2,5 mM NaCl-Lösung (2 l) als Dialysepuffer wurde der Puffer erneuert und es erfolgte noch einmal über Nacht eine Dialyse. Anschließend findet eine Fällung der Proteine statt.

##### 3. Fällung der Proteine mit Aceton

Zur Fällung der Proteine wurde die Probe aus dem Dialyseschlauch in ein Mikroreaktionsgefäß pipettiert und die gleiche Menge eiskaltes 100 %iges Aceton zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei -20 °C erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 11600 g und 4 °C. Das Sediment konnte zur isoelektrischen Fokussierung eingesetzt werden.

##### *Isoelektrische Fokussierung und 2D-Gelelektrophorese*

Das mit Hilfe der Acetonfällung erhaltene Sediment wurde in 155 µl Proben-Rehydratationspuffer (48 % [w/w] Harnstoff, 2 % [w/w] CHAPS, 0,5 % [v/v] Ampholytlösung pH 3-10, 0,002 % [w/v] Bromphenolblau) resuspendiert. Durch Zugabe von DTT (20 mM Endkonzentration) wurden die Proteine in einem reduzierten Zustand gehalten, um Aggregatbildungen zu vermeiden. Der IEF-Streifen (ZOOM-STRIP pH 3-10 NL [Invitrogen]) wurde über Nacht in dieser Lösung rehydratisiert. Er konnte dann für die isoelektrische Fokussierung verwendet werden. Dazu wurde nach Anleitung des Herstellers die Kammer (ZOOM-IPGRunner [Invitrogen]) zusammengebaut und etwa 800 ml

Milipore-Wasser eingefüllt. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte danach für vier Stunden bei einer Spannung von 500 V. Nach der IEF wurden die IEF-Streifen nach Anleitung erst für 15 Minuten in fünf Milliliter 1 x NuPAGE-LDS-Probenpuffer mit zugesetztem „ReducingAgent“ inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Probenpuffer mit Acrylamid (10 mM Endkonzentration). Diese vorbehandelten Streifen wurden für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurde der IEF-Streifen auf ein fertiges Gel (NuPAGE 4-12 % BIS-TRIS ZOOMGel [Invitrogen]) gesetzt. Die Elektrophorese lief eine Stunde bei 100 V in 1 x MES-Puffer in der „ZOOM IPGRunner™ Mini-cell“. Anschließend wurde das Gel entweder einer Silberfärbung (Kap. 4. 4. 8) unterzogen oder mit Coomassie gefärbt.

#### **4. 3. 10 2D-Gelelektrophorese mit radioaktiv markierten mitochondrialen Proben**

Für die Proteomanalyse wurde relativ viel mitochondriales Protein pro Probe benötigt (5 mg bzw. 1 mg). Diese wurden von der Firma „ProteoSys“ jeweils für die Herstellung so genannter „präparativer Gele“ eingesetzt (Hunzinger et al., 2006; Groebe et al., 2007). Es wurden entweder Proteine eines jungen Wildstammes mit den Proteinen eines „Protein-Pools“ aus seneszenten Wildstämmen oder Proteine eines alten Wildstammes mit einem „Protein-Pool“ mit Proben aus juvenilen Wildstämmen aufgetrennt und verglichen. Die „Protein-Pools“ wurden erstellt, um stammspezifische Unterschiede zwischen den je vier verwendeten Proben zu minimieren. Nach der von „ProteoSys“ patentierten Methode wurden 2D-Gele angefertigt und verglichen. Dazu wurden etwa 200 µg Protein pro Probe auf mit je einem radioaktiven Iod-Isotop ( $I^{125}$  oder  $I_{131}$ ) derivatisiert und nach dem Mischen der beiden markierten Ansätze wurden die Proben zusammen mittels IEF und 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach der Detektion der Isotopen-spezifischen, radioaktiven Signale wurden diese in zwei Arten von Farbsignalen ( $I^{125}$ =blau und  $I^{131}$ =orange) umgewandelt. Die Farbintensität in dem erhaltenen Bild entspricht nach der Detektion der Intensität der jeweiligen radioaktiven Signale. Durch die Auswertung mit einem Quantifizierungsprogramm wurden differentiell gebildete Proteine gezeigt. Jeder „spot“ wurde noch einmal manuell überprüft und nur signifikante Unterschiede wurden berücksichtigt. Zur optischen Kontrolle wurden von jeder Probe silbergefärbte Gele angefertigt, in denen nur wenig Material (10 µg) verwendet wurde.

#### **4. 3. 11 Generierung eines polyklonalen Peptid-Antikörpers gegen PaMTH1**

Zur weitergehenden Untersuchung des PaMTH1-Proteingehalts oder der subzellulären Lokalisation wurde ein polyklonaler Peptidantikörper gegen diese Methyltransferase generiert. Diese Arbeiten wurden von der Firma Sigma GmbH (St. Louis, USA) durchgeführt. Zur Herstellung des Antikörpers wurden zwei weiße Neuseeländer Kaninchen mit dem an das Trägerprotein KLH („keyhole limpet hemocyanin“: Hämocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke *Megathura crenulata*) gekoppelte Peptid PFNEETADRVSAYC immunisiert, nachdem dieses mit Freundschem Adjuvans emulgiert worden

war (komplett für die erste Injektion, inkomplett für alle weiteren). Jeweils vor der ersten Injektion wurden die beiden Präimmunseren entnommen. Die zweite Injektion erfolgte nach drei Wochen, eine dritte sechs Wochen nach der ersten Injektion. Zehn Tage danach wurde Serum gewonnen (Blutabnahme < 10 ml/ kg Körpergewicht) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Seren wurden bei -20°C aufbewahrt. Nach der dritten Injektion und der anschließenden Serumentnahme wurden alle erhaltenen Seren im Rahmen einer Westernblot-Analyse getestet und die Signale in den Seren mit denen des Präimmunserums verglichen. Nach dieser Westernblot-Analyse wurden die beiden zuletzt entnommenen Seren zusammen über eine Säule affinitätsgereinigt. Der aufgereinigte Antikörper zeigt 1000 fach verdünnt eine Bande bei 27 kDa.

#### **4. 3. 12 Western-Transfer**

Zur Immunodetektion bestimmter Proteine wurden die in den SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proben auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierfür wurde die Western-Blot-Apparatur „Mini-Protean II“ verwendet. Eine zurechtgeschnittene PVDF-Membran wurde 30 Sekunden in 100 % Methanol equilibriert, bevor sie 2 Minuten in Wasser und 5 Minuten in Blotting-Puffer inkubiert wurde. Auch das Polyacrylamidgel, zwei zurechtgeschnittene Whatman-Papiere, zwei Schwämme wurden kurz in Blotting-Puffer äquiliert. Dann wurden nacheinander ein Schwamm, ein Whatman-Papier, das Polyacrylamidgel, die PVDF-Membran, ein Whatman-Papier und ein Schwamm in eine Kassette in gekühlten Blotting-Puffer in die Transferapparatur eingesetzt. Nach Platzierung des Kühl-Eisblock und des Rührfisches in der Apparatur wurden die Proteine im Kühlraum bei 4°C, 100V eine Stunde transferiert. Anschließend folgte eine einminütige Inkubation der PVDF-Membran in 100%igen Methanol, bevor sie auf Whatman-Papier getrocknet wurde.

#### **4. 3. 13 Immunodetektion von Proteinen**

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurde die getrocknete PVDF-Membran vor der Inkubation des monoklonalen Primärantikörpers eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer (Licor), zur Minimierung von unspezifischem Binden des Primärantikörpers, inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 10ml Blockingpuffer (0, 1 % SDS; 0,1 % Tween20) angesetzt und eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde danach mit 1x PBS, 0,1% Tween20 3x 10 min gewaschen, bevor die einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Cy-Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper (Blockierungspuffer; 0,1 % Tween20) erfolgte. Nach dreimaligen 5-minütigen Abwaschen des überschüssigen Sekundärantikörpers in PBS, 0,1% Tween20 wurde die Membran mit Hilfe des Odyssey-Fluoreszenzscanners (Licor) bei der entsprechenden Wellenlänge zur Detektion des gebundenen fluoreszierenden Antikörpers eingescannt und es folgte die Auswertung der Bilder. Zum Entfernen des Antikörpers von der Membran wurde diese 2x 5-10 min in „Stripping“-Puffer inkubiert und 2x 10 min in 1x PBS gewaschen. Darauf folgte eine 5-minütige

Inkubation in PBS, 0,1% Tween20 und eine Äquilibrierung von 1 min in 100% Methanol. Danach konnte wie gewohnt eine erneute Immunodetektion durchgeführt werden.

#### **4. 3. 14 Heterologe Expression und Aufreinigung des PaMTH1- Fusionsproteins**

##### **A) Kontruktion des Expressionsvektors pASK-7 PLUS\_*PaMth1***

Mit Hilfe der *PaMth1*-spezifischen Oligonukleotide Strep-*SacII*-for und Strep-*HindIII*-rev wurde die cDNA-Sequenz des offenen Leserahmens von *PaMth1* mit *P. anserina*-cDNA als Matritze in einer PCR mit der Phusion-Polymerase amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde mit *SacII* und *HindIII* an den durch die PCR eingeführten Restriktionsstellen geschnitten und aufgereinigt. Nach der Ligation mit dem ebenso geschnittenen Vektor pASK-IBA7 wurde das Ligationsprodukt in kompetente *E. coli* XL1-Blue-Zellen transformiert und der Transformationsansatz auf LB-Medium mit Ampicillin ausplattiert. Nach einer Inkubation Nacht wurden einige Klone für eine „Mini“-Präparation des Expressionsplasmids über Nacht in 5 ml LBA angezogen. Die isolierten Plasmide wurden mit Hilfe von Restriktionen überprüft und ein Bakterienklon, der das gewünschte Plasmid enthielt wurde als Grundlage für die Anzucht für eine „Midi“-Präparation des Plasmids verwendet. Die richtige Basenabfolge in dem Plasmid pASK-7 PLUS\_*PaMth1* mit Hilfe von Testrestriktionen und Sequenzierungen verifiziert.

##### **B) Anzucht, Expression und Aufreinigung**

Zur heterologen Expression des „strep-tag“-PaMTH1-Fusionsproteins wurde nach den Herstellerangaben für das „Strep-tag Starter Kit“ der Firma „IBA“ verfahren. Dazu wurde ein Kolben mit 150 ml LBA-Flüssigmedium mit einer frisch über Nacht bei 37 °C angezogenen Einzelkolonie des transgenen Bakterienstammes angeimpft und wiederum für etwa drei Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Bei einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei einer Wellenlänge von 550 nm wurde die Transkription des Strep-*PaMth1*-Fusionsgenes mit Anhydrotetrazyklin für drei Stunden induziert. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall wurde der Zellextrakt zur Aufreinigung auf eine Strep-Tactin-Säule gegeben. Durch die Bindung des „strep-tag“-Fusionsproteins an das Säulenmaterial, wurde nach der Elution mit Elutionspuffer mit Desthiobiothin eine Gesamtmenge von etwa 200 µg des Fusionsproteins in ca. 1,0 ml Elutionsvolumen isoliert. Zur Kontrolle der Induktion der Expression des Fusionsgenes in dem Bakterienstamm wurde ein Aliquot des Gesamtzellextraktes, das vor der Induktion entnommen wurde und ein Aliquot des Gesamtzellextraktes, das danach entnommen wurde, auf einem 12 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend mittels Silberfärbung gefärbt wurde. Auf diesem Gel wurden ebenfalls 10 µl des isolierten Strep-Fusionsproteins aufgetrennt, um die Reinheit der Elutionsfraktion zu überprüfen.

### 4. 3. 15 Methyltransferase-Aktivitätstest

Die Aktivität des aufgereinigten Fusionproteins wurde in einem photometrischen Aktivitätstest für Methyltransferasen mit unterschiedlichen Substraten getestet, von denen bekannt ist, dass sie von anderen Methyltransferasen akzeptiert werden. Bei diesem Test handelt es sich um einen sogenannten gekoppelten Aktivitätstest für S-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen. Bei einer Methylierung des angebotenen Substrats kann eine Absorptionsabnahme photometrisch bei einer Wellenlänge von 265 nm gemessen werden. Für jede Reaktion wurden 67  $\mu\text{M}$  SAM, 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ , 10 nM Adeninedeaminase, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 100 nM AdoHomocysteinnucleosidase in 200 mM Tris (pH 8.0) und zwischen 40 und 60  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Substrats vorgelegt und nach einer fünfminütigen Aufnahme der „Baseline“ bei 265 nm und 27 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 4  $\mu\text{g}$  des aufgereinigten Fusionsproteins gestartet. Die Absorptionsabnahme infolge der Methylierung des Substrats durch PaMTH1 wurde anschließend für fünf Minuten in einem „Multiplate-Reader“ (Tecan) gemessen und graphisch ausgewertet.

## 4. 4 *Podospora anserina* spezifische Methoden

### 4. 4. 1 Regeneration von *P. anserina*

Zur Kreuzung von *P. anserina* wurde je ein kleines Myzelstück zweier Stämme mit unterschiedlichem Kreuzungstyp im Abstand von ca. 3-4 cm auf eine M2-Platte angeimpft und bei 27°C und Dauerlicht inkubiert. Nach ca. drei Wochen wurden die gewachsenen Perithezien (Fruchtkörper) isoliert und auf Präparierungsagar-Platten (8 % Agar in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gesammelt. Mit Hilfe von Präpariernadeln wurden die Perithezien geöffnet, einkernige Sporen isoliert und auf BMM-Platten mit 60 mM Ammoniumacetat überführt. Diese inkubierten für 2 Tage bei 27°C und Dunkelheit (Dunkelheit induziert Keimung). Die juvenilen Stämme wurden für weitergehende Analysen verwendet.

### 4. 4. 2 Protoplastierung von Myzel

Für die *P. anserina*-Transformation ist es notwendig, die Zellwand zu entfernen, damit eine Aufnahme der Fremd-DNA möglich ist. Hierfür Protoplastierung des Myzels mit Glucanex protoplastiert. Dafür wurden von dem zu transformierende Pilzstamm kleine Myzelstückchen auf Platten mit BMM-Medium angeimpft, die für 2-3 Tage bei 27°C im Dauerlicht inkubiert wurden. Das Myzel von je einer Platte wurde in 200 ml CM-Flüssigmedium überführt und für weitere 3 Tage unter den gleichen Bedingungen schüttelnd inkubiert. Nach der Filtration des Myzels über 2 Lagen Mull wurde das Feuchtgewicht bestimmt und pro Gramm Myzel wurde 5ml Glucanexsuspension (20 mg/ml)

hergestellt. Nach der Homogenisierung des Myzel-Glucanex-Gemisches im Waring Blendor für 2x 5 Sekunden auf der Stufe „low“ und für 2x 5 Sekunden auf der Stufe „high“, wurde es in einen Weithalskolben überführt und 1,5 h bei 35°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Eineinhalb Stunden nach dem Beginn der Protoplastierung wurde diese mikroskopisch kontrolliert und anschließend folgte nach der Filtration des Myzel-Gemischs über 2-Lagen Mull und einen Glaswolltrichter eine zehninütige Zentrifugation bei 4000 Upm (Varifuge 3.0, Falcongefäße). Das Protoplastenpellet wurde in 1 ml TPS resuspendiert und in ein 2ml Reaktionsgefäß gegeben, die Protoplasten-Lösung wurde erneut bei RT 10 Minuten bei 4000 Upm abzentrifugiert und das entstandene Pellet wieder in 1ml TPS resuspendiert. Diese Schritte wurden insgesamt 3x wiederholt, um die Protoplastierung vollständig zu beenden. Nach der letzten Waschung wurde das Pellet in 1ml TPS resuspendiert und eine hundertfache Verdünnung der Protoplasten hergestellt. In einer Thoma-Zählkammer wurde die Anzahl der Protoplasten bestimmt und diese wurden in Portionen von  $5-8 \times 10^7$  Protoplasten bei -80°C eingefroren. Alternativ wurden sofort  $1 \times 10^7$  Protoplasten für einen Transformationsansatz eingesetzt.

#### 4. 4. 3 Transformation von *P. anserina*

Pro Transformationsansatz wurden  $1 \times 10^7$  Protoplasten auf 200 µl mit STC-Puffer aufgefüllt und es wurden jeweils 10 µg der zu transformierenden DNA zugegeben und dieser Ansatz wurde auf Eis gehalten. Als Negativkontrolle wurde das Plasmid phph-1 und als Positivkontrolle das Plasmid pAN7-1 (Punt et al., 1987) eingesetzt und auf 40 µl mit sterilem Millipore-Wasser aufgefüllt. Der Regenerationskontrolle wurde keine DNA zugefügt, sondern nur 40µl Millipore-Wasser. Mit diesem Ansatz sollte die Regenerationsfähigkeit der Protoplasten überprüft werden.

Nach Zugabe der DNA wurden die Protoplasten 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl PEG folgte eine zwanzigminütige Inkubation auf Eis. Nun wurden die Ansätze in Polypropylen (PPN)-Röhrchen überführt und es wurden 2 ml PEG in 500µl-Schritten dazugegeben, jeweils vorsichtig gemischt 30 min auf Eis gehalten. Danach wurden die Proben für 10 Minuten bei RT stehen gelassen, bevor 4ml STC-Puffer dazugegeben und wieder gemischt wurde. Nach diesem Schritt folgte die Ausplattierung der Transformationsansätze auf das Transformationsmedium mit dem entsprechenden Selektionsmarker (entweder Hygromycin oder Phleomycin). Pro Transformationsansatz wurden jeweils 800 µl in 4 ml Überschichtungsmedium gegeben und ausplattiert. Jeweils 1 ml der Verdünnungsreihen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  in STC oder H<sub>2</sub>O) der Regenerationskontrolle wurden auf Platten ohne Antibiotikum ausplattiert.

Nach 4 Tagen Inkubationszeit bei 27 °C und Dauerlicht im Brutschrank wurde die Regenerationsrate der Protoplasten ermittelt. Die Regenerationsrate gibt an, wie viele Protoplasten über die Fähigkeit verfügen, Myzel zu bilden. Myzelien, die sich auf der Wasserkontrolle bilden, entstanden aus nicht ausreichend protoplastierten Myzelresten und werden von dem Wert, der mit den STC-verdünnten Proben ermittelt wurde, abgezogen. Die Transformationsansätze, sowie die Positiv- und Negativkontrolle wurden nach spätestens 14 Tagen ausgewertet und die Transformationseffizienz

berechnet. Die Transformationseffizienz gibt an, wie viele Transformanten pro  $\mu\text{g}$  eingesetzter DNA erzielt wurden und sollte etwa bei 1-2 Transformanten/ $\mu\text{g}$  DNA liegen.

#### **4. 4. 4 Bestimmung der Lebensspanne und Wachsrte**

Zwei Tage alte Isolate wurden auf Rennrohre mit je 50 ml PASM-Medium mit 1% Glucose gesetzt und in der Klimakammer bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Alle 2-3 Tage wurde die Wuchsfront auf dem Rennrohr markiert. Nachdem das Wachstum der Kulturen endete, wurde die Lebensspanne in Tagen, sowie die gesamte Wuchsstrecke und Wachsrte (Wuchsstrecke cm/Tag) ermittelt.

#### **4. 4. 5 Bestimmung der Wachsrte auf PASM-Medium mit verschiedenen Kupfersulphat- oder Wasserstoffperoxidkonzentrationen**

Zur Analyse der Wachsrte von *P. anserina* auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Kupfersulphat wurden pro Stamm jeweils zwanzig, zwei Tage alte Stämme auf BMM-Platten mit verschiedenen Wasserstoffperoxid- oder Kupfersulphat-Konzentrationen angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C in Dunkelheit, da  $\text{H}_2\text{O}_2$  schnell bei Lichteinwirkung zerfällt. Die Wuchsfront wurde täglich auf den Platten markiert.

#### **4. 4. 6 Konfokale Laserscannmikroskopie von *P. anserina* Stämmen (CLSM)**

Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1 % Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchtekammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien in Hyphen wurde eine 1  $\mu\text{M}$  Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach zweiminütiger Inkubationszeit wurden die Präparate mit einem CLSM-Mikroskop analysiert und ausgewertet.

#### **4. 4. 7 Bestimmung der weiblichen Fertilität von *P. anserina***

Ein Myzelstück des zu untersuchenden homokaryotischen Isolats wurde in die Mitte einer M2-Platte geimpft. Die Pilze inkubierten bei 27°C und Dauerlicht bis die Wuchsfront den Rand der Petrischale erreichte (ca. 7 Tage). Die zu untersuchenden Pilze wurden anschließend mit Wildstamm gekreuzt. Zur Gewinnung der Spermarien (männliche Gameten) wurden alle Platten mit 3 ml sterilem Wasser abgeschwemmt (je fünf Minuten Inkubationszeit). Die Spermarielösung wurde anschließend auf die Platte des anderen Kreuzungstyps gegeben (WT „s“ ↔ Transformant). Nach fünf Minuten Inkubation wurde die Spermarielösung abgenommen. Die Stämme inkubierten erneut bei 27 °C und Dauerlicht. Nach ca. 7 Tagen konnten die entstandenen Fruchtkörper (Perithezien) gezählt werden. Mit Hilfe einer Schablone (1  $\text{cm}^2$ ) wurden je 3 Bereiche des Myzels rund um die Animpfstelle ausgezählt. Die Anzahl der Perithezien von Wildstamm wurde gleich 100 % gesetzt.

#### **4. 4. 8 Bestimmung der männlichen Fertilität von *P. anserina***

Die Anzucht des homokaryotische Myzels erfolgte wie unter 4. 4. 8 beschrieben. Zur Bestimmung der männlichen Fertilität wurden Spermatiensuspensionen hergestellt. Dafür wurden die Isolate mit 2 ml A. bidest fünf Minuten inkubiert und anschließend abgeschwemmt. Die Suspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer Zentrifugation (14000 Upm, RT, F-45-18-11, 10 min) wurde die Lösung bis zu einem Volumen von 200 µl abgenommen. Die Auszählung der Spermation wurde mikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer durchgeführt.

#### **4. 4. 9 Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs in *P. anserina* Gesamt-Myzel**

Pro Probe wurden drei PASM-Platten mit Pilz-Stückchen angeimpft. Diese inkubierten für 2 Tage bei 27°C und Dauerlicht. Vor den Messungen erfolgte die Vorbereitung der „Clark-Elektrode“ (Rank Bros.): Die Anode wird gründlich gereinigt und mit 3-4 Tropfen gesättigter KCL-Lösung versehen. Anschließend wird ein Linsen-Papier drüber gelegt, sowie eine Teflonmembran und das Ganze mit einen Dichtungsring verschlossen. Die Küvette wurde fest verschraubt und mit dem Sauerstoffaufnahme-puffer (3 ml) versehen, der durch einen Rührfisch mit Sauerstoff gesättigt wurde. Die Lösung wurde auf 27 °C temperiert. Die Elektrode wurde an einen Schreiber angeschlossen und nach dem Einpendeln (Schreiberausschlag bei 80 %) konnte mit den Messungen begonnen werden. Jeweils 28 mg Myzel wurden von den Platten abgeschabt und in die Küvette der „Clark-Elektrode“ (Rank Bros.) gegeben. Nach der Aufnahme des Sauerstoffverbrauchs wird die COX-spezifische Atmung mit 1 mM KCN gehemmt. Jede Probe wurde 3x gemessen. Anhand der Steigung der Sauerstoffverbrauchs-Kurve lässt sich anschließend der Sauerstoffverbrauch / mg Myzel berechnen.

## 5 Ergebnisse

Zwei wichtige Zielsetzungen in dieser Arbeit waren die Identifizierung und die anschließende Charakterisierung von differentiell gebildeten Proteinen während des Alterns im mitochondrialen Proteom von *Podospira anserina*-Wildstämmen (Kap. 5. 1). Diese Proteine wurden während ungerichteter Proteomanalysen mit mitochondrialen Proben aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen identifiziert. In Kapitel 5. 1. 1 werden die Vorarbeiten für diese Proteomanalysen beschrieben, die im Rahmen des EU-Projektes „Role of Mitochondria in Conserved Mechanisms of Ageing“ (MiMage) durchgeführt wurden. Sie beinhaltete isoelektrische Fokussierungen (IEF) von mitochondrialen Proteinen in der ersten Dimension und denaturierende SDS-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) in der zweiten Dimension. Die differentiell gebildeten Proteine wurden mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen (z. B. „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight“ [MALDI-TOF]) identifiziert, die Auswertung der Spektren wird in Kapitel 5. 1. 2 dargestellt. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Funktion der seneszenzspezifisch gebildeten Methyltransferase PaMTH1 während des Alterns von *P. anserina* mittels biochemischer, molekularbiologischer und physiologischer Methoden analysiert. Diese Charakterisierungen beinhalteten unter anderem die Untersuchung der Substratspezifität (Kapitel. 5. 2. 3) und die Modulation der Expression in dem filamentösen Ascomyceten *P. anserina* (Kapitel 5. 2. 4- 5. 2. 6).

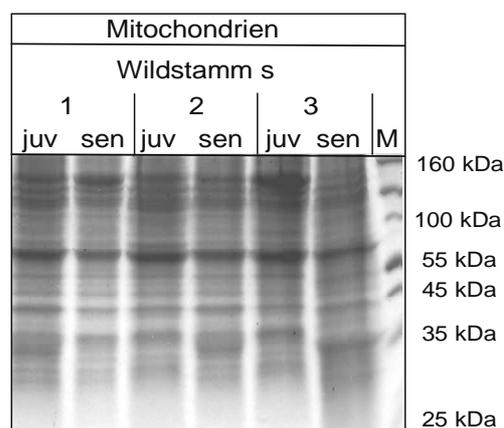
### 5. 1 Identifizierung von differentiell gebildeten Proteinen während des Alterns im mitochondrialen Proteom von *Podospira anserina*-Wildstämmen

Das Proteom stellt das „Resultat von Genexpression, ribosomaler Synthese und Protein-Degradation in einem bestimmten Zell-, Gewebetyp bzw. Organismus zum Zeitpunkt der Proteinisolation“ (LoPachin et al., 2003) dar. Die Zusammensetzung des Proteoms wird durch endogene und exogene Faktoren bestimmt. Zu den exogenen Faktoren zählen z. B. unterschiedliche Wachstumsbedingungen, wie Licht, Temperatur oder diverse Mutationsauslösende Bedingungen, wie das Vorhandensein toxischer Stoffe. Endogene Faktoren umfassen beispielsweise die mitochondriale Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Considine et al., 2003) oder das Alter des Organismus´ (Unterluggauer et al., 2008; Chakravarti et al.,

2009). Bei *Podospira anserina* ist es u. a. aufgrund von Änderungen der Expression diverser bekannter Gene, wie z. B. von *PaCtr3*, das Gen des hochaffinen Kupfertransporters PaCTR3 in *P. anserina* (Borghouts et al., 2002) und zahlreicher unbekannter Gene während des Alterns zu erwarten, dass das Proteom der Mitochondrien im alten Wildstamm s eine andere Zusammensetzung aufweist als im jungen Wildstamm s. Jedoch wurden die altersbedingten Unterschiede im mitochondrialen Proteom in *P. anserina* bisher nicht analysiert. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit differentiell-gebildete Proteine während des Alterns von *P. anserina* identifiziert und analysiert.

### 5. 1. 1 Analyse mitochondrialer Proteine aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen mit Hilfe von eindimensionaler SDS-, BN-Gelelektrophoresen und nicht-radioaktiven zweidimensionalen Gelelektrophoresen

Der Nachweis von Unterschieden im mitochondrialen Proteom ist nur mit Hilfe bestimmter Methoden möglich, wie z. B. einer sogenannten zweidimensionalen Protein-Gelelektrophorese und anschließenden massenspektrometrischen Analysen (s. u.). Dagegen werden in einer eindimensionalen SDS-Gelelektrophorese, in der die mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) vollständig denaturierten, mitochondrialen Proteine größenabhängig aufgetrennt werden, keine eindeutigen Unterschiede zwischen jungen und alten *P. anserina*-Wildstamm-Isolaten gezeigt (Abb. 17).

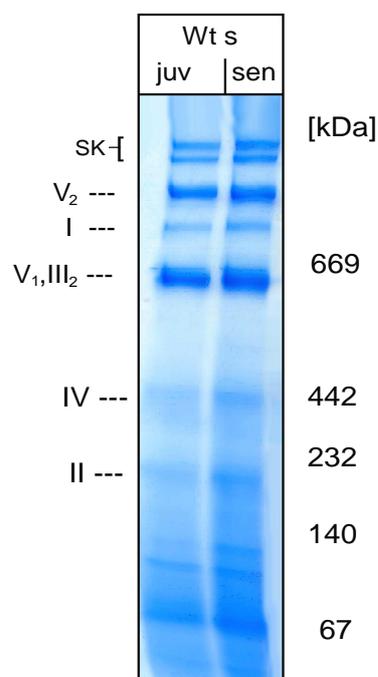


**Abb. 17: Analyse von mitochondrialen Proben aus drei juvenilen und den entsprechenden seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen.** Je 60 µg mitochondriale Proteine aus drei unabhängigen Pärchen (1, 2, 3) junger und alter Wildstämme (juv, sen) wurden in einem 12 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wurden die Proben vorher durch ein einminütiges Aufkochen mit SDS-Probenpuffer denaturiert. Nach der Gelelektrophorese bei 100 V wurden die Proteinbanden im Gel mit Coomassie Brilliant Blue G 250 gefärbt. Die Bandenmuster der mitochondrialen Proben sind sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium vergleichbar. Als Größenstandard (M) wurden 5 µl des vorgefärbten Markers „Prestained Protein Standard #671“ (MBI Fermentas) aufgetragen.

Die Bandenmuster der im Gel aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Proteine aus den juvenilen und seneszenten Wildstämmen unterscheiden sich nicht deutlich genug, um differentiell gebildete Proteine im Mitochondrienproteom zu identifizieren. Ein Grund hierfür ist die unzureichende Auflösung der Auftrennung mit Hilfe dieser Gelelektrophorese. In einer sichtbaren Proteinbande können zwei oder mehr Proteine mit dem gleichen Molekulargewicht vorhanden sein. Daher können mit dieser Methode können nur sehr deutliche Unterschiede identifiziert werden und in den interessanten Proteinbanden dürfen nicht mehrere Proteine vorhanden sein. Um eine größere Auflösung in der Auftrennung der Proteine zu erhalten, müssen die Proteine in zwei Dimensionen aufgetrennt werden. Das bedeutet, dass die Proteine nach der ersten Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE), in der sie entweder nach der Größe oder nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt wurden, in der 2D-PAGE noch einmal nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Auf diese Weise wird ein zweidimensionales Gel erhalten, in dem die Proteine als Punkte, sogenannte „spots“, und nicht mehr als Banden sichtbar sind.

Eine andere Möglichkeit, um die Auftrennung der Proteine zu verbessern, ist die Fraktionierung der Proteine vor der Gelelektrophorese. Eine Art der Gelelektrophorese, in der die Proteine schon vor der Auftrennung fraktioniert werden, ist die sogenannte eindimensionale Blau-Native Gelelektrophorese (BN-PAGE). Hier werden speziell die Atmungskettenkomplexe der inneren mitochondrialen Membran durch eine Solubilisierung mit dem milden Detergenz Digitonin aus der Membran herausgelöst und nur diese werden anschließend in aktiver Form im Gel separiert. In sogenannten „In-Gel-Aktivitätsassays“, bei denen das Gel mit einer Substratlösung für einen Komplex, beispielsweise Komplex I, inkubiert wird, kann die Aktivität der Komplexe direkt visualisiert werden, da die Umsetzung des Substrats eine Farbänderung an den Stellen im Gel verursacht, an denen sich die Proteinbande des Atmungskettenkomplexes befindet. Durch die schonende Solubilisierung (Protein-Digitonin-Verhältnis: 1:4) können sogar hochmolekulare Superkomplexe, also mehrere zusammengelagerte Atmungskettenkomplexe aus der Membran herausgelöst und im Gel in nativer Form aufgetrennt werden. Mit Hilfe dieser Analysen wurde in früheren Untersuchungen in In-Gel-Aktivitätsassays und denaturierenden Gelelektrophoresen in der zweiten Dimension, denen massenspektrometrische Analysen folgten, die Zusammensetzung der Superkomplexe von *P. anserina* im hochmolekularen Bereich aufgeklärt (Krause et al., 2004). Die nicht-denaturierende BN-PAGE zeigt darüber hinaus die Integrität der mitochondrialen Proben, d. h. es ist erkennbar, dass die Superkomplexe der Atmungskette intakt vorliegen und dass die isolierten Proteine nicht durch Proteasen degradiert wurden.

Anhand eines Coomassie-gefärbten BN-Gels mit je 100 µg aufgetrennten mitochondrialen Proteinen aus einem juvenilen und dem entsprechenden seneszenten Wildstamm wird erst einmal deutlich, dass sowohl im juvenilen als auch in dem seneszenten Stadium im hochmolekularen Bereich zwei Superkomplex-Banden erhalten werden (s. Abb. 18). Bei dem kleineren Superkomplex handelt es sich aufgrund von Größenvergleichen mit publizierten Daten (Krause et al., 2004) um den Komplex  $I_1III_2IV_1$  und bei dem größeren um  $I_1III_2IV_2$ . Diese bestehen jeweils aus einem Komplex I-Monomer, einem Komplex III-Dimer und entweder einem Komplex IV-Monomer oder einem Komplex IV-Dimer. Die Mengen der isolierten Superkomplexe sind sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium des Wildstammes gleich. Auch die Mengen der anderen aufgetrennten Komplexe in diesem Gel, also des Komplex V-Dimers, des Komplex I-Monomers und des Komplex V-Monomers unterscheiden sich im seneszenten Stamm nicht von den Mengen dieser Komplexe im juvenilen Stamm (Abb. 18).



**Abb. 18: Analyse der mitochondrialen Atmungskette im juvenilen und seneszenten Wildstamm s.** Je 100 µg mitochondriale Proteine aus einem juvenilen und dem entsprechenden seneszenten Wildstamm s (Wt s) wurden mit Hilfe einer BN-PAGE in einem Gradientengel (Sammelgel: 3,5 %, Trenngel: 4-13 %) aufgetrennt: Es sind die Atmungskettenkomplexe I, III<sub>2</sub> (Dimer), II, IV und V<sub>1</sub> bzw. V<sub>2</sub> im BN-Gel erkennbar. Außerdem sind die Superkomplexe  $I_1III_2IV_1$  und  $I_1III_2IV_2$  vorhanden. SK = Superkomplexe, M = Größenstandard („High molecular weight calibration kit for native electrophoresis“ [Amersham], 5 µg). Vorher wurde eine Solubilisierung der Membranproteine mit Digitonin (Massenverhältnis 4:1, Digitonin:Protein) durchgeführt. Nach der Auftrennung wurde das Gel mit Coomassie gefärbt. Im Gel ist sowohl in der Spur mit der aufgetrennten Probe des juvenilen Stammes als auch in der Spur mit den Proteinen aus dem seneszenten Stamm ein vergleichbares Bandenmuster zu erkennen.

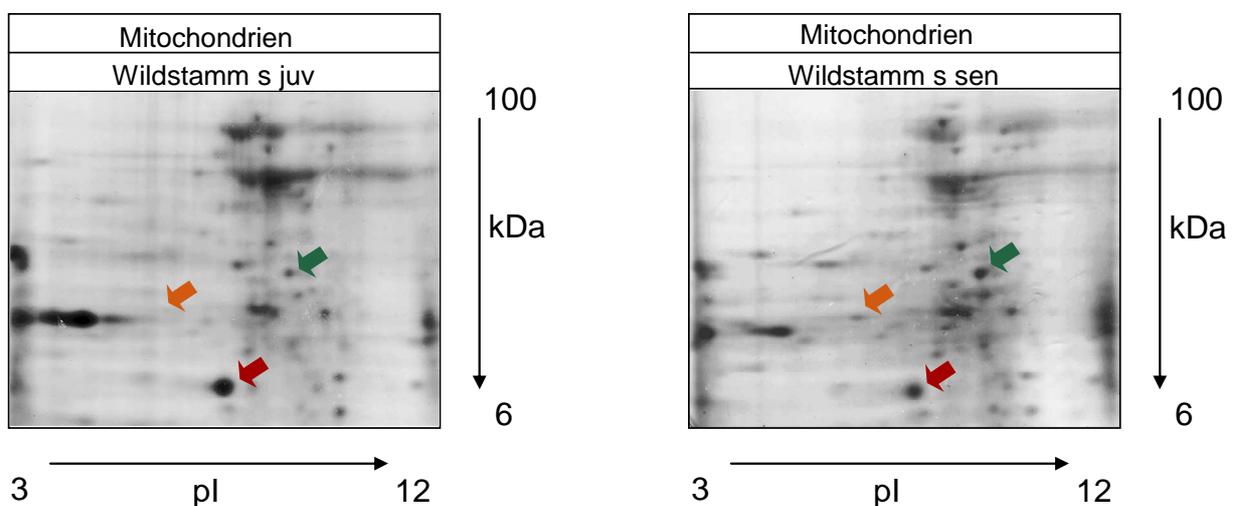
Die Daten zeigen, dass mit Hilfe der eindimensionalen BN-PAGE in der ersten Dimension nur sehr deutliche Unterschiede im Aufbau der Atmungskette herausgestellt werden können,

weniger deutliche Unterschiede, wie sie u. U. zwischen juvenilen und seneszenten Wildstämmen vorkommen, sind dagegen nicht erkennbar. Ein Beispiel für einen *P. anserina*-Stamm, bei der die Atmungskette eine andere Zusammensetzung aufweist, ist die Komplex IV-Deletionsmutante ex1 (Kück et al., 1985; Schulte et al., 1988; Frese and Stahl, 1992). Mit Hilfe einer eindimensionalen SDS-PAGE mit mitochondrialen Proteinen sind in dieser Mutante keine Unterschiede in der Zusammensetzung des Proteoms zu sehen (nicht gezeigt). Mittels BN-PAGE wird jedoch deutlich, dass die beiden Superkomplexe, die aus den Komplexen I, III und IV bestehen, in dieser unsterblichen Mutante nicht vorhanden sind. Diese unsterbliche Mutante besitzt nur Superkomplexe, die aus den Komplexen I und III bestehen (Krause et al., 2004). Kleinere Unterschiede, wie z. B. die Menge der Komplex I-Monomere, die in den Superkomplexen von zwei Proben enthalten sind, können dagegen nur mit Hilfe einer zweidimensionalen Gelelektrophorese und einer anschließenden Massenspektrometrie gezeigt werden.

Im Gegensatz zu diesen beiden Methoden lassen sich auch weniger deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung von zwei mitochondrialen Gesamt-Proteomen mit Hilfe einer differentiellen Proteomanalyse zeigen. Der erste Schritt dieser Analyse besteht in einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) der mitochondrialen Proteine. Bei dieser IEF werden die Proteine nicht nach der molekularen Masse, sondern nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt (s. Kap. 1. 2). In der anschließenden zweidimensionalen SDS-Gelelektrophorese werden die fokussierten Proteine noch einmal nach dem Molekulargewicht getrennt. In einer massenspektrometrischen Analyse können anschließend differentiell gebildete Proteine identifiziert werden. Darüber hinaus ist es ebenfalls möglich, post-translationale Modifikationen an bestimmten Proteinen nachzuweisen (s. Kap. 1. 4).

Für die isoelektrische Fokussierung müssen die isolierten Mitochondrien jedoch vorgegebene Bedingungen erfüllen. Die Mitochondrien müssen in einem Puffer vorliegen, der nur eine sehr geringe Salzkonzentration enthält, weil Salz-Ionen die Fokussierung der Proteine verhindern können (Lopez, 2007). Für initiale Versuche, in denen im Rahmen dieser Arbeit mitochondriale Proteine aus *P. anserina* in 2D-Gelen aufgetrennt wurden, wurden die Proben vor der Fokussierung dialysiert, von dem Mitochondrien-Isolationspuffer getrennt und in IEF-Puffer aufgenommen. Außerdem müssen die Anzucht der zu vergleichenden Stämme und die Behandlung der Proben während der Mitochondrienisolierung möglichst vergleichbar geschehen, sodass ein Entstehen von Unterschieden im Proteinmuster durch ungleiche Behandlung der Proben vermieden wird. Diese Unterschiede können z. B. durch eine Degradation durch Proteasen begründet sein, die durch eine Erwärmung der Proteine während

der Mitochondrienisolierung initiiert werden kann. Eine andere Schwierigkeit bei der IEF von mitochondrialen Proteinen besteht darin, dass diese Präparationen viele Membranproteine der beiden Mitochondrienmembranen enthalten. Zahlreiche dieser Membranproteine sind stark hydrophob. Hydrophobe Proteine haben die Eigenschaft, sich in wässrigem Milieu zu Aggregaten zusammenzulagern. Aufgrund dieser Aggregatbildung kann es vorkommen, dass die Proteine sich nicht mehr isoelektrisch fokussieren lassen (McDonald and Van Eyk, 2003). Mit Hilfe der geeigneten Probenvorbereitung ist es gelungen, mitochondriale Proteinisolate mittels 2D-PAGE aus *P. anserina* aufzutrennen, ohne dass sich aufgrund der hydrophoben Proteine Aggregate gebildet haben (s. Abb. 19).



**Abb. 19: Auftrennung mitochondrialer Proteine aus einem juvenilen und dem entsprechenden seneszenten *P. anserina*-Wildstamm mittels isoelektrischer Fokussierung und 2D-SDS-Gelelektrophorese.** Die beiden waagerechten Balken geben den pH-Bereich der IEF-Streifen der ersten Dimension an (pI), die senkrechten Pfeile deuten die Laufrichtung der 2D-SDS-PAGE an. Die aufgetrennten Proteine umfassen eine molekulare Größenspanne von 6-120 kDa. Es wurden jeweils 100 µg Protein aufgetrennt. Nach der Auftrennung in der zweiten Dimension wurden die Proteinspots in den Gelen mit Coomassie gefärbt. Die Pfeile deuten Proteine an, deren Menge entweder juvenil- oder seneszenzspezifisch erhöht ist.

Anhand der Coomassie-gefärbten Gele wird deutlich, dass in den Proben aus dem juvenilen und seneszenten Wildstamm *s* der größte Teil der Proteine im mittleren pH-Bereich von ca. fünf bis neun fokussiert wurde (s. Abb. 19). Es handelt sich hierbei allerdings um initiale Versuche, mitochondriale Proteome aus *P. anserina* mit Hilfe dieser Methode aufzutrennen. Diese Gele zeigen dennoch, dass die Qualität der mitochondrialen Proteine für diese zweidimensionalen Gele ausreicht und dass mit Hilfe dieser Methode Unterschiede im Proteom von *P. anserina* aufgedeckt werden können. Zur Identifizierung seneszenzspezifischer, differentiell gebildeter Proteine hätten jedoch sowohl die Probenvorbereitung, als auch die Auswertung mit Hilfe einer speziellen Software in dieser Arbeit etabliert und optimiert werden müssen. Dies wurde aufgrund der Möglichkeit,

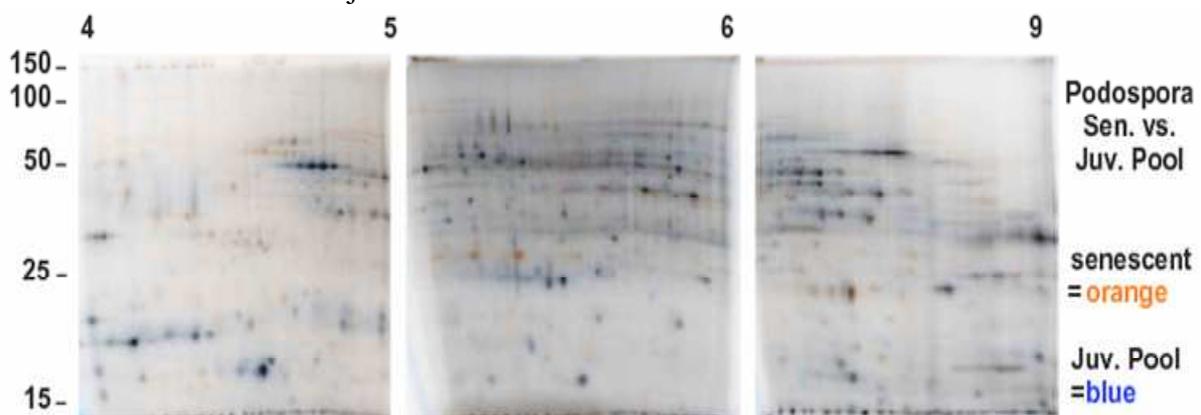
mitochondriale Proteine aus *P. anserina* von dem Projektpartner Firma „ProteoSys“ im Rahmen des EU-Projekts „Role of Mitochondria in Conserved Mechanisms of Ageing“ (MiMage) analysieren zu lassen (s.u.), nicht mehr weiter verfolgt. Im folgenden Kapitel werden daher die Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse mit über Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation aufgereinigten Mitochondrien (Gredilla et al., 2006) aus juvenilen und seneszenten *P. anserina* Wildstämmen dargestellt. Diese sehr reinen Mitochondrien wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Proteomanalyse isoliert.

### **5. 1. 2      Differentielle Proteomanalyse mitochondrialer Proteine aus *P. anserina*-Wildstamm mit Hilfe einer Markierung mit radioaktiven Iod-Isotopen und anschließender 2D-Gelelektrophorese**

Der Vergleich von zwei aufgetrennten Proteomen in unterschiedlichen Gelen und die graphische Auswertung mit Hilfe von speziellen Software-Paketen, u. a. „PDQuest“ von BioRad, hat häufig den Nachteil, dass sich Unterschiede in den Proteinmustern allein durch die Beschaffenheit der beiden Gele ergeben. Bei der Auftrennung der zu vergleichenden Proteinproben in einem Gel nach einer Markierung der beiden Proben mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen oder zwei verschiedenen radioaktiven Iod-Isotopen gibt es keine Gel-spezifischen Unterschiede und die Proteinmuster können sehr gut miteinander verglichen werden.

Im Rahmen des von der Europäischen Union finanzierten Projekts „Role of Mitochondria in Conserved Mechanisms of Ageing“ (MiMage) konnten mitochondriale Proteine aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen von einem Projektpartner (Firma „ProteoSys“, Mainz) mittels 2D-Gelelektrophoresen und vorheriger radioaktiver Iod-Isotop-Markierung in einem Gel aufgetrennt werden. Die differentiell gebildeten Proteine wurden anschließend mit Hilfe von Massenspektrometrie identifiziert. Zu dem Zeitpunkt, als diese Analysen durchgeführt werden sollten, war allerdings noch nicht die vollständige Genomsequenz von *P. anserina* veröffentlicht. Aus diesem Grund war es „ProteoSys“ nicht möglich, die differentiellen Proteine nur mit Hilfe von sogenannten „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight“ (MALDI-TOF)-Analysen zu identifizieren. Für die Proteomanalyse wurde relativ viel Material benötigt, etwa 5 mg bzw. 1 mg der Proteinextrakte wurden jeweils für die Herstellung so genannter „präparativer Gele“ eingesetzt (Hunzinger et al., 2006; Groebe et al., 2007). Bei der Isolierung dieser Menge mitochondrialer Proteine musste zusätzlich die völlige Gleichbehandlung der Proteine

gewährleistet werden. Nach der Mitochondrienisolierung über einen Saccharose-Dichte-Gradienten aus vier juvenilen und den entsprechenden seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen wurden mit der von „ProteoSys“ patentierten Methode 2D-Gele angefertigt und verglichen (Abb. 20). Erst einmal wurden silbergefärbte Gele angefertigt, in denen nur wenig Material verwendet wurde. Es wurden entweder mit  $I^{125}$ -Iodisotopen-markierte Proteine eines jungen Wildstammes und zusammen mit  $I^{131}$ -Iodisotopen-markierte Proteine eines „Protein-Pools“ aus seneszenten Wildstämmen verglichen, oder reziprok markierte Proteine eines alten Wildstammes und Proteine eines „Protein-Pools“ zusammen mit Proben aus juvenilen Wildstämmen aufgetrennt. Die „Protein-Pools“ wurden erstellt, um stammspezifische Unterschiede zwischen den je vier verwendeten Proben zu minimieren.



**Abb. 20: Zweidimensionale Gele einer differentiellen Proteomanalyse mit mitochondrialen Proteinen aus juvenilen und seneszenten *P. anserina* Wildstämmen.** Silbergefärbte Gele mit mitochondrialen Proteinen, die durch eine isoelektrische Fokussierung und einer anschließenden SDS-Gelelektrophorese innerhalb der differentiellen Proteomanalyse aufgetrennt wurden. Die Proteine aus vier juvenilen und vier seneszenten Wildstämmen wurden vorher zu gleichen Teilen gemischt und somit entstanden alternsspezifische Protein-„Pools“. In einem Gel wurden mitochondriale Proteine eines einzelnen seneszenten Stammes mit einer Probe des Protein-„Pools“ juveniler Stämme verglichen. Vor der Auftrennung wurden die Proben jeweils mit einem radioaktiven Iod-Isotop (entweder  $I^{125}$  oder  $I^{131}$ ) markiert. Die Proteine, die im juvenilen Stadium stärker vorhanden sind, sind blau markiert ( $I^{125}$ -Signal) die seneszenzspezifisch-gebildeten Proteine sind orange ( $I^{125}$ -Signal). Hier werden repräsentative Gele gezeigt, die das Falschfarbenbild mit den blauen und orangefarbenen Signalen zeigen, das nach Auswertung der radioaktiven Signale erstellt wurde modifiziert nach (Groebe et al., 2007).

Als Referenz wurden von jeder der acht Proben silbergefärbte Gele angefertigt, die als Referenz für die präparativen Gele verwendet wurden. In den präparativen Gelen wurden jeweils 300  $\mu$ g der zu vergleichenden Proteinproben zusammen aufgetrennt und anschließend die „Proteinspots“ zur massenspektrometrischen Analyse isoliert. Mit den mit Trypsin verdauten Proteinen wurden „Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight“-Spektren aufgenommen und durch den Vergleichs mit den gespeicherten Spektren in einer MALDI-TOF-Datenbank wurden etwa 50 differentiell gebildete Proteine identifiziert. Diese 50 Proteinspots beinhalteten zum Teil die gleichen Proteine in anderen Isoformen, die aufgrund einer posttranslationalen Modifikation einen veränderten isoelektrischen Punkt oder

eine andere Masse aufweisen (s. Tab. 2). Zahlreiche andere Proteinspots konnten aufgrund der fehlenden Genomsequenz noch nicht identifiziert werden.

Name des Proteins und Stoffwechsel	Isoformen	Menge
<b>Atmungskette</b>		
Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2	2	↓ - 59 % ↓ - 37 %
ATP Synthase Beta-Chain	5	4 ↓ - 52 %; - 49 % ↓ - 44 %; - 31 %      1 ↑ + 84 %
ATP synthase gamma chain, mitochondrial precursor		↑ + 108 %
ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein-like protein		↑ + 84 %
ATP synthase subunit 4, mitochondrial precursor		↓ - 41 %
NADH-quinone oxidoreductase	2	↓ - 50 %
cytochrome c oxidase subunit Vb	2	↓ - 40 %
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein I (mitochondrial processing peptidase)		↑ + 69 %
<b>Zitratzyklus</b>		
isocitrate dehydrogenase (NAD) subunit 1 ( <i>Aspergillus nidulans</i> )	3	↓ - 61 % ↓ - 60 % ↓ - 37 %
malate dehydrogenase, mitochondrial precursor ( <i>Chaetomium globosum</i> )	3	↓ - 51 % ↓ - 49 % ↓ - 48 %
<b>Fettsäurestoffwechsel</b>		
acetyl-CoA-acetyltransferase ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ) Mevalonate-Stoffwechsel	3	↓ - 61 % ↓ - 60 % ↓ - 37 %
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ( <i>Tetrahymena thermophila</i> ) Fettsäureoxidation		↓ - 60 %
acyl-CoA dehydrogenase ( <i>Aspergillus fumigatus</i> ) Fettsäureoxidation		↓ - 50 %
enoyl-CoA hydratase ( <i>Dictyostelium discoideum</i> ) Fettsäureoxidation		↓ - 42 %

**Tab. 2: Ergebnisse des Vergleichs der MALDI-TOF-Spektren mit bestehenden Datenbanken und mit dem *Podospira anserina*-Genom.** Fortsetzung und Erklärungen s. nächste Seite.

Name des Proteins und Stoffwechsel	Isoformen	Menge
<b>ROS-Abwehr</b>		
putative peroxiredoxin ( <i>Candida albicans</i> )		↓ - 43 %
Flavohemoglobin ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )		↓ - 50 %
Manganese superoxide dismutase ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )		↓ - 43 %
<b>Apoptose</b>		
Putative mitochondrial cyclophilin 1 ( <i>Neurospora crassa</i> )		↑ + 225 %
<b>Aminosäureabbau</b>		
glycine cleavage system H protein ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )	3	↓ - 47 %; - 46 % - 42 %
methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase ( <i>Aspergillus fumigatus</i> )		↓ - 50 %
Aspartate aminotransferase		↑ + 139 %
<b>Sonstige</b>		
Nucleoside diphosphate kinase (ATP-Synthase)		↑ + 150 %
probable pyruvate dehydrogenase beta chain (AcetylCoA-Bildung)		↑ + 1045
Mitochondrial import receptor subunit TOM20 (MOM19 protein) (Proteineintransport)		↓ - 37 %
elongation factor 1-beta ( <i>Aspergillus terreus</i> ) (Proteinsynthese)		↑ + 74 %
Heat shock protein SSC1, mitochondrial precursor	2	↑ + 45 %; + 69 %
Disulfide isomerase (Chaperonfunktion)	2	↑ + 700 %; + 782 %
probable electron transfer flavoprotein alpha chain (Elektronentransport)		↓ - 48 %
putative SAM-dependent O-methyltransferase ( <i>Podospora anserina</i> ) (Methylierung)	2	↑ + 364 %; + 368 %

**Fortsetzung Tab. 2: Ergebnisse des Vergleichs der MALDI-TOF-Spektren mit bestehenden Datenbanken und mit dem *Podospora anserina*-Genom.** Die hier gezeigten, identifizierten, differentiell-gebildeten Proteine wurden ihren Stoffwechselwegen zugeordnet. Die Pfeile in Blau oder Orange zeigen, ob die Menge des jeweiligen Proteins im juvenilen Stadium verringert ist (blau, Abnahme in Prozent) oder die Menge im seneszenten Stadium ansteigt (orange, Zunahme in Prozent) vorhanden ist. Zusätzlich wird die Anzahl der detektierten Protein-Isoformen eines Proteins gezeigt (modifiziert nach Groebe et al., 2007).

Es wurden 29 differentiell gebildete Proteine identifiziert, von denen jedoch z. T. zahlreiche Isoformen vertreten sind, sodass viel mehr differentielle Proteinspots im Gel vorhanden sind. Ein Beispiel für ein Protein, von dem Isoformen existieren, ist die ATPase, von der  $\beta$ -Untereinheit dieses Proteins wurden in *P. anserina* fünf Isoformen identifiziert (Groebe et al., 2007). Mehrere Isoformen dieses Atmungskettenkomplexes wurden von „ProteoSys“ ebenfalls im Rahmen von MiMage in mitochondrialen Proben aus dem Rattengehirn und in Proben aus menschlichen „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC)-Zellen, also aus menschlichen Nabelschnurzellen identifiziert.

Dies zeigt, dass die ATPase ein Ziel für oxidative Modifikationen darstellt, denn bei diesem Protein wurde die sogenannte „N-formyl Kynurenin“-Bildung in allen drei untersuchten Modellorganismen mittels MALDI-TOF-Analysen nachgewiesen (Groebe et al., 2007). Bei

dieser Modifikation handelt es sich um eine oxidative Schädigung von Tryptophan durch Radikalangriffe (s. Kap. 1.4). Wenn die identifizierten Proteine in Stoffwechselgruppen eingeteilt werden, zeigt sich insgesamt anhand der Ergebnisse, dass der größte Teil der Proteinkomplexe der Atmungskette im seneszenten Stadium von *P. anserina* in geringerer Menge vorhanden sind, und dass sie posttranslational modifiziert werden. Die beiden Stoffwechselwege, deren Proteine in vergleichbarer Weise betroffen sind, sind der Zitratcyclus und der Fettsäurestoffwechsel. Bei den identifizierten Proteinen, die diesen beiden Stoffwechselwegen zugeordnet werden, wird deutlich, dass die meisten Proteine in geringeren Mengen in den Mitochondrien seneszenter Wildstämme als in juvenilen Stämmen vorhanden sind. Dies könnte die Folge einer stärkeren oxidativen Schädigung und des verstärkten Abbaus geschädigter Proteine sein oder, dass die Synthese dieser Proteine im seneszenten Wildstamm aufgrund von DNA-Schädigungen gestört wird. Bei der Proteomanalyse wurden neben den Proteinen, die am Energiehaushalt oder an der Atmungskette beteiligt sind, auch andere Proteine als seneszenzspezifisch differentiell gebildete Proteine identifiziert.

Proteine der ROS-Abwehr in den Mitochondrien der alten Wildstämme sind ebenfalls in anderen Mengen vorhanden, als in den Mitochondrien der jungen Wildstämme. Es werden z. B. deutlich geringere Mengen des putativen Peroxiredoxins und der mitochondrialen Superoxid-Dismutase in den Mitochondrien der alten Wildstämme detektiert als in den Mitochondrien der juvenilen Wildstämme. Ein weiteres Protein, das sehr wahrscheinlich an der ROS-Abwehr beteiligt ist, ist ein juvenil-spezifisch gebildetes Flavohämoglobin. Dieses Protein ist im seneszenten Stadium in geringerer Menge zu finden (s. Diskussion).

Neben diesen Proteinen wurden drei Proteine identifiziert, die in den Mitochondrien von alten Wildstämmen in stark erhöhter Menge zu finden sind. Das erste Protein Cyclophilin D bzw. die Peptidyl-Prolyl Isomerase D ist ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Protein, das an der Apoptose beteiligt ist (Palma et al., 2009). Es ist ein Bestandteil der sogenannten „mitochondrial permeability transition pore“. Das zweite Protein, das in stark erhöhter Menge in den Proben aus den seneszenten *P. anserina* Isolaten identifiziert wurde, ist eine Protein-Disulfid-Isomerase. Dieses Enzym katalysiert die Umlagerung und Neubildung von Disulfid-Brücken bei der Faltung von Proteinen (s. Diskussion).

Das dritte Protein, das in stark erhöhter Menge in den Proteinisolaten identifiziert wurde, ist eine S-Adenosyl-Methionin-abhängige (SAM) Methyltransferase (PaMTH1) (s. Einleitung). Es wurde überraschend in der Liste dieser mitochondrialen Proteine gefunden, denn diesem Protein fehlt eine typische mitochondriale Eintransportsequenz am N-terminalen Ende. Es wurde zudem im Rahmen einer früheren Suche nach seneszenzspezifisch gebildeten Proteinen innerhalb von eindimensionalen SDS-Gelelektrophoresen mit Gesamtproteinen identifiziert (Averbeck et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde eine prominente Proteinbande mit einer Größe von 27 kDa aus Gesamtproteinen des seneszenten Wildstammes isoliert und mit Hilfe von Proteinsequenzierung als PaMTH1 identifiziert.

Insgesamt bieten die Ergebnisse der Proteomanalyse viele interessante, neu identifizierte Proteine, deren Rolle während des Alternsprozesses in *P. anserina* weiter analysiert werden kann und so u. U. in zukünftigen Arbeiten neue Signalwege in dem komplexen Alternsprozess aufgedeckt und erklärt werden können.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Rolle der SAM-abhängigen Methyltransferase PaMTH1 als ein potentiell neues mitochondriales Protein während des Alterns in *P. anserina* mit Hilfe von unterschiedlichen molekularbiologischen, biochemischen und physiologischen Methoden untersucht.

## **5. 2 Charakterisierung von PaMTH1, einem Protein, das in *P. anserina* seneszenzspezifisch gebildet wird**

Mit dem Ziel, die Rolle des neu identifizierten differentiell-gebildeten Proteins PaMTH1 in den Mitochondrien von *P. anserina* während des Alterns aufzuklären, wurden molekularbiologische, physiologische und biochemische Methoden zur Analyse angewendet. Im folgenden Kapitel werden im Abschnitt 5. 2. 1 Untersuchungen zur Einordnung von PaMTH1 in die Proteinfamilie der Methyltransferasen beschrieben, die einen ersten Aufschluss über die *in vivo*-Funktion von PaMTH1 geben sollten. Im zweiten Unterkapitel 5. 2. 2 wird die Expression des *PaMth1*-Gens und die Bildung des PaMTH1-Proteins während des Alterns im *P. anserina* Wildstamm mit verschiedenen molekularbiologischen und biochemischen Methoden analysiert. In Kapitel 5. 2. 3 wird die Analyse der subzellulären Lokalisation der Methyltransferase in *P. anserina* mit Hilfe einer GFP-Fusion, anschließender konfokaler Laserscan-Mikroskopie und Westernblot-Analysen dargestellt. Die Untersuchung der Substratspezifität von PaMTH1, die mittels heterologer Expression in *E. coli* und einem photometrischen Aktivitätstest charakterisiert wurde, wird in Kapitel 5. 2. 4 dargestellt. Zur

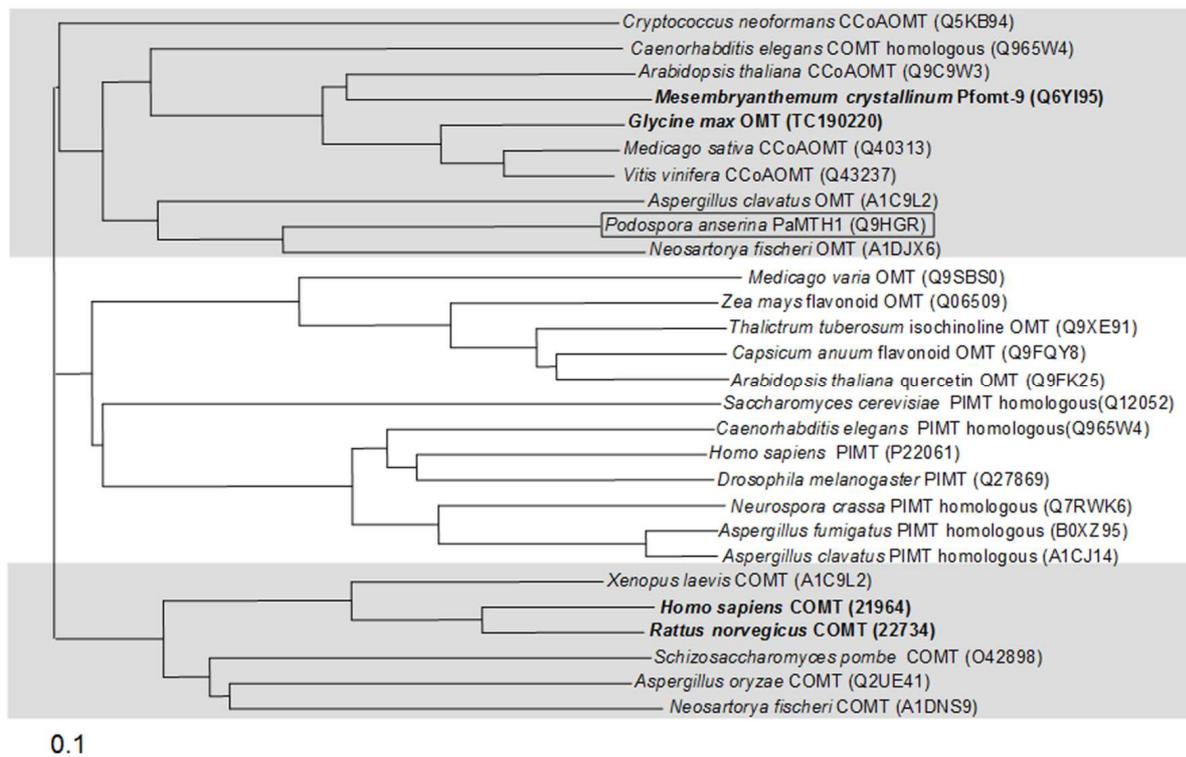
weitergehenden Analyse der Rolle, die von PaMTH1 in *P. anserina* während des Alterns übernommen werden könnte, wurde die Expression von *PaMth1* in *P. anserina* moduliert. In Kapitel 5. 2. 5 werden die Herstellung und Charakterisierung eines *PaMth1*-Überexpressionsstammes in *P. anserina* beschrieben. In Kap. 5. 2. 6 werden die Untersuchungen zur Auswirkungen einer Deletion dieses Gens in *P. anserina* dargestellt und in Kap. 5. 2. 7 wird die Herstellung einer Reversionsmutante aus dem vorhandenen *PaMth1*-Deletionsstamm und die nähere Charakterisierung dieses transgenen Stammes beschrieben.

### 5. 2. 1 Einordnung von PaMTH1 in die Proteinsuperfamilie der Methyltransferasen

Während der initialen Analysen, die von Nicole Averbeck im Rahmen ihrer Dissertation zur Untersuchung von PaMTH1 durchgeführt wurden, wurde ein Vergleich der PaMTH1-Proteinsequenz mit den Proteinsequenzen von anderen bekannten Methyltransferasen erstellt. Die Untersuchung der Proteinsequenz vermittelt einen ersten Eindruck von der Ähnlichkeit von PaMTH1 mit anderen Methyltransferasen aus dieser sehr großen Proteinsuperfamilie. Für den Homologievergleich wurden die Proteinsequenz von PaMTH1 aus *P. anserina*, der pflanzlichen Caffeoyl-CoA-Methyltransferase aus *Vitis vinifera* (*V. vinifera* CCoAOMT) und der Catechol O-Methyltransferase aus der Ratte (*Rattus norvegicus* COMT) verwendet (Averbeck et al., 2000). Es wird deutlich, dass in der PaMTH1-Sequenz die für die Methyltransferasen typischen Motive I-III (Kagan und Clarke, 1994) und die Motive F, B, C und H (Joshi and Chiang, 1998a) vorhanden sind (s. Einleitung).

Zur genaueren Einordnung von PaMTH1 in die Proteinsuperfamilie der Methyltransferasen, wurden mit Hilfe eines Homologievergleichs mit etwa 200 anderen Methyltransferasen aus vielen unterschiedlichen Organismen 26 verwandte Methyltransferasen aus zwei Unterklassen der Methyltransferase-Familie für die Erstellung eines Stammbaums ausgewählt. Es wird deutlich, dass PaMTH1 zur Klasse I der Methyltransferasen gehört (s. Abb. 21). Wie in der Einleitung dargestellt wird, handelt es sich bei den Klasse I-Methyltransferasen um Kation-abhängige kleinere Methyltransferasen, zu denen z.B. auch die in den Nervenzellen der Menschen vorhandene Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (29 kDa) gehört. Zur Klasse II gehören Kation-unabhängige größere Methyltransferasen (30-40 kDa), die in Pflanzen oft in dimerer Form vorliegen. Auch die sogenannte Protein L-Isoaspartat O-Methyltransferase, die mit Alternsprozessen in Verbindung gebracht wird, gehört zur zweiten Klasse. Dieses Protein

gibt es in sehr konservierter Form in vielen Organismen. Die Methyltransferasen methylieren, je nachdem, zu welcher Klasse sie gehören, unterschiedliche Substrate.



**Abb. 21.: Stammbaum von verschiedenen Kation-abhängigen Klasse I und Kation-unabhängigen Klasse II-O-Methyltransferasen.** Über die Substratspezifität der beiden nächsten verwandten Methyltransferasen von PaMTH1, die Enzyme der Ascomyceten *Neosartorya fischeri* (Synonym: *Aspergillus fischerianus*) und *Aspergillus clavatus*, ist nichts bekannt. Die anderen homologen Methyltransferasen wurden für die Erstellung des Stammbaums als repräsentative Enzyme ausgewählt, die verschiedene Substrate akzeptieren: Klasse I-Methyltransferasen, die das Substrat Caffeoyl-CoA akzeptieren (CCoAOMT), aber z. T. auch Flavonoide (fett gedruckt), pflanzliche Klasse II-Enzyme, die Flavonoide methylieren (flavonoid OMT) und Klasse II-Enzyme, die mit der Alterung in Verbindung gebracht werden: Die so genannten Protein-L-Isoaspartate-O-Methyltransferasen (PIMT). Eine weitere Untergruppe der Klasse I-Methyltransferasen (COMT) ist am Abbau von Dopamin beteiligt und methyliert L-Dihydroxy-Alanin (L-DOPA). „UniProt“ oder „TIGR“-Akzessions-Nummern sind hinter jedem Protein angegeben. Ein Abstand von 0,1 im Stammbaum entspricht einem ausgetauschten Nukleotid im Gen des betreffenden Proteins (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008)

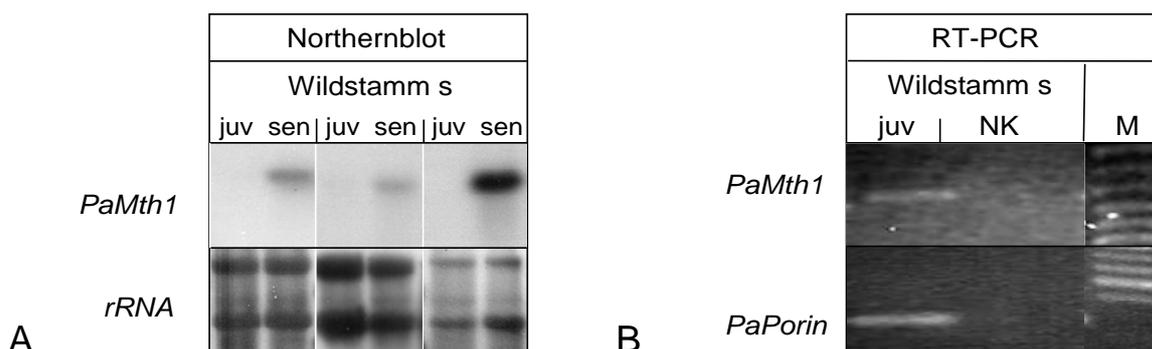
Methyltransferasen der Klasse I, die in der Abbildung grau unterlegt sind, methylieren in Pflanzen z. B. häufig Caffeoyl-CoA während der Lignin-Biosynthese (Ye et al., 1994). Diese Methyltransferasen galten in ihrer Substratakzeptanz lange Zeit als sehr eingeschränkt (s. Einleitung). Die Methyltransferasen aus *P. anserina*, *Neosartorya fischeri* und *Aspergillus clavatus* setzen sich innerhalb der Klasse I-Enzyme von den pflanzlichen Vertretern ab, erwartungsgemäß setzen sich die drei Methyltransferasen noch deutlicher von den Methyltransferasen der zweiten Klasse ab (Abb. 21).

Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse wird daher deutlich, dass PaMTH1 zwar zur ersten Klasse der Methyltransferasen gehört, u. U. aber eine andere Substratspezifität vorweisen könnte als die pflanzlichen Methyltransferasen. Die Klasse I Catechol-O-Methyltransferase

aus der Ratte methyliert z. B. das Flavonoid Quercetin 100x besser als L-DOPA (Zhu *et al.*, 1994). Auf der Grundlage des Ergebnisses dieser Homologievergleiche wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Substratspezifität mit Hilfe biochemischer Methoden analysiert, mit dem Ziel, die *in vivo*-Funktion dieses Enzyms zu untersuchen und somit die Rolle von PaMTH1 während des Alterns in *P. anserina* zu analysieren (s. 5. 2. 3).

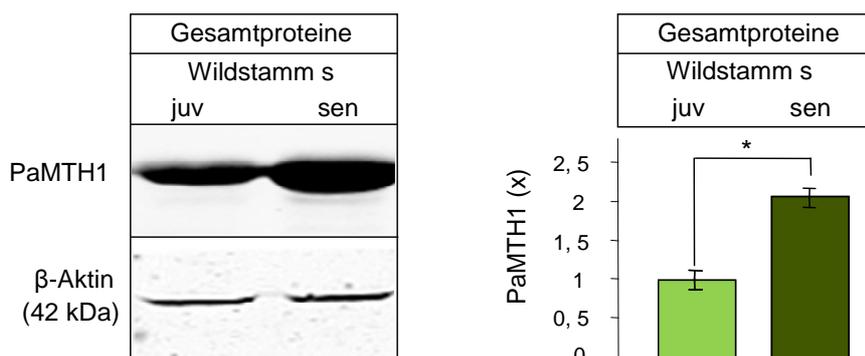
### 5. 2. 2 Analyse der *PaMth1*-Transkript- und der PaMTH-Proteinmenge im juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstamm

Sowohl mit Hilfe einer eindimensionalen Gelelektrophorese mit Gesamtproteinen als auch in der differentiellen Proteomanalyse mit mitochondrialen Proteinen von *P. anserina* wurde PaMTH1 als seneszenzspezifisch stärker gebildetes Protein identifiziert (s. Kap. 5. 1). Im Rahmen der molekularbiologischen Analysen von PaMTH1 wurde die Menge des *PaMth1*-Transkripts in drei unabhängigen Paaren junger und alter Wildstämme in einer Northernblot-Analyse untersucht, um eine Korrelation der seneszenzspezifisch hohen Proteinmenge mit einer eventuell erhöhten Genexpression nachzuweisen. Für diese Analyse wurden je 10 µg Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Paaren junger und alter Wildstämme in einem denaturierenden Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als radioaktive *PaMth1*-Sonde wurde ein  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-markiertes, ca. 650 Bp *Bam*HI-Fragment des Plasmids „p*PaMth1*gfp1“ benutzt. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einem  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierten 5,7 kbp *Hind*III-Fragment des Plasmids pMy60 (Verbeet *et al.*, 1983) gegen die rRNA von *Saccharomyces carlsbergensis* rehybridisiert (s. Abb. 22).



**Abb. 22: Analyse der *PaMth1*-Transkription während der Alterung in *P. anserina* Wildstamm s.** (A) Mittels Northernblot-Analyse wurde die Menge des *PaMth1*-Transkripts in der Gesamt-RNA aus drei unabhängigen Paaren juveniler und seneszenten Wildstämmen (Wt s, juv sen) detektiert. Nach der Auftrennung in einem denaturierenden 1% igem Agarosegel, wurde die RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Das Transkript (*PaMth1*) wurde von der radioaktiven *PaMth1*-spezifischen Sonde nur in den seneszenten Wildstämmen detektiert und zeigt eine starke Induktion der *PaMth1*-Genexpression im seneszenten Stamm. Als Ladekontrolle und zur Integritätsverifizierung wurde die rRNA mit einer rDNA-Sonde detektiert. (B) Das 720 Bp große *PaMth1*-Transkript wurde mittels Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden mit cDNA eines juvenilen Wildstammes amplifiziert. In der Negativkontrolle (NK) wurde keine Matrize eingesetzt und als Kontrolle der cDNA-Menge und Integrität wurde das *P. anserina* Porin amplifiziert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

Anhand der Northernblot-Analyse wird sichtbar, dass in der Gesamt-RNA aller drei seneszenten Wildstämme eine erhöhte Menge des *PaMth1*-Transkriptes enthalten ist. Im Gegensatz dazu wird in den Proben der jungen Stämme kein Transkript identifiziert. Dieses lässt sich allerdings mit Hilfe von *PaMth1*-spezifischen Oligonukleotiden innerhalb der sensitiveren Methode der Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) mit cDNA als Matritze nachweisen (Abb. 22). Dieser Befund zeigt, dass in den jungen Wildstämmen ebenfalls eine Transkription von *PaMth1* stattfindet. Dies entspricht den Erwartungen, denn das PaMTH1-Protein wurde z. B. in den Mitochondrien des jungen Wildstammes mit Hilfe der Proteomanalyse gefunden (s. Tab. 3). In Übereinstimmung mit dem deutlichen seneszenzspezifischen Anstieg in der Transkription zeigt eine Westernblot-Analyse, in der ein neu-synthetisierter Peptidantikörper gegen PaMTH1 verwendet wurde, in den Gesamtproteinen aus jungen und alten Wildstämmen einen etwa zweifachen Anstieg der Proteinmenge in den alten Stämmen (s. Abb. 23).



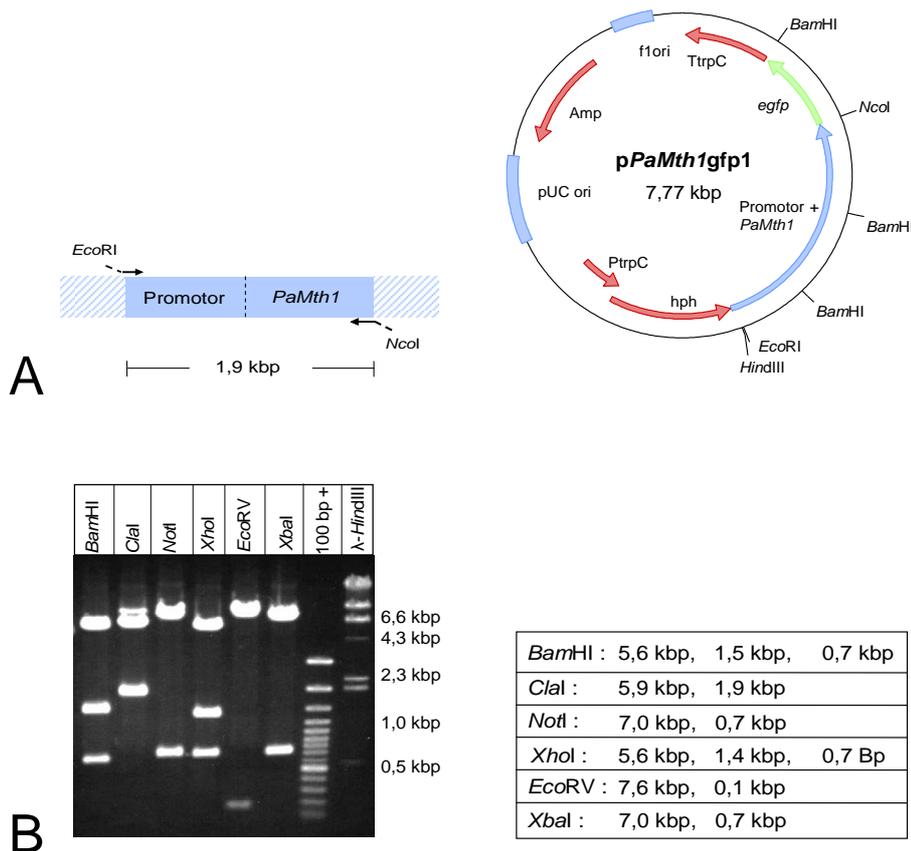
**Abb. 23: Nachweis einer erhöhten PaMTH1-Menge in Gesamtproteinen aus alten Wildstämmen mittels Westernblot-Analyse.** Je 25  $\mu$ g Gesamtproteine eines juvenilen Wildstammes und des entsprechenden seneszenten Isolats wurden in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Hybridisierung mit einem polyklonalen Antikörper gegen PaMTH1 wurde in der Probe des seneszenten Wildstammes im Vergleich zur Probe des juvenilen Stammes eine deutlich erhöhte Menge PaMTH1 detektiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das cytoplasmatische  $\beta$ -Aktin verwendet. Die densitometrische Quantifizierung von vier unabhängigen Westernblots zeigt, dass im seneszenten Stadium durchschnittlich eine zweifach erhöhte PaMTH1 vorhanden ist (Wilcoxon test, two-tailed,  $p = 0,008$ ). Die Balken geben den jeweiligen Standardfehler an (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

Die Quantifizierung dieses Ergebnisses erfolgte nach dem Einscannen der Membran mit dem „Licor“-Scanner und dem entsprechenden Computerprogramm. Hier wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle verwendet und zeigt eine gleichmäßige Beladung der Taschen des Gels, aus dem die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert wurden. Der polyklonale Peptid-Antikörper gegen PaMTH1 (s. Methoden) stand noch nicht zur Verfügung, als die Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse vorlagen.

### 5. 2. 3 Die zelluläre Lokalisation von PaMTH1 in *P. anserina*

Die Identifizierung von PaMTH1 in mitochondrialen Proben im Rahmen der Proteomanalyse war überraschend, da dieses Protein keine mitochondriale Eintransportsequenz besitzt. Jedoch war es zu diesem Zeitpunkt aufgrund des fehlenden Antikörpers nicht möglich, PaMTH1 direkt in mitochondrialen Proben mittels Westernblot nachzuweisen. Zur Verifizierung der mitochondrialen Lokalisation von PaMTH1 wurden aus diesen Gründen eine GFP-Fusion und eine Lokalisationsanalyse des gebildeten Fusionsproteins in *P. anserina* vorgenommen.

Für die Konstruktion eines Plasmids zur GFP-Fusion von PaMTH1 in *P. anserina* wurde zunächst ein 1,9 kbp großes DNA-Fragment mit den Oligonukleotiden O-Met\_*EcoRI*\_for und O-Met\_*NcoI*\_rev und genomischer DNA als Matrize innerhalb einer PCR-Reaktion amplifiziert. Dieses PCR-Produkt besteht aus dem offenen Leserahmen von *PaMth1*, und der endogenen 1 kbp großen Promotorregion. In der Amplifikation wurde am 5'-Ende eine *EcoRI*-Schnittstelle und am 3'-Ende eine *NcoI*-Schnittstelle eingeführt. Dem entstehenden PCR-Produkt fehlt durch eine Basenänderung in der bindenden Sequenz des Oligonukleotids O-Met\_*NcoI*\_rev das Stopcodon des *PaMth1*-Leserahmens, damit eine Translation der beiden fusionierten Leserahmen in den Transformanten möglich ist. Nach der Aufreinigung des Amplifikats erfolgte die Herstellung überhängender Enden durch Restriktion mit *EcoRI* und *NcoI*. Die Ligation dieses geschnittenen Insertionsfragmentes erfolgte in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pSM4, das den offenen Leserahmen für das *egfp*-Gen, eine Ampicillin-Resistenzkassette für die Selektion in *E. coli* und eine Hygromycin B-Resistenzkassette für die Selektion von transgenen *P. anserina*-Stämmen trägt. Nach erfolgreicher Ligation des Vektors pSM4 und des Insertionsfragmentes sollte am 3'-Ende der Kassette aus Promotorregion und dem *PaMth1*-Gen das *egfp*-Gen folgen (Abb. 24 A).

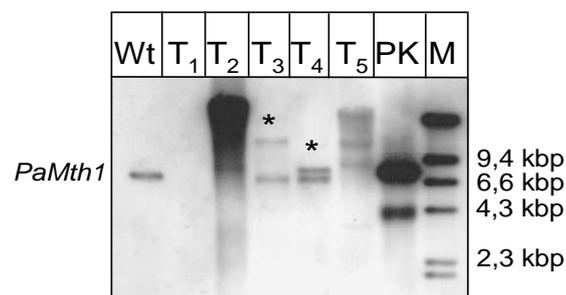


**Abb. 24: Konstruktion eines Vektors zur Herstellung von PaMTH1-GFP-Fusions-Protein bildenden Transformanten in *P. anserina*.** (A) Zur PCR-Amplifikation von *PaMth1* und der entsprechenden Promotorsequenz (~ 1,9 kBp) mit genomischer *P. anserina*-DNA als Matritze wurden die Oligonukleotide O-Met\_*Eco*RI\_for und O-Met\_*Nco*I\_rev eingesetzt. Die schematische Karte des Plasmids *pPaMth1gfp1* zeigt den Aufbau des Plasmids. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind z. T. in der Karte angegeben. Amp = Ampicillin-Resistenzkassette, hph = Hygromycin-Resistenzkassette (B) Kontrollrestriktionen von *pPaMth1gfp1* (jeweils 500 ng) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI, *Cla*I, *Not*I, *Xho*I, *Eco*RV und *Xba*I. In der Tabelle sind die den Restriktionsenzymen entsprechenden Fragmentgrößen angegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M =  $\lambda$  *Hind*III (250 ng).

Nach Transformation des Ligats (molares Verhältnis Vektor:Insertionsfragment 1:7) in kompetente *E. coli* XL1 Blue erfolgte die Selektion von Ampicillin-resistenten Kolonien und die anschließende Isolierung des Plasmids „*pPaMth1gfp1*“ durch eine „Mini“-Plasmid-Präparation, das durch eine Restriktionsanalyse verifiziert wurde. Der Bakterienklon, der das erwartete Plasmid trug, diente als Grundlage für eine „Midi“-Präparation des Plasmids. Die Klonierung, Isolierung und Testrestriktion des Vektors wurde freundlicherweise von Frau Alexandra Werner durchgeführt. Die korrekte Sequenzabfolge des isolierten Vektors wurde durch Restriktionsanalysen (Abb. 24 B) und mit Hilfe einer Sequenzierung verifiziert.

10  $\mu$ g dieses Konstrukts, der Positivkontrolle *pAN7-1* und der Negativkontrolle *phph-1* wurden in je  $1 \times 10^7$  mit Hilfe von Glucanex hergestellte Protoplasten des *P. anserina* Wildstammes s<sup>-</sup> 18261 transformiert. Die Transformanten mit *pPaMth1gfp1* wurden anhand

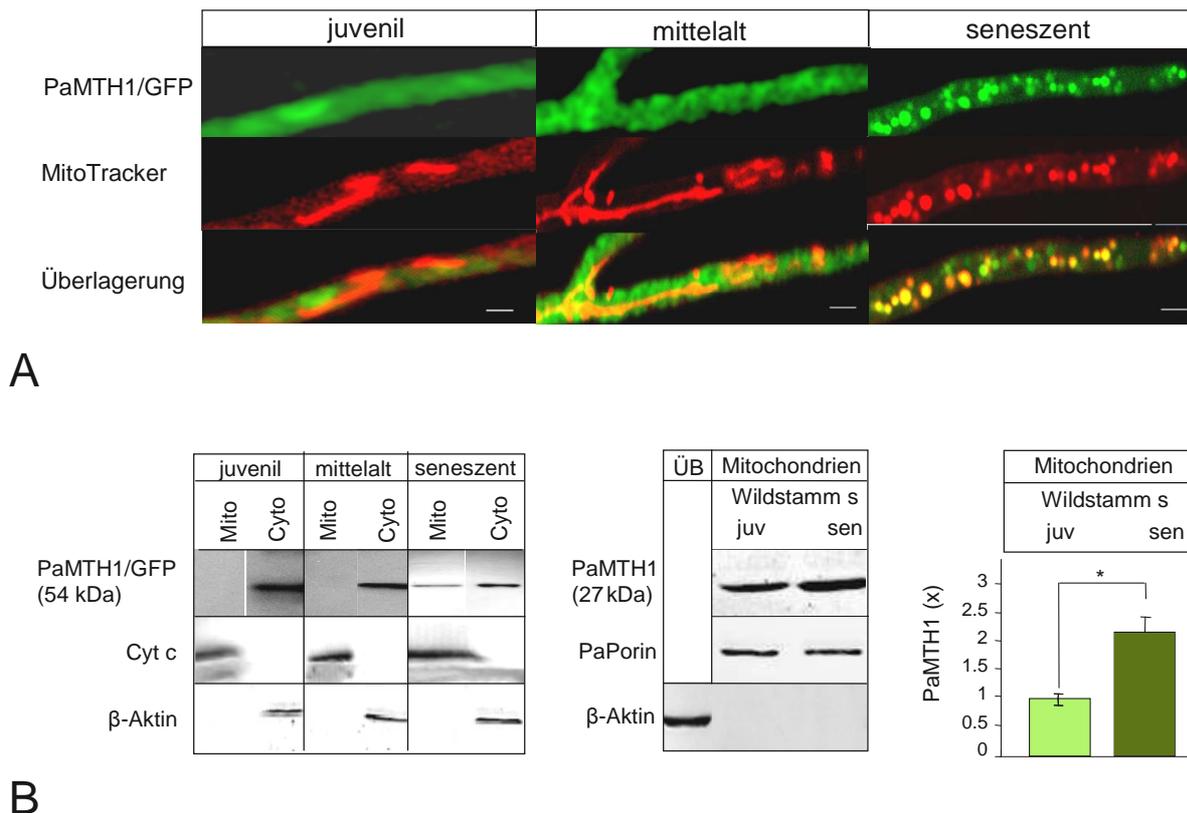
ihres Wachstums auf Hygromycin B-haltigen Medium selektiert. In einigen Transformanten wurde die Aufnahme des Plasmids *pPaMth1gfp1* in das Genom durch eine Southernblot-Analyse überprüft. Hierfür wurde die Gesamt-DNA isoliert und mit *HindIII*, das einmal in *pPaMth1gfp1* schneidet und somit zum Nachweis von Tandemintegrationen geeignet ist, restringiert. Nach Transfer der restringierten DNA auf eine Nylonmembran erfolgte die Analyse mit einem 688 Bp großem DIG-markierten *BamHI*-Fragment aus dem Vektor *pPaMth1gfp1* als Sonde gegen *PaMth1*. Es wurden zwei Transformanten für weitere Analysen ausgewählt. In der DNA dieser Transformanten wurde jeweils eine weitere Integration von *PaMth1* mit Fragmentgrößen von etwa 11 kbp ( $T_3$ ) und 7,5 kbp ( $T_4$ ) identifiziert (Abb. 25).



**Abb. 25: Southernblot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPaMth1gfp1* in das Genom der putativen Transformanten *PaMth1\_gfpT<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>*.** Jeweils 800 ng genomische DNA des Wildstammes (Wt) und der Transformanten wurde mit *HindIII* restringiert und in einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit einer *PaMth1*-spezifischen, DIG-markierten DNA-Sonde. Zusätzlich zu dem endogenen *PaMth1*-Fragment mit einer Größe von 6,7 kbp zeigen die Transformanten  $T_3$  und  $T_4$  jeweils eine Einzelintegration des Plasmids (Stern). Als Größenstandard wurden 40 ng des DIG markierten  $\lambda$  *Hind III* (M) und als Positivkontrolle wurden 10 ng des mit *HindIII* geschnittenen Plasmid *pPaMth1gfp1* aufgetragen (PK), bei der zweiten Bande in dieser Spur handelt es sich um ungeschnittenen Vektor, der ebenfalls mit der Sonde hybridisiert.

Diese beiden Primärtransformanten wurden gegen den Wildstamm  $s^+$  18160 gekreuzt und es wurden Sekundärtransformanten erhalten, die durch Wachstum auf Hygromycin B-haltigem Medium selektiert wurden. Die Lokalisierung des PaMTH1-GFP-Fusionsproteins wurde in jungen, mittelalten und seneszenten Primär- und Sekundärtransformanten mit Hilfe von konfokaler „Laserscan“-Mikroskopie (CLSM) vorgenommen. Hierfür wurden die transgenen Stämme auf einer mit BMM-Nährmedium gefüllten Mulde eines Objektträgers in einer Feuchtkammer für 1-2 Tage bei 27 °C angezogen. Vor der mikroskopischen Analyse der Stämme erfolgte eine Mitochondrienfärbung mit dem Farbstoff „Mitotracker Red CMXRos“ (Sigma). In den mikroskopischen Bildern, in denen das GFP-Signal analysiert wird, zeigt sich in den Hyphen der jungen und mittelalten Isolate eine gleichmäßige Verteilung des grünfluoreszierenden (Abb. 26 A). Dieses GFP-Signal lässt sich mit dem rot-fluoreszierenden Signal der filamentösen, mit Mitotracker Red gefärbten Mitochondrien in der Überlagerung

nicht in Einklang bringen. Diese Befunde deuten eine cytoplasmatische Lokalisation des PaMTH1-Fusionsproteins in diesen beiden Altersstadien an. Im Gegensatz dazu zeigt das grüne Signal in einigen Hyphen im seneszenten Stadium der Transformanten ein punktiertes Muster. Dieses Bild deckt sich im überlagerten Bild mit den Signalen der rot gefärbten fragmentierten Mitochondrien der seneszenten Stämme. Diese Daten sprechen dafür, dass in den seneszenten Transformanten zum Teil eine mitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins vorliegt. Mit Hilfe von Westernblot-Analysen wurde diese mitochondriale Lokalisation des Fusionproteins in den seneszenten Transformanten verifiziert. Dazu wurden mitochondriale und cytoplasmatische Proteine in einem 12 %igem Acrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert, die mit einem GFP-Antikörper hybridisiert wurde. Dieser Antikörper detektiert das 54 kDa große Fusionsprotein (PaMTH1 besitzt eine Größe von 27 kDa, freies GFP ebenfalls) in den jungen und mittelalten Stadien der untersuchten Transformanten nur im Cytoplasma und nicht in den Mitochondrien (Abb. 26 B). Im Gegensatz dazu wird im seneszenten Pilz das GFP-Fusionsprotein im Cytoplasma und in den Mitochondrien identifiziert. Als Kontrolle für die Reinheit der analysierten fraktionierten Proteinproben und als Ladekontrolle wurden die Membranen mit einem Antikörper gegen Cytochrom c als Marker für mitochondriale Proteine und  $\beta$ -Aktin als Marker für die cytoplasmatische Proteinfraction hybridisiert. Das Cytochrom c wird nur in der mitochondrialen Fraktion und nicht in den analysierten cytoplasmatischen Proteinen detektiert, während das  $\beta$ -Aktin nur in der cytoplasmatischen Fraktion und nicht in den Mitochondrien gefunden wird. Dies bedeutet, dass das in den Mitochondrien der alten Transformanten gezeigte PaMTH1 nicht aufgrund einer cytoplasmatischen Verunreinigung der mitochondrialen Proben detektiert wurde.



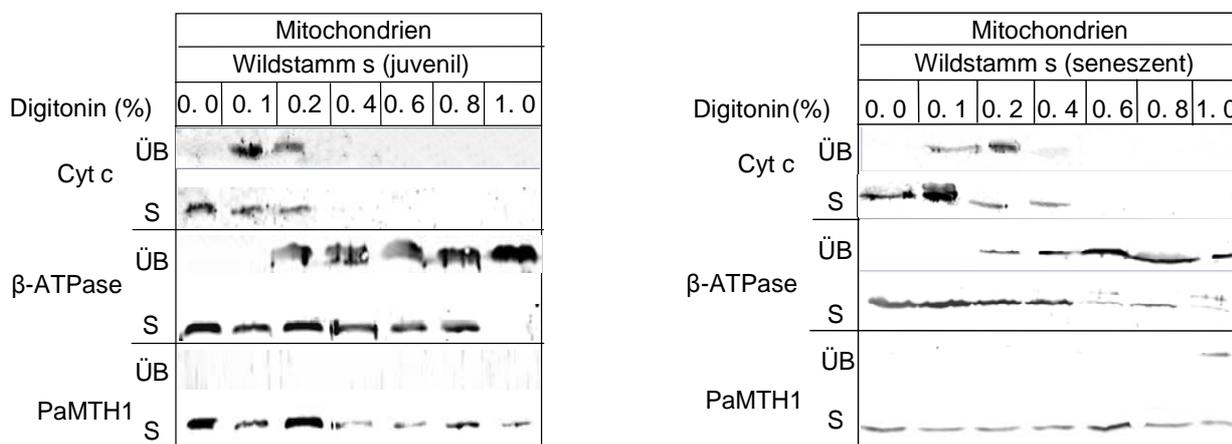
**Abb. 26: Verifizierung der mitochondrialen Lokalisation von PaMTH1.** (A) CLSM-Aufnahmen von PaMTH1-GFP bildenden Transformanten. Im juvenilen und mittelalten Stadium ist das grün fluoreszierende Fusionsprotein (PaMTH1/GFP) in den Hyphen der transgenen Stämme gleichmäßig verteilt und kann nicht mit dem Bild der „MitoTracker Red“-gefärbten Mitochondrien überlagert werden. Das PaMTH1-Fusionsprotein zeigt in einigen Hyphen des seneszenten Stammes die punktierte Verteilung der fragmentierten, abgekugelten mit „MitoTracker Red“ gefärbten Mitochondrien. Diese Befunde deuten eine mitochondriale Lokalisation des Fusionsproteins an. Die Maßstabsbalken geben eine Länge von 2  $\mu$ m an. (B) Verifizierung der mitochondrialen Lokalisation und des seneszenzspezifischen Anstiegs der PaMTH1-Menge in den Mitochondrien des *P. anserina* Wildstammes. In Westernblot-Analysen von Cytoplasma- und Mitochondrien-Proben aus den juvenilen und mittelalten transgenen Stämmen wird das 54 kD große Fusionsprotein mit einem GFP-Antikörper im Cytoplasma identifiziert. Nur im seneszenten Stamm wird es in der mitochondrialen Proteinprobe nachgewiesen. Als Lade- und Reinheitskontrolle der mitochondrialen Fraktion wurde ein Antikörper gegen Cytochrom c (Cyt c) verwendet. Als Kontrolle für die Cytoplasmafraktion wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin gewählt. In einer Westernblot-Analyse mit je 10  $\mu$ g mitochondrialen Proteinen aus einem juvenilen Wildstamm und dem entsprechenden seneszenten Isolat mit einem Antikörper gegen PaMTH1 wird das Protein in der Mitochondrienprobe im juvenilen (juv) und seneszenten Stadium detektiert. Die densitometrische Quantifizierung von vier unabhängigen Westernblots zeigt einen etwa zweifachen Anstieg der PaMTH1-Menge im seneszenten Stadium. Die Balken geben den Standardfehler an. Als Ladekontrolle der mitochondrialen Proteine wurde ein Antikörper gegen Porin verwendet. Das Cytoplasma-lokalisierte  $\beta$ -Aktin wird mit dem entsprechenden Antikörper nur im Cytoplasma (Submitochondrialer Überstand=ÜB) und nicht in den Mitochondrienfraktionen detektiert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz).

Die mitochondriale Lokalisation des nativen Proteins ohne GFP wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse verifiziert, die mit mitochondrialen Proteinen aus juvenilen und seneszenten Wildstämmen durchgeführt wurde und einem Antikörper gegen PaMTH1 (Abb. 26 B). Anhand der Ergebnisse wird sichtbar, dass das native PaMTH1-Protein im Gegensatz zu dem GFP-Fusionsprotein ebenfalls in den Mitochondrien des jungen Wildstammes

detektiert wird. Auch in den Mitochondrien des alten Wildstammes wird im Vergleich zum jungen Stadium, wie in den Gesamtproteinproben (s. Abb. 23), eine höhere Menge PaMTH1 identifiziert (2, 5 fach). Die Detektion von PaMTH1 in den mitochondrialen Proben aus dem juvenilen Wildstamm und das Fehlen des Fusionproteins in den Mitochondrien der juvenilen Transformanden stellen hier einen Gegensatz dar.

Anhand dieser Ergebnisse wurde die mitochondriale Lokalisation von PaMTH1 verifiziert, die submitochondriale Lokalisation von PaMTH1 wurde mit Hilfe dieser Analysen jedoch nicht aufgedeckt. Außerdem zeigen diese Analysen ein gegensätzliches Ergebnis in Bezug auf die mitochondriale Lokalisation von PaMTH1 im juvenilen Stadium. Um diese Fragen zu klären, wurde ein sogenannter „Digitonin-Assay“ (Hartl et al., 1986) mit frisch isolierten, nicht über einen Saccharose-Gradient aufgereinigten Mitochondrien aus jungen und alten Wildstämmen durchführt (s. Abb. 27). Je 100 µg Mitochondrien werden in dieser Analyse mit ansteigenden Mengen des milden Detergens Digitonin solubilisiert und anschließend durch Zentrifugation in Überstand- und Sediment-Fraktion getrennt. Bei einer sehr geringen Digitoninkonzentration werden erst einmal die Proteine der äußeren Membran aus den Mitochondrien herausgelöst. Die solubilisierten Proteine und zusätzlich Proteine des Intermembranraums befinden sich nach einer Zentrifugation im Überstand. Bei den sukzessiv ansteigenden Digitoninkonzentrationen werden schließlich immer mehr Proteine der inneren Mitochondrienmembran solubilisiert und befinden sich nach der Zentrifugation im Überstand, Matrixproteine bleiben dagegen im Sediment. Mit Hilfe von Westernblot-Analysen, in denen die Sedimente mit den nicht-solubilisierten und die Überstände mit den solubilisierten Proteinen in Acrylamidgelen aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert werden, wird die Solubilisierung der Mitochondrien mit Antikörpern gegen Markerproteine aus den submitochondrialen Fraktionen Intermembranraum, innere Mitochondrienmembran und Matrix überprüft. Durch den Vergleich mit den Signalen, die der PaMTH1- Antikörper zeigt, wird auf diese Weise die submitochondriale Lokalisation der Methyltransferase gezeigt. Als Markerprotein für die Proteine des Intermembranraumes wurde das Cytochrom c gewählt. Dieses Protein wird nach der Zentrifugation der unbehandelten Mitochondrien (0% Digitonin) nur im Sediment und nicht im Überstand detektiert. Dies bedeutet, dass die Mitochondrien nach der Aufreinigung mittels differentieller Zentrifugation (s. Methoden) über eine intakte äußere Membran verfügen. Das Cytochrom c wird schon bei Digitonin-Konzentrationen von 0,1 – 0,2 % aus den Mitochondrien herausgelöst und wird von dem entsprechenden Antikörper nach der Zentrifugation im Sediment, aber vor allem auch im Überstand detektiert. Bei höheren Digitoninkonzentrationen wird es weder im Sediment, noch im Überstand

detektiert. Das Markerprotein für die innere Mitochondrienmembran, die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase wird bei Digitoninkonzentrationen von 0 % bis 0,1 % nur im Sediment und nicht im Überstand detektiert und die Menge der herausgelösten, im Überstand detektierten ATPase nimmt mit ansteigender Digitoninkonzentration zu.



**Abb. 27: Analyse der submitochondrialen Lokalisation von PaMTH1 in juvenilem und seneszentem Wildstamm s.** Nach der Solubilisierung von je 100  $\mu$ g Mitochondrien mit den angegebenen Konzentrationen Digitonin wurden diese mittels Zentrifugation in Überstand und Sediment aufgetrennt. Die solubilisierten Proteine im Überstand wurden gefällt, resuspendiert und zusammen mit den ungelösten, resuspendierten Proteinen aus den Sedimenten mittels Westernblot-Analysen untersucht. Das Markerprotein für die Proteine des Intermembranraumes Cytochrom c (Cyt c) wurde nach der Zentrifugation der unbehandelten Mitochondrien (0% Digitonin) nur im Sediment (S) und nicht im Überstand (ÜB) detektiert. Dies zeigt, dass die unbehandelten Mitochondrien intakt vorlagen. Schon bei Digitonin-Konzentrationen von 0,1 – 0,2 % wird es aus den Mitochondrien herausgelöst und bei höheren Digitoninkonzentrationen weder im Sediment, noch im Überstand detektiert. Das Markerprotein für die innere Mitochondrienmembran, die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase wird bei Digitoninkonzentrationen von 0 % bis 0,1 % nur im Sediment detektiert. Die Menge der im Überstand detektierten ATPase nimmt mit ansteigender Digitoninkonzentration zu. Im Gegensatz dazu wird die Methyltransferase mit dem Antikörper bei allen getesteten Digitoninkonzentrationen nur im Sediment und nicht im Überstand detektiert. Dies deutet an, dass das PaMTH1- Protein nicht aus den Mitochondrien herausgelöst werden kann, weil es sich in der mitochondrialen Matrix befindet (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

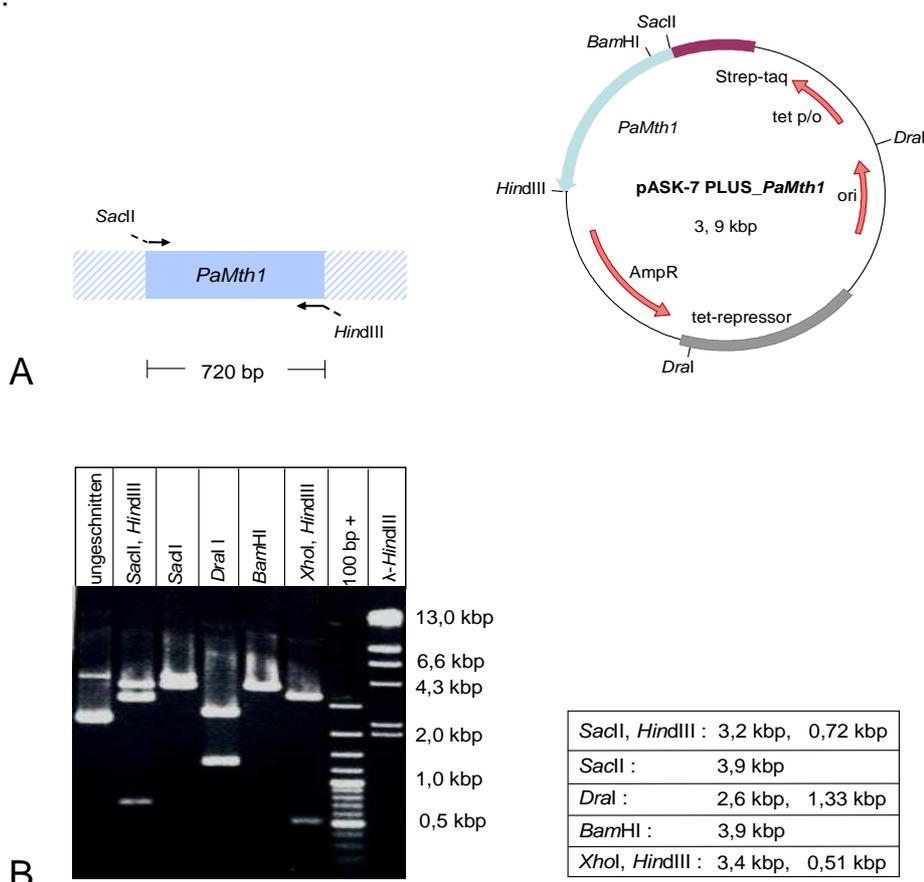
Im Gegensatz dazu wird die Methyltransferase mit dem Antikörper bei allen getesteten Digitoninkonzentrationen nur im Sediment und nicht im Überstand detektiert. Dies bedeutet, dass PaMTH1 nicht aus den Mitochondrien herausgelöst werden kann, weil es sich sehr wahrscheinlich in der mitochondrialen Matrix befindet. Die in diesem Kapitel der Arbeit vorgestellten Analysen bestätigen somit die mitochondriale Lokalisation von PaMTH1, einem Protein, das keine erkennbare mitochondriale Eintransportsequenz besitzt und erstmals durch die Identifizierung in 2D-Gelen mit aufgetrennten mitochondrialen Proben mit den Mitochondrien in Verbindung gebracht wurde.

#### 5. 2. 4 Heterologe Expression von PaMTH1 zur Untersuchung der Substratspezifität von PaMTH1

Wie bereits in Kap. 5. 2. 1 dargestellt wird, lässt sich PaMTH1 aufgrund seiner Größe und der Homologie mit anderen Methyltransferasen in die erste Klasse der Methyltransferase-Proteinfamilie einordnen. Eine Untergruppe dieser Klasse I-Methyltransferasen methyliert in Pflanzen die Lignin-Vorstufe Caffeoyl-CoA (Busam et al., 1997) eine andere Untergruppe, z. B. die COMT im menschlichen Gehirn, ist am Abbau von Dopamin beteiligt und methyliert L-DOPA im zentralen Nervensystem vieler Säuger. Dies zeigt, dass die Art des Substrates, das methyliert wird, direkt mit der Funktion der jeweiligen Methyltransferase *in vivo* zusammenhängt. Im Stammbaum (s. Abb. 21) wird PaMTH1 aufgrund seiner Sequenzhomologie in die Nähe dieser pflanzlichen Methyltransferasen eingeordnet. Dies scheint nicht erklärbar, da Ascomyceten keine Ligninbiosynthese ausführen. Obwohl diese Untergruppe der Klasse I-Methyltransferasen lange Zeit als sehr eingeschränkt galt, deuten neuere Analysen darauf hin, dass von einigen pflanzlichen Methyltransferasen auch andere Substrate akzeptiert werden (s.o.). Diese Befunde deuten an, dass diese Enzyme unter Umständen auch andere Aufgaben als die Ligninsynthese ausüben könnten.

Mit dem Ziel, die Substratspezifität von PaMTH1 zu analysieren, wurde ein „strep-tag“-PaMTH1-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert und nach Aufschluss der Zellen über eine Strep-Tactin-Säule aufgereinigt. Mit dem aufgereinigten Protein wurde die Spezifität von PaMTH1 für verschiedene Substrate innerhalb eines photometrischen Aktivitätstests untersucht. Zur heterologen Expression in *E. coli* wurde das 720 Bp große Gen von *PaMth1* innerhalb einer PCR mit cDNA aus jungen *P. anserina*-Wildstämmen als Matritze amplifiziert. Dieses PCR-Produkt ist kleiner als das PCR-Produkt mit genomischer DNA als Matritze, da in der cDNA ein Intron von *PaMth1* fehlt. Für die Amplifikation wurden die Oligonukleotide Strep-*SacII*-for und Strep-*HindIII*-rev verwendet, die am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *SacII* und am 3'-Ende eine Schnittstelle für das Enzym *HindIII* einführen. Das entstandene, aufgereinigte PCR-Produkt wurde nach der Restriktion mit diesen beiden Enzymen in den ebenso restringierten Vektor pASK-7Plus kloniert. Das Expressionsplasmid pASK-7Plus enthält den offenen Leserahmen für den sogenannten sehr kleinen „strep-tag“ unter der Kontrolle eines mit Anhydrotetrazyklin in den *E. coli*-Zellen induzierbaren Promotors, außerdem befindet sich auf dem Vektor eine Ampicillin-Resistenz-Kassette zur Selektion in *E. coli*. Zur Vermeidung einer Bildung des Fusionsproteins unter nicht-induzierten Umständen, enthält das Expressionsplasmid ebenfalls einen konstitutiv exprimierten Tetrazyklin-Repressor. Nach der Ligation des Vektors mit der

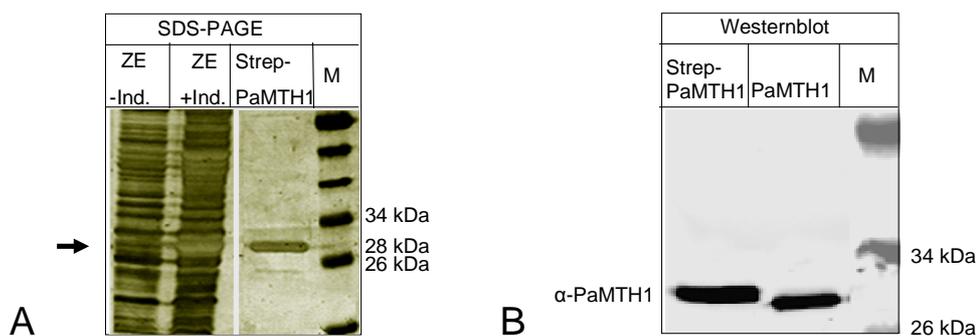
aufgereinigten, restringierten cDNA wurde das Ligat in kompetente Zellen des *E. coli* Stammes XL1Blue transformiert. Mit Hilfe der Selektion von resistenten Kolonien auf Ampicillin-LB-Medium, einer Plasmid-Isolierung und einer anschließenden Testrestriktion wurde ein Klon identifiziert, der das gewünschte Plasmid enthielt. Nach der Midi-Präparation dieses Plasmids aus dem Klon wurde die richtige Basenabfolge in dem Expressionsplasmid pASK-7 PLUS\_*PaMth1* mit Hilfe von Testrestriktionen und Sequenzierungen verifiziert (s. Abb.28).



**Abb. 28: Konstruktion eines Vektors zur Herstellung eines „strep-tag“-PaMTH1-Fusions-Protein bildenden *E. coli*-Stammes.** (A) Zur PCR-Amplifikation von *PaMth1* mit cDNA aus einem juvenilen *P. anserina*-Stamm als Matritze wurden die Oligonukleotide Strep-*SacII*-for und Strep-*HindIII*-rev eingesetzt. Das Amplifikat hat eine Länge von 720 Bp. Auf der rechten Seite wird eine schematische Darstellung des Plasmids pASK-7Plus\_*PaMth1* gezeigt. Die Klonierungsschnittstellen sind in der Karte angegeben. Außerdem sind die Ampicillin-Resistenzkassette (*AmpR*), der induzierbare Promotor (*tet p/o*), der konstitutive Tetrazyklin (*tet*)-Repressor und der „strep-tag“ am 5'-Ende von *PaMth1* angegeben. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Kontrollrestriktionen von pASK-7Plus\_*PaMth1* in einem 1% Agarose-TAE-Gel. (jeweils 400 ng) mit den Restriktionsendonukleasen *SacII/HindIII*, *SacII*, *DraI*, *BamHI* und *XhoI/HindIII*. In der Tabelle sind die bei den Restriktionen entstehenden Fragmente angegeben. Das Enzym *SacII* in den Spuren 2 und 3 hat nur teilweise geschnitten. Die korrekte Sequenzabfolge des Plasmids wurde anschließend mittels Sequenzierungen verifiziert. Als Größenstandards wurden 250 ng des Standards 100 Bp+ (MBI Fermentas) und 250 ng  $\lambda$  *HindIII* (MBI fermentas) verwendet.

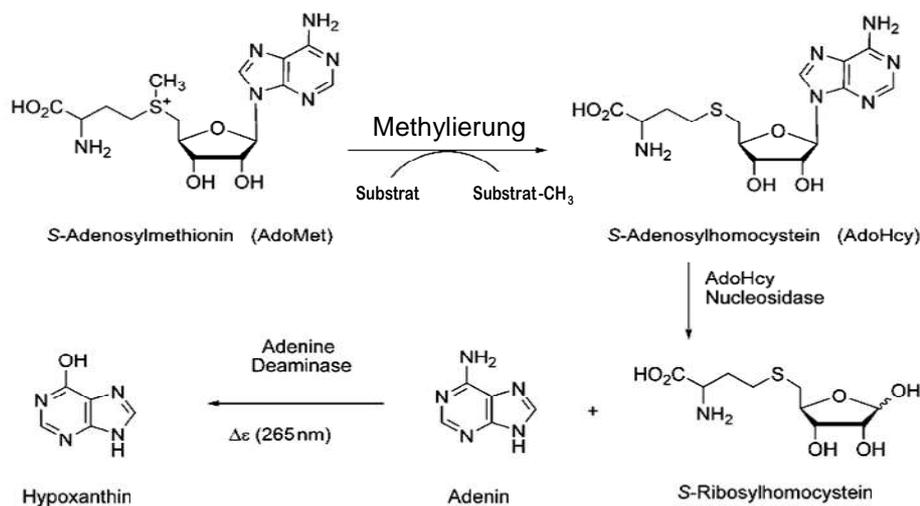
Der transgene Bakterienstamm wurde in einer 150 ml-Kultur angezogen und mit einer optischen Dichte von 0,5-0,6 bei einer Wellenlänge von 550 nm wurde die Transkription des „strep“-*PaMth1*-Fusionsgenes mit Anhydrotetrazyklin für drei Stunden induziert. Nach dem

Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall wurde der Zellextrakt zur Aufreinigung auf eine Strep-Tactin-Säule gegeben. Durch die Bindung des „strep-tag“-Fusionsproteins an das Säulenmaterial, wurde nach der Elution mit Elutionspuffer mit Desthiobiothin eine Gesamtmenge von etwa 200 µg des Fusionsproteins in ca. 1,0 ml Elutionsvolumen isoliert. Zur Kontrolle der Induktion der Expression des Fusionsgenes in dem Bakterienstamm wurde ein Aliquot des Gesamtzellextraktes, das vor der Induktion entnommen wurde und ein Aliquot des Gesamtzellextraktes, das danach entnommen wurde, auf einem 12 %igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, das anschließend mittels Silberfärbung gefärbt wurde. Auf diesem Gel wurden ebenfalls 10 µl des isolierten „strep“-Fusionsproteins aufgetrennt, um die Reinheit der Elutionsfraktion zu überprüfen. Beim Vergleich des Bandenmusters des Extraktes der nicht-induzierten *E. coli*-Zellen mit dem Extrakt aus den induzierten Zellen ist eine zusätzliche Bande in der Größenordnung von ca. 28 kDa zu sehen (s. Abb. 29 A). Diese Größe entspricht den Erwartungen für die Größe des Fusionsproteins, das aus der 27 kDa großen Methyltransferase und dem etwa 1 kDa großen „strep-tag“ besteht. In der aufgetrennten Elutionsfraktion ist nur diese Bande zu sehen (s. Abb. 29 A). In einer Westernblot-Analyse, die mit einem PaMTH1-Antikörper durchgeführt wurde, wird gezeigt, dass es sich bei dem eluierten Protein um die Methyltransferase handelt, denn sie wird von dem Antikörper detektiert. Im Vergleich dazu ist das zur Kontrolle ebenfalls detektierte PaMTH1 in aufgetrenntem *P. anserina*-Gesamtprotein-Extrakt auf der gleichen Membran etwas kleiner (s. Abb. 29 B).



**Abb. 29: Heterologe Expression eines „strep-tag“-PaMTH1-Fusionsproteins in *E. coli*.** (A) Gelelektrophoretische Auftrennung von Zellextrakten des *E. coli*-Stammes, der das Plasmid pASK-7Plus\_PaMth1 trägt und des affinitätsgereinigten Fusionsproteins „strep“-PaMTH1. Je ein Milliliter wurde aus der 150 ml-Kultur vor (ZE-Ind.) und nach der Induktion (ZE+Ind.) mit Anhydrotetrazyklin entnommen und nach einer Zentrifugation in 10 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Diese Proben wurden zusammen mit 10 µl des aufgereinigten rekombinanten Fusionsproteins in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Silberfärbung gefärbt. In der induzierten Kultur ist eine zusätzliche Bande sichtbar (Pfeil), die mit der Größe des aufgereinigten Proteins übereinstimmt (28 kDa). In der Elutionsfraktion ist nur das Fusionsprotein enthalten. Als Standard wurden 5 µl des „prestained protein standard #671“ (Invitrogen) verwendet. (B) Westernblot-Analyse des eluierten Fusionsproteins und eines Gesamtproteinsextraktes aus *P. anserina* mit einem Antikörper gegen PaMTH1 (α-PaMTH1). Das detektierte Fusionsprotein zeigt im Vergleich zu dem PaMTH1-Protein im *P. anserina* Gesamtprotein ein größeres Molekulargewicht, das durch den angehängten „tag“ begründet ist.

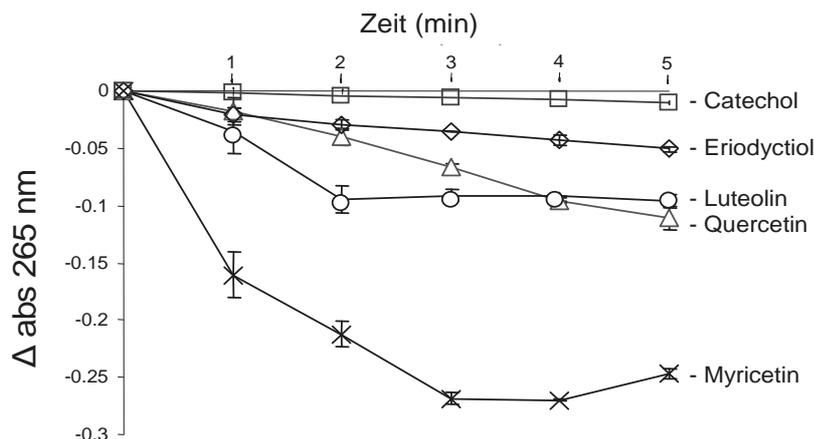
Mit diesem aufgereinigten PaMTH1-Protein wurde in einem photometrischen Aktivitätstest für Methyltransferasen die Substratspezifizität mit unterschiedlichen Substraten getestet, von denen bekannt ist, dass sie von anderen Methyltransferasen akzeptiert werden. Bei diesem Test handelt es sich um einen sogenannten gekoppelten Aktivitätstest für S-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige Methyltransferasen. Die erste Reaktion, die innerhalb des Testes geschehen muss, ist die Methylierung des angebotenen Substrates und die daraus resultierende Umwandlung des SAM in S-Adenosylhomocystein (s. Abb. 30), dieses bildet das Substrat des zweiten Enzyms, das innerhalb des Testes zum Einsatz kommt: die Nucleosidase, die das S-Adenosylhomocystein in S-Ribosylhomocystein und Adenin spaltet. Daraufhin wandelt die Deaminase, das dritte eingesetzte Enzym im Test, das Adenin durch Abspaltung einer Aminogruppe in Hypoxanthin um. Diese Umwandlung von Adenin in Hypoxanthin ist nur möglich, wenn die Methyltransferase das Substrat akzeptiert hat, den eingesetzten Methyltdonor S-Adenosyl-Methionin also genutzt und in S-Adenosylhomocystein umgewandelt hat. Die Abnahme der Adeninkonzentration, die durch die Umwandlung in Hypoxanthin begründet ist, wird bei einer Wellenlänge von 265 nm in einem „Multiplate-Reader“ in Form einer Absorptionsabnahme photometrisch gemessen.



**Abb. 30: Reaktionsschema des gekoppelten photometrischen Aktivitätstests zur Bestimmung einer Methyltransferase-Aktivität.** Bei der Methylierung, die von der getesteten Methyltransferase katalysiert wird, wird der Methyltdonor S-Adenosyl-Methionin in S-Adenosyl-Homocystein (AdoHcy) umgewandelt, das das Substrat des zweiten Enzyms im Test darstellt: die AdoHcy-Nucleosidase. Diese spaltet das S-Adenosylhomocystein in S-Ribosylhomocystein und Adenin. Das gebildete Adenin wird anschließend von der Adenin-Deaminase zum Hypoxanthin deaminiert. Die Abnahme der Konzentration des Adenins, das nur bei einer stattgefundenen Methylierungsreaktion zu Beginn des Testes gebildet wird, kann im Rahmen einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 265 nm verfolgt werden (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz).

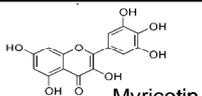
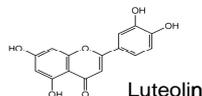
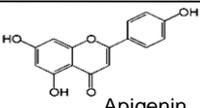
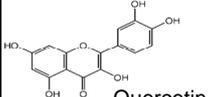
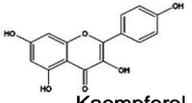
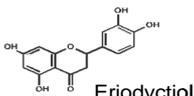
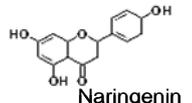
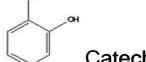
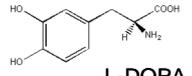
Je stärker die Absorptionsabnahme ist, desto höher ist die Spezifizität der Methyltransferase für das getestete Substrat. Die Substratspezifizität von PaMTH1 wurde in dem Aktivitätstest

jeweils mit 4  $\mu\text{g}$  des Fusionsproteins über fünf Minuten und verschiedenen Flavonoiden und Catechol getestet. Anhand der graphischen Auswertung wird deutlich, dass PaMTH1 Catechol sehr schlecht methyliert, das Flavonoid Myricetin wird dagegen bevorzugt methyliert. Auch das Quercetin, das Luteolin und das Eriodyctiol werden methyliert. Quercetin und Luteolin wesentlich besser akzeptiert als das Eriodyctiol (s. Abb. 31). Die beiden gemessenen Absorptionsabnahmen der Substrate Luteolin und Quercetin sind relativ ähnlich.



**Abb. 31: Gemessene Absorptionsabnahmen in einem gekoppelten Methyltransferase-Aktivitätstest mit dem rekombinanten PaMTH1 und verschiedenen Substraten.** Über eine Zeit von fünf Minuten wurde die Methylierungs-Aktivität von je 4  $\mu\text{g}$  „strep“-PaMTH1 und unterschiedlichen Substraten gemessen. Aufgetragen ist jeweils die Differenz aus der aufgenommenen Absorptionsabnahme mit Methyltransferase und Substrat und einem Kontrollansatz ohne Enzym. Myricetin wird am besten methyliert, Catechol am schlechtesten. Auch für Eriodyctiol zeigt PaMTH1 keine große Spezifität. Die beiden Flavonoide Quercetin und Luteolin werden dagegen gut methyliert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz).

Im Gegensatz dazu konnten keine Absorptionsabnahmen mit den Substraten Thiophenol, Apigenin, Kaempferol, Naringenin und überraschend auch nicht mit L-DOPA gemessen werden (Tab. 3, s. Diskussion).

Reaktion	keine Reaktion
 Myricetin	 Thiophenol
 Luteolin	 Apigenin
 Quercetin	 Kaempferol
 Eriodyctiol	 Naringenin
 Catechol	 L-DOPA

**Tab. 4: Zusammenstellung der methylierten und nicht-methylierten Substrate von PaMTH1.** Die methylierten Substrate zeigen eine Dihydroxylgruppe, den nicht-methylierten Substraten fehlt diese Eigenschaft (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

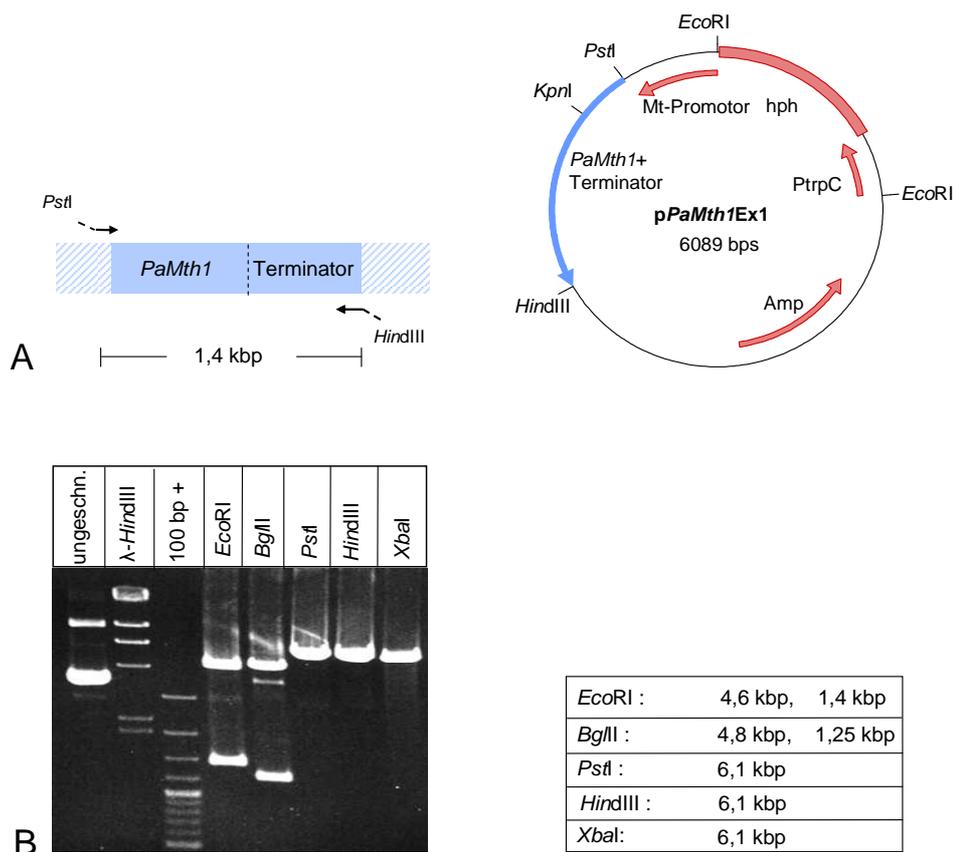
Mit Hilfe der Untersuchungen zur Substratspezifität von PaMTH1 wurde gezeigt, dass diese Methyltransferase dazu befähigt ist, Flavonoide und in geringer Menge auch Catechol zu methylieren. In dieser Eigenschaft ähnelt sie anderen Klasse I-Methyltransferasen, wie z.B. die menschliche COMT, für die ebenfalls gezeigt wurde, dass sie diese Flavonoide methylieren kann, obwohl es sich dabei nicht um das *in vivo*-Substrat handeln kann. Flavonoide werden nämlich nicht vom Menschen und auch nicht von Ascomyceten synthetisiert. Dennoch geben diese Analysen nur einen initialen Hinweis darauf, dass PaMTH1 *in vivo* unter Umständen Flavonoid-ähnliche Substrate mit sogenannten vicinalen Dihydroxygruppen methylieren könnte.

## 5. 2. 5 Überexpression von *PaMth1* in *P. anserina*

Aus den Transkript- und Proteomanalysen geht hervor, dass die PaMTH1-Menge im seneszenten Stadium von *P. anserina* deutlich ansteigt. Damit wird sicherlich auch die Methylierungsreaktion, die von dieser Methyltransferase vermittelt wird, in diesem Stadium induziert. Mit dem Ziel, die Rolle von PaMTH1 während des Alterns in *P. anserina* näher zu analysieren, also beispielweise herauszufinden, ob die Methylierung eine Schutzmaßnahme z. B. vor ROS darstellt, wurden in *P. anserina* *PaMth1*-Überexpressionsstämme hergestellt und charakterisiert.

### 5.2.5.1 Herstellung von *PaMth1*-Überexpressionstämmen

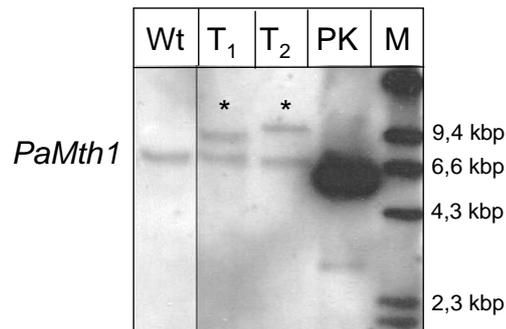
Zur Herstellung eines Vektors für die konstitutive Überexpression von *PaMth1* in *P. anserina* wurde in einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA als Matritze ein 1,4 kbp großes Fragment amplifiziert, das den offenen Leserahmen von *PaMth1* und eine 0,5 kbp Terminatorsequenz beinhaltet. Für die PCR wurden die spezifischen Oligonukleotide Mth\_Ex\_PstI\_for und Mth\_Ex\_HindIII\_re verwendet, die am 5'-Ende eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PstI* und am 3'-Ende des Fragments eine *HindIII*-Schnittstelle einführen (s. Abb.18). Nach der Restriktion des Fragments mit diesen beiden Enzymen und der Aufreinigung wurde es in das genauso geschnittene Plasmid pExMthph kloniert. Dieses Plasmid enthält die konstitutive starke Minimalpromotorregion des *P. anserina* Metallothioneins, eine Hygromycin B- Resistenzkassette zur Selektion in *P. anserina* und eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Nach der Ligation des Plasmids mit dem restringierten Fragment wurde das Ligat in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XLBlue1 transformiert. Mittels Selektion auf Ampicillin-haltigem LB-Medium und einer „Mini“-Plasmid-Präparation mit anschließender Testrestriktion wurde ein Klon identifiziert, der das gewünschte Plasmid enthielt. Aus diesem Bakterienstamm wurde das Konstrukt innerhalb einer „Midi“-Plasmid-Präparation isoliert und mit Hilfe einer Testrestriktion und Sequenzierungen überprüft (s. Abb. 32).



**Abb. 32: Konstruktion eines Vektors zur konstitutiven Überexpression von *PaMth1* in *P. anserina*.** (A) Bei der PCR-Amplifikation des 1,4 kbp großen DNA-Fragments, das den *PaMth1*-Leserahmen und eine 500 Bp Terminatorsequenz enthält, wurden die Oligonukleotide *Mth\_Ex\_PstI\_for* und *Mth\_Ex\_HindIII\_re* verwendet. An das 5'-Ende des Amplifikats wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PstI* angehängt und an das 3'-Ende eine Schnittstelle für das Enzym *HindIII*. Nach der Restriktion und Aufreinigung des PCR-Produkts und des Vektors *pExMthph* wurde eine Ligation angesetzt und das erwartete Plasmid *pPaMth1Ex* wurde anschließend in einer „Midi“-Präparation isoliert. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (=Amp) sowie eine Hygromycin-Resistenz (=hph) zur Selektion von *E. coli*- bzw. *P. anserina*-Transformanten. Das *PaMth1*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des starken Minimalpromotors des *P. anserina* Metallothionein-Gens. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Testrestriktionen von *pPaMth1Ex1* in einem 1 % igen TAE-Agarosegel. Das komplette Plasmid umfasst 6089 Bp. Die Klonierungsstellen sind in der Karte eingezeichnet, die entstehenden Fragmentgrößen der Testrestriktionen sind in der Tabelle angegeben. Als Kontrolle wurden 300 ng ungeschnittener Vektor aufgetrennt, als Größenstandards wurden je 250 ng  $\lambda$ -*HindIII* und 100Bp+-Leiter aufgetragen.

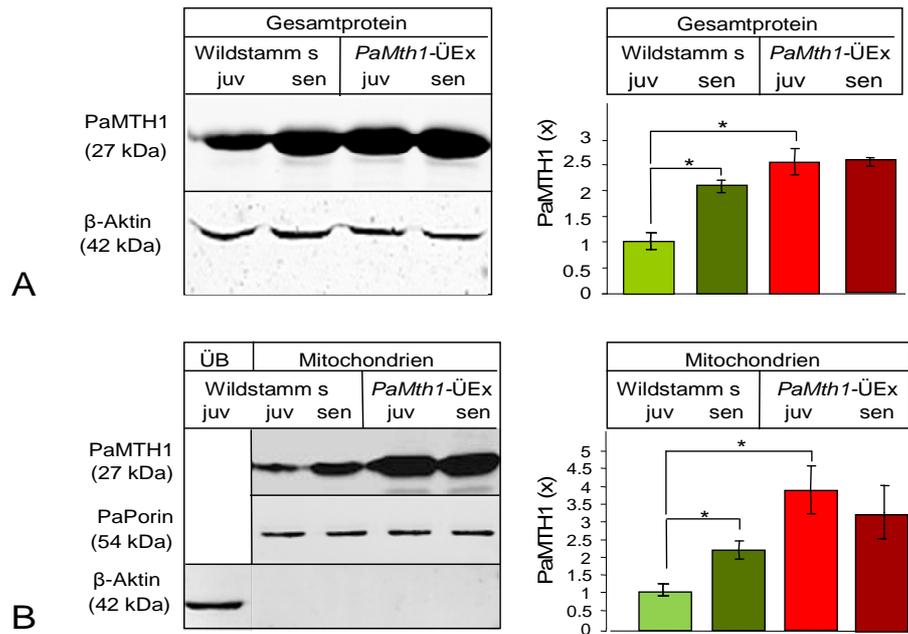
In diesem Überexpressionsvektor steht das *PaMth1*-Gen unter der Kontrolle des starken konstitutiven Metallothionein-Promotors. 10  $\mu$ g des Vektors wurden in  $1 \times 10^7$  Protoplasten des Wildstammes *s*<sup>-18261</sup> transformiert und der Transformationsansatz wurde auf Hygromycin B-haltigem Medium ausplattiert. Nach etwa 7-9 Tagen wurden resistente Transformanten erhalten, bei denen die Aufnahme des Plasmids mit Hilfe einer Southernblot-Analyse überprüft wurde. Bei dieser Analyse wurde ein DIG-markiertes *Bam*HI-Fragment aus dem Vektor *pPaMth1gfp1* als Sonde gegen *PaMth1* eingesetzt. Zwei der untersuchten Primärtransformanten haben das Plasmid jeweils einmal in ihr Genom aufgenommen (s.

Abb.33). Sie zeigen in der Southernblot-Analyse neben dem endogenen *PaMth1*-Signal jeweils ein zweites Fragment, das von der Sonde detektiert wird.



**Abb. 33: Southernblot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPaMth1Ex1* in das Genom der Transformanten *PaMth1\_ÜEx1* (T1) und *PaMth1\_ÜEx2* (T2).** Jeweils 800 ng genomische DNA des Wildstammes s (Wt) und der Transformanten wurden mit *HindIII* restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der restringierten DNA auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit einer *PaMth1*-spezifischen, DIG-markierten DNA-Sonde. Zusätzlich zu dem endogenen *PaMth1*-Fragment mit einer Größe von 6, 7 kbp zeigen die Transformanten T1 und T2 jeweils eine Einzelintegration des Plasmids (Sternchen). Als Größenstandard wurden 40 ng des DIG markierten  $\lambda$  *HindIII* (M) und als Positivkontrolle wurden etwa 10 ng des mit *HindIII* geschnittenen Plasmid *pPaMth1Ex1* aufgetragen (PK).

Durch Kreuzung der erhaltenen Primärtransformanten gegen den Wildstamm s+18260 wurden hygromycinresistente Sekundärtransformanten erhalten, mit denen alle nachfolgenden Analysen durchgeführt wurden. Anhand des Ergebnisses einer Westernblot-Analyse, in der der PaMTH1-Gehalt in Gesamtproteinproben aus juvenilen und seneszenten Wildstamm mit der PaMTH1-Menge in den Proben aus einer juvenilen und der entsprechenden seneszenten Transformante verglichen wird, wird deutlich, dass der Antikörper gegen PaMTH1 in der Gesamtprotein-Probe des seneszenten Wildstammes die 2,5 fache Menge der Methyltransferase im Vergleich zum juvenilen Wildstamm detektiert. Im Gegensatz dazu wird sowohl in den Proben aus der juvenilen *PaMth1*-Überexpressions-Transformante und aus dem seneszenten Stamm eine vergleichbare Menge detektiert (s. Abb. 34).



**Abb. 34: Nachweis der PaMTH1-Menge in Gesamtproteinen und Mitochondrien von juvenilen und seneszenten *P. anserina* *PaMth1*-Überexpressionsstämmen.** (A) Westernblot-Analyse von je 15 µg Gesamtproteinextrakt aus juvenilen und seneszenten Wildstämmen- und *PaMth1*-Überexpressionsstämmen mit Hilfe des Antikörpers gegen PaMTH1. In der Probe des seneszenten Wildstammes (sen) wird laut der densitometrischen Quantifizierung etwa doppelt soviel des 27 kDa großen Proteins detektiert wie in der Probe des juvenilen Wildstammes (juv). Dagegen wird in den Proben aus dem *PaMth1*-Überexpressionsstamm sowohl im juvenilen Stadium als auch im seneszenten Stadium eine gleichbleibend erhöhte Menge (etwa 2, 5 fach ) detektiert. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das cytoplasmatische Protein β-Aktin gewählt. (B) Detektion von PaMTH1 in mitochondrialen Proben aus juvenilem und seneszentem Wildstämmen und juvenilem und seneszentem *PaMth1*-Überexpressionsstämmen. In den Mitochondrien des seneszenten Wildstammes wird eine etwa zweifach erhöhte Menge PaMTH1 im Vergleich zum juvenilen Stamm von dem PaMTH1-Antikörper detektiert. Sowohl im juvenilen Stadium als auch im seneszenten Stadium des *PaMth1*-Überexpressionsstammes sind deutlich erhöhte PaMTH1-Mengen vorhanden. Als Ladekontrolle für die mitochondrialen Proteine wurde ein Antikörper gegen Porin verwendet, als Reinheitskontrolle wurde die Membran mit dem Antikörper gegen das cytoplasmatische β-Aktin hybridisiert. Als Positivkontrolle für diesen Antikörper wurden 15 µg Cytoplasma (ÜB) aus einem juvenilen Wildstamm im gleichen Gel aufgetrennt (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

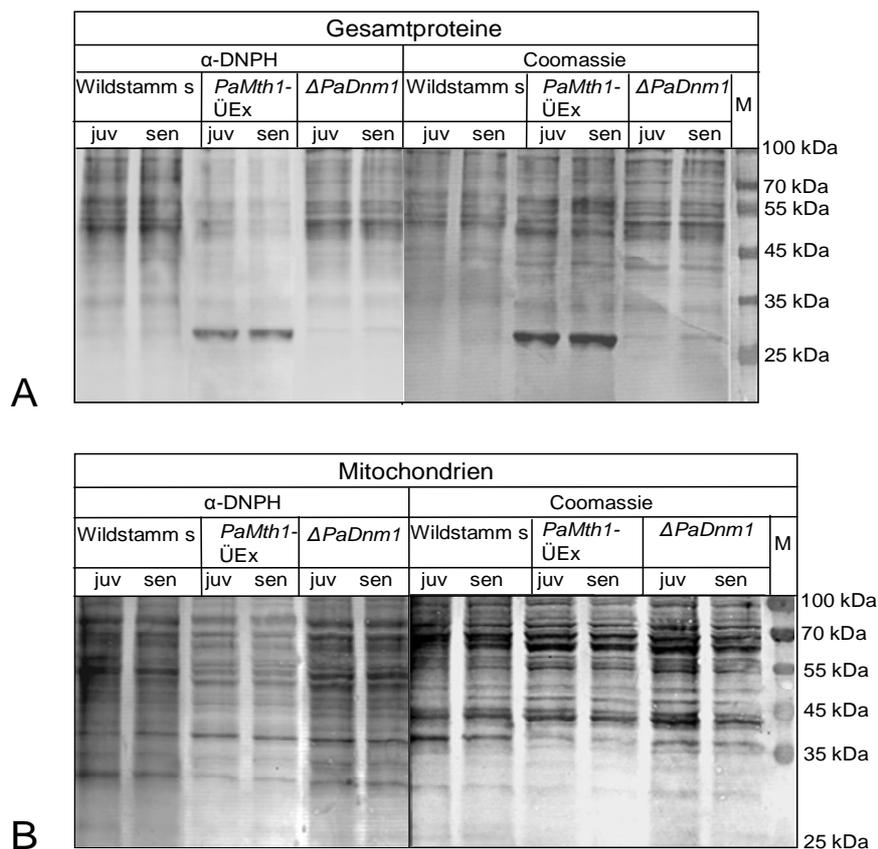
Zwischen den PaMTH1-Mengen im Gesamtprotein aus dem seneszenten Wildstamm, dem juvenilen Überexpressionstransformant und dem entsprechenden seneszenten transgenen Stamm wird zusätzlich mit Hilfe einer densitometrischen Quantifizierung kein signifikanter Unterschied identifiziert. In den mitochondrialen Proteinproben aus den gleichen Stämmen werden ähnliche PaMTH1-Mengenverhältnisse detektiert (s. Abb. 34). Die Überexpression des *PaMth1*-Gens, die während der gesamten Lebensspanne eine konstitutiv erhöhte Menge von PaMTH1 sowohl im Gesamtprotein als auch in mitochondrialen Proteinen bewirken sollte, wurde somit anhand der Ergebnisse der Westernblot-Analysen verifiziert.

### 5.2.5.2 Charakterisierung der *PaMth1*-Überexpressionstransformanten

Wie in der Einleitung dargestellt wird, können Flavonoide, die eine benachbarte Dihydroxylgruppe besitzen, z. B. durch die Reaktion mit Metallionen zu cytotoxischen Verbindungen reagieren. In einem solchen Fall entstehen z. B. Semichinone, die Proteine oder andere Zellbestandteile schädigen können. In einigen Analysen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Methylierung dieser Flavonoide an einer oder an beiden Hydroxygruppen diese prooxidative Wirkung verhindern kann (s. o.). Eine Folge oxidativer Schäden an Proteinen ist die Entstehung von Carbonylgruppen an den Carboxylgruppen der Proteinseitenketten (s. Einleitung). Diese Carbonylgruppen stellen ein Merkmal für die oxidativ-bedingte Schädigung des Proteins dar. Der Nachweis und die anschließende Quantifizierung der Proteine mit Carbonylgruppen in einer Probe zeigen die oxidative Schädigung der Proteine durch die Belastung mit reaktiven Sauerstoffspezies in dem untersuchten Stamm. Zum Nachweis der Carbonylgruppen in Proteinproben des Wildstammes und des *PaMth1*-Überexpressionstammes wurde eine so genannte „Oxyblot“-Analyse durchgeführt.

#### *Quantifizierung carbonylierter Proteine mittels „Oxyblot“-Analyse*

In den ersten Untersuchungen wurden dazu je 10 µg Gesamtprotein aus einem jungen und einem alten Wildstamm, aus einem juvenilen und einem seneszenten *PaMth1*-Überexpressionstamm und aus einem jungen und alten *PaDnm1*-Deletionsstamm mit dem Reagenz Dinitrophenyl-Hydrazin (DNP) derivatisiert. DNP reagiert gezielt mit den Carbonylgruppen in den Proteinen und es bildet sich Dinitrophenyl-Hydrazone (DNPH). Nach 15 min wurde diese Reaktion abgestoppt, die Proteine in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Nach der Hybridisierung mit einem Antikörper gegen DNPH und dem entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Zweitantikörper wurden die detektierten, derivatisierten Proteine mit Hilfe des Licor-Scanners visualisiert. Anhand des Ergebnisses dieser „Oxyblot“-Analyse ist zu sehen, dass speziell in den Proteinproben aus dem juvenilen und dem seneszenten *PaMth1*-Überexpressionstransformant deutlich weniger carbonylierte Proteine detektiert werden als in den Proben aus dem Wildstamm und aus der langlebigen *PaDnm1*-Deletionsmutante. Die gleichartige Beladung des Polyacrylamid-Gels wird durch die Coomassiefärbung der Membran gezeigt (Abb. 35).



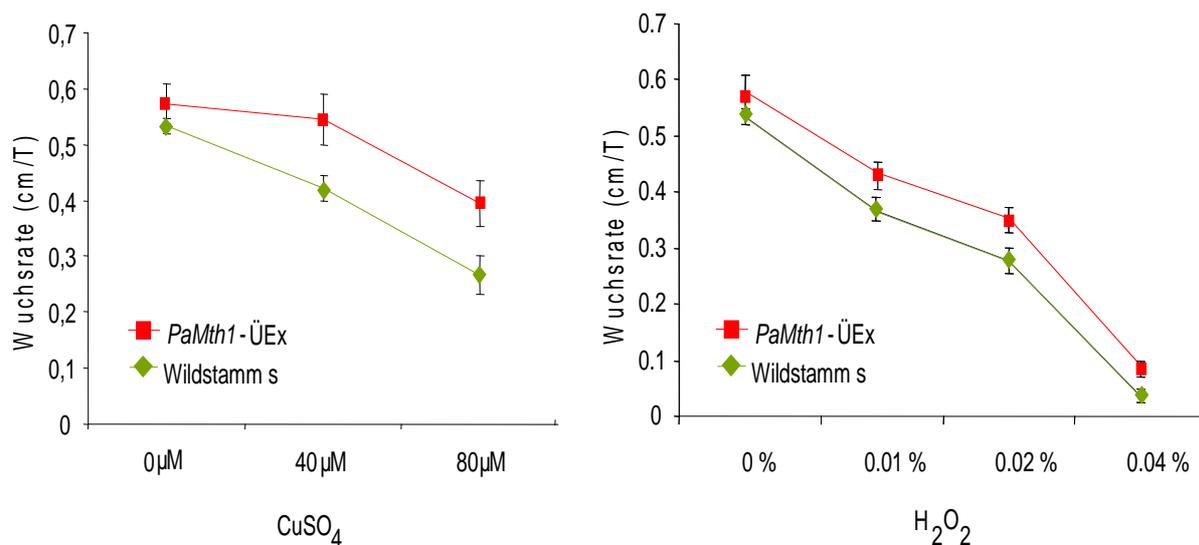
**Abb. 35: Vergleich der Menge der oxidierten Proteine der *PaMth1*-Überexpressionsstämme, des Wildstammes und der *PaDnm1*-Deletionsmutante.** (A) „Oxyblot“-Analyse von je 10 µg Gesamtproteinen aus juvenilen und seneszenten *P. anserina* Wildstämmen, *PaMth1*-Überexpressionstämmen und der langlebigen *PaDnm1*-Deletionsmutante. Vor der Auftrennung in einem 12 %igem Polyacrylamidgel wurden die Proben mit Di-nitro-Phenylhydrazin derivatisiert. Dieses reagiert mit den Carbonylgruppen zu Di-Nitrophenyl-Hydrazon, das von einem Antikörper (α-DNPH) detektiert wird. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran und der Hybridisierung mit dem Antikörper werden in den Proben der *PaMth1*-Überexpressionstämmen weniger carbonylierte Proteine als in den anderen Proben detektiert. Zur Kontrolle der Beladung des transferierten Gels wurde die Membran nach der Detektion der oxidierten Proteine mit Coomassie gefärbt. (B) Detektion carbonylierter Proteine in mitochondrialen Proben aus juvenilen und seneszenten Wildstämmen, *PaDnm1*-Deletionsstämmen und den *PaMth1*-Überexpressionstämmen. Speziell in den *PaMth1*-Überexpressionstämmen werden sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium weniger oxidierte Proteine identifiziert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

Ein ähnliches Ergebnis wird bei der Analyse der mitochondrialen Proteine aus den gleichen Stämmen sichtbar: Im Vergleich zum Wildstamm und der *PaDnm1*-Deletionsmutante ist nur in den Proteinproben aus den *PaMth1*-Überexpressionstämmen der Carbonylgehalt deutlich herabgesetzt. Die gleiche Beladung des Gels mit den mitochondrialen Proteinen, das für den „Oxyblot“ verwendet wurde, wurde durch eine nachträgliche Coomassie-Färbung der Membran verifiziert (Abb. 35). Die Befunde der beiden „Oxyblot“-Analysen zeigen deutlich, dass die Carbonylierung in den *PaMth1*-Überexpressionstämmen sowohl im Gesamtprotein als auch in den Mitochondrien herabgesetzt ist. Dies könnte eine Folge geringerer Belastungen

durch oxidative Schäden sein, die durch die konstitutiv erhöhte PaMTH1-Menge in diesen Stämmen verringert wird.

***Bestimmung der Wachsrates der PaMth1-Überexpressionsstämmen auf stress-induzierenden Medien (Wasserstoffperoxid und Kupfersulfat)***

Ein weiteres Zeichen einer Veränderung der oxidativen Belastung ist eine im Vergleich zum Wildstamm herabgesetzte Wachsrates auf Medium, das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Kupfersulfat enthält.  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt dem Pilz exogen reaktive Sauerstoffspezies zu und er wird dadurch in seinem Wachstum beeinträchtigt. Wenn z. B. die endogen produzierte Menge reaktiver Sauerstoffspezies in einem transgenen Stamm erhöht ist oder dieser Stamm in der Detoxifizierung der reaktiven Sauerstoffspezies beeinträchtigt ist, wächst dieser Pilzstamm im Vergleich zum Wildstamm langsamer und die Wachsrates pro Tag ist niedriger. Mit dem Ziel, die Wachsrates der *PaMth1*-Überexpressionsstämmen auf stress-induzierenden Medien zu testen, wurden je zwanzig, zwei Tage alte, frisch isolierte Transformanten und je 20, zwei Tage alte Wildstämmen auf Platten angeimpft, die Kupfersulfat enthielten. Zur verbesserten Vergleichbarkeit wurden dabei immer ein Wildstamm-Isolat und drei juvenile *PaMth1*-Überexpressionsstämmen auf eine Platte geimpft. Während einer fünftägigen Inkubation bei 27 °C wurde die Wachsrates täglich markiert. Am Ende der Analyse wurde die Wachsrates mittels Division der gemessenen linearen Wachsstrecke durch die Anzahl der Tage bestimmt. Es wurden  $\text{CuSO}_4$ -Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  oder 80  $\mu\text{M}$  verwendet (Abb. 36).



**Abb. 36: Wuchsraten von jungen Wildstämmen *PaMth1*-Überexpressionsstämmen auf PASM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Kupfersulphat oder Wasserstoffperoxid.** Je 20 juvenile Wildstämme (◆) und *PaMth1*-Überexpressionstransformanten (■) wurden auf PASM-Platten mit 0 μM, 40 μM oder 80 μM Kupfersulphat (CuSO<sub>4</sub>) angezogen. Nach einer fünftägigen Inkubation wurden die durchschnittlichen Wuchsraten (cm/T) bestimmt. Anhand der Ergebnisse wird ein signifikant verbessertes Wachstum der *PaMth1*-Überexpressionsstämmen beobachtet: 40 μM ( $p = 3,133e-08$ ) und 80 μM CuSO<sub>4</sub> ( $p = 4,883e-07$ ). Auch auf PASM-Platten mit 0 %, 0,01 %, 0,02 % oder 0,04 % Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ist die durchschnittliche Wuchstrate der 20 *PaMth1*-Überexpressionsmutanten im Vergleich zum Wildstamm signifikant erhöht: 0,01 % ( $p = 9,997e-06$ ); 0,02 % ( $p = 5,582e-06$ ) und 0,04 % ( $p = 4,148e-06$ ). Die Platten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden im Dunkeln inkubiert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewicz, 2008).

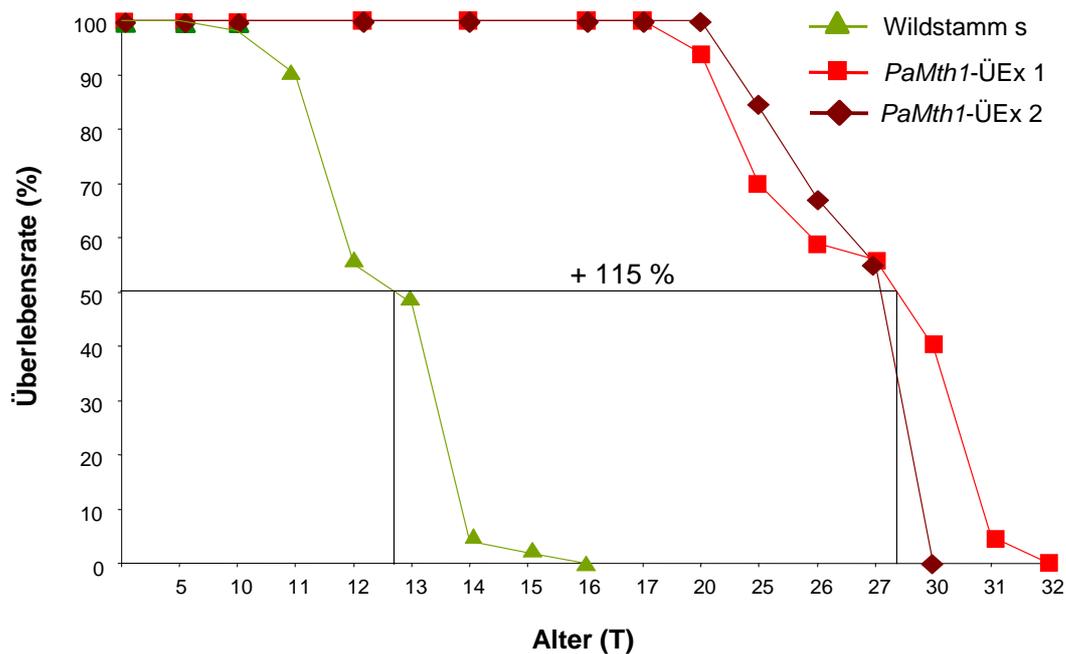
Nach der statistischen Auswertung der Ergebnisse wird deutlich, dass sich die Wuchstrate der Überexpressionsstämme unter normalen Bedingungen nicht von der Wuchstrate der Wildstämme unterscheidet, beide liegen etwa bei 0,58 cm pro Tag. Dagegen ist bei einer Konzentration von 40 μM ein signifikanter Unterschied zwischen der Wuchstrate der Mutante und des Wildstammes zu sehen. Die durchschnittliche Strecke, die die Überexpressionsstämme innerhalb eines Tages wachsen, liegt bei 0,55 cm pro Tag, die der Wildstämme nur bei 0,42 cm pro Tag. Bei einer Konzentration von 80 μM liegt die Wuchstrate der Mutanten bei einem durchschnittlichen Wert von 0,43 cm pro Tag, beim Wildstamm bei einem Wert von 0,27 cm (s. Abb. 36). Diese Wachstumstests zeigen, dass die transgenen Stämme resistenter gegen den endogenen oxidativen Stress durch das Kupfersulfat sind als der Wildstamm. Um die Resistenz dieser Stämme gegen exogenen, oxidativen Stress zu überprüfen, wurden die Wuchsraten der Überexpressionsstämme mit der Wuchstrate der Wildstämme auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Medium verglichen.

Während einer fünftägigen Inkubation bei Dunkelheit und 27 °C wurde täglich die Wuchsfrente markiert und die Wuchstrate durch die Division der gemessenen linearen Wuchsstrecke durch die Anzahl der Tage bestimmt. Diese durchschnittliche Wuchstrate wurde bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen von 0 %, 0,01 %, 0,02 % oder 0,04 % aufgenommen (s. Abb. 36).

Nach der statistischen Auswertung der Ergebnisse wird deutlich, dass sich die Wachsrates der Überexpressionsstämme bei 0 % nicht von der Wachsrates der Wildstämme unterscheidet, beide liegen etwa bei 0,58 cm pro Tag. Dagegen ist bei einer Konzentration von 0,01 % ein signifikanter Unterschied zwischen der Wachsrates der Mutante verglichen mit der Wachsrates der Wildstämme zu sehen. Die durchschnittliche Strecke, die die Überexpressionsstämme innerhalb eines Tages wachsen, liegt bei 0,45 cm pro Tag, die der Wildstämme nur bei 0,37 cm pro Tag. Bei einer Konzentration von 0,02 % liegt die Wachsrates der Mutanten bei einem durchschnittlichen Wert von 0,4 cm pro Tag, beim Wildstamm bei einem Wert von 0,3 cm. Sogar bei der höchsten getesteten Konzentration von 0,04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist ein signifikanter Unterschied zwischen der Wachsrates des Wildstammes (0,03 cm/Tag) und der Mutante (0,07 cm/Tag) sichtbar. Die Mutante zeigt entsprechend dieser Analysen eine deutlich verbesserte Wachsrates auf diesen beiden Stress-Medien.

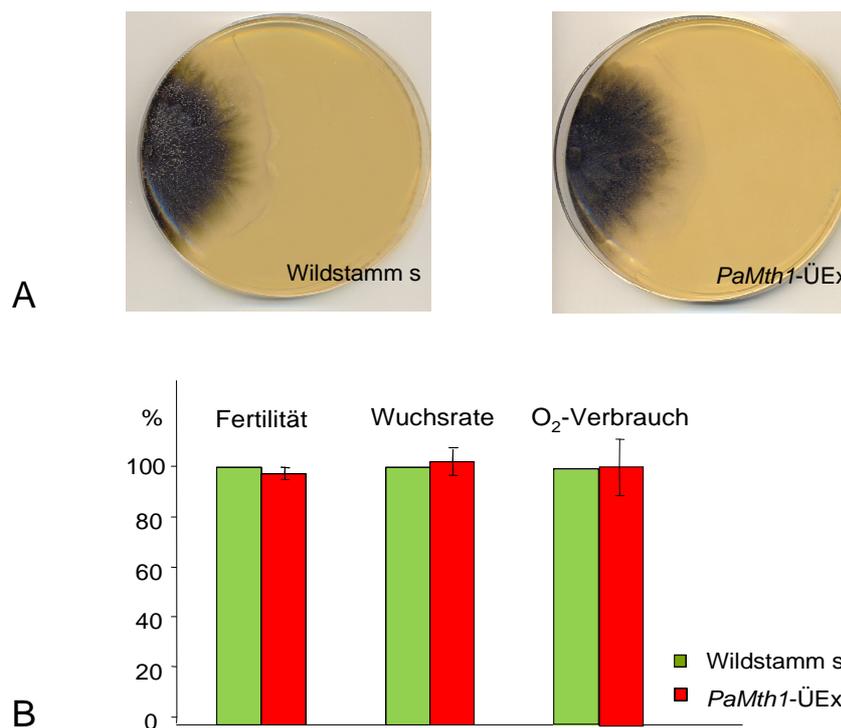
### ***Bestimmung der Lebensspanne und phänotypische Charakterisierung der PaMth1-Überexpressionsstämme***

Anhand der Befunde der Wuchstests auf den Stressmedien und der „Oxyblot“-Analysen lässt sich erkennen, dass sich der PaMth1-Überexpressionsstamm im Vergleich zum Wildstamm scheinbar in einer verbesserten physiologischen Situation befindet. Um zu untersuchen, ob sich ein allgemein verbesserter Zustand auch auf die Lebensspanne auswirkt, wurden die mittleren Lebensspannen des PaMth1-Überexpressionstammes und des Wildstammes auf PASM-Medium bestimmt und verglichen. Dazu wurden 42 frisch isolierte PaMth1-Transformanten und 50 frisch isolierte Wildstämme auf PASM-Rennrohre angeimpft und bei 27°C im Dauerlicht inkubiert. Die Wuchsfrente wurde alle zwei bis drei Tage markiert, bis das Myzel in Seneszenzmerkmale zeigte und kein lineares Wachstum mehr zu beobachten war. Die statistisch und graphisch ausgewerteten Lebensspannendaten zeigen, dass die PaMth1-Überexpressionsstämme über eine deutlich verlängerte mittlere Lebensspanne im Vergleich zum Wildstamm verfügen (s. Abb. 37). Die Transformanten leben im Durchschnitt 28 Tage, die Wildstämme nur etwa 13 Tage. Dieser Wert entspricht einer Lebensverlängerung von 115% der transgenen Stämme.



**Abb. 37: Vergleich der mittleren Lebensspannen der *PaMth1*-Überexpressionsmutanten und des *P. anserina* Wildstammes auf PASM-Medium.** Alle getesteten Isolate wurden auf Rennrohren mit 1%igem Glukosehaltigem PASM-Medium angezogen. Die Lebensspanne ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Die mittlere Lebensspanne des Wildstammes (n=50) beträgt 13 Tage, die mittlere Lebensspanne der Hygromycin-resistenten Sekundärtransformanten aus *PaMth1*-ÜEx1 (n=42) beträgt 28 Tage, die mittlere Lebensspanne der Sekundärtransformanten aus *PaMth1*-Üex2 (n=21) beträgt 27,5 Tage. Dies entspricht einer Lebensspannenverlängerung um etwa 115 % (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

Ergänzend zu diesen Daten zeigen die *PaMth1*-Überexpressionsstämme im Gegensatz zu anderen langlebigen Mutanten von *P. anserina* keinen veränderten Phänotyp oder eine geringere Wuchs-, Fertilitäts- oder Atmungsrate (s. Abb. 38).



**Abb. 38: Physiologische Charakterisierung des *PaMth1*-Überexpressionsstammes.** (A) Im Vergleich zum Wildstamm zeigt die *PaMth1*-Überexpressionsmutante keine phänotypischen Unterschiede: Die Myzelmorphologie und -pigmentierung sind vergleichbar. (B) Vergleich der Wuchsrates auf PASM-Medium ( $n =$  jeweils 20 Isolate), der Fertilität und dem Sauerstoff-Verbrauch zwischen juvenilen Isolaten des Wildstammes (rote Balken) und den *PaMth1*-Überexpressionstransformanten. Die Balken geben den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler an. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind nicht erkennbar (Wilcoxon-Test  $p > 0,05$ ). Die jeweiligen Werte des Wildstammes wurden auf 100 % gesetzt und mit den Werten der Mutante verglichen (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2008).

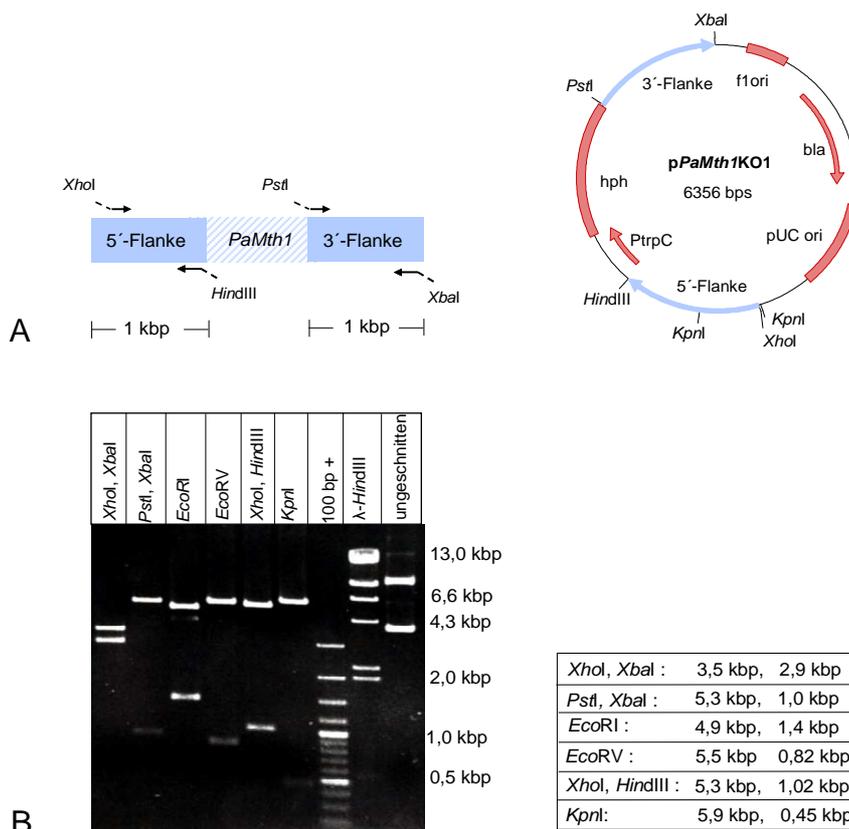
Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass es sich bei den *PaMth1*-Überexpressionsstamm um eine Mutante handelt, die sowohl über eine verlängerte Lebensspanne als auch über eine verlängerte „health span“ verfügt. Dies bedeutet, dass die Zeitspanne, in der sich der Stamm in einer guten physiologischen Situation befindet im Vergleich zum Wildstamm ebenfalls verlängert ist. Diese Verbesserungen werden wahrscheinlich durch die konstitutiv erhöhte Menge der Methyltransferase begründet, die in *P. anserina* anscheinend eine Schutzrolle gegen ROS durch die Methylierung von Substraten, die in nicht-methylierter Form in Verbindung mit Metallionen zu reaktiven Stoffen reagieren können und die Proteine oxidieren. Die endogene Belastung durch endo- und exogenen oxidativen Stress ist somit in diesen Mutanten verringert, die Proteine weniger oxidiert und die Lebensspanne des Stammes zeigt eine deutliche Verlängerung.

### 5. 2. 6 Deletion von *PaMth1* in *P. anserina*

Mit dem Ziel, die Schutzrolle, die von PaMTH1 in *P. anserina* gegen die Entstehung reaktiver Stoffe übernommen werden könnte, zu verifizieren und die vorhandenen Daten zu komplementieren, wurde eine *PaMth1*-Deletionsmutante von *P. anserina* hergestellt, die anschließend in weiteren Analysen genauer untersucht wurde.

#### 5.2.6.1 Herstellung von *PaMth1*-Deletionsmutanten

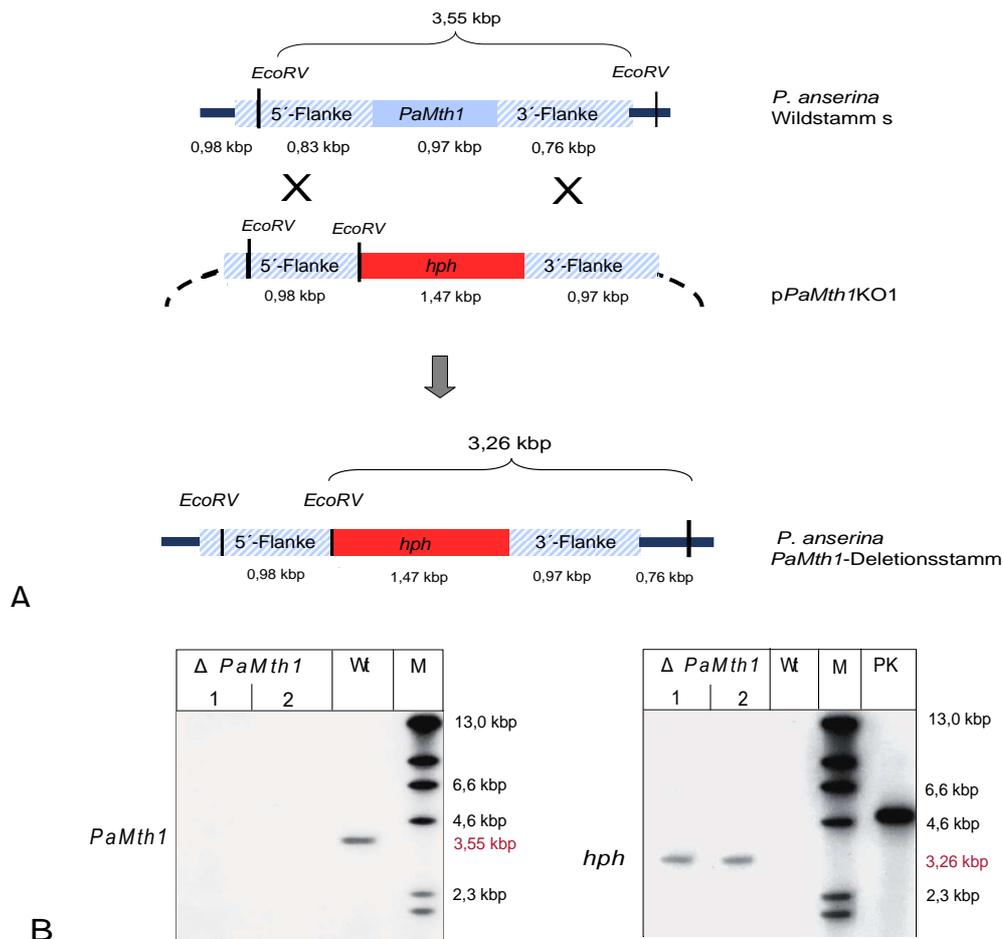
Die Deletion des *PaMth1*-Gens ist mittels homologer Rekombination mit einem Plasmid durchgeführt worden, das eine Hygromycin B Resistenzkassette enthält, die von zwei etwa 1 kbp langen homologen Sequenzen aus der 5'- und der 3'-Region von *PaMth1* umschlossen wird. Zur Konstruktion dieses Plasmids wurden mit Hilfe von PCR-Reaktionen ein 1 kbp großes DNA-Fragment aus der direkt an das *PaMth1* angrenzenden 5'-Region und ein 1 kbp großes Fragment aus der angrenzenden 3'-Region amplifiziert. Für diese PCR-Reaktionen wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, die an der 5'-Seite des Fragmentes, das strangaufwärts von *PaMth1* liegt, eine *XhoI*-Restriktionsstelle und an das 3'-Ende dieses Fragmentes eine *HindIII*-Restriktionsstelle einführen. Mit Hilfe eines zweiten Paares Oligonukleotide, das an das 5'-Ende des Fragmentes, das strangabwärts liegt, eine *PstI*-Schnittstelle und an das 3'-Ende eine *XbaI*-Restriktionsstelle anfügt, wurde das zweite Fragment amplifiziert. Nach der Restriktion der beiden aufgereinigten Fragmente mit den entsprechenden Enzymen wurden diese in den Vektor pKO7 ligiert, der mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten und aufgereinigt worden war. Dieser Vektor enthält die Hygromycin B-Resistenzkassette, die gegen das *PaMth1*-Gen ausgetauscht werden soll und zur Selektion in *E. coli* eine Ampicillinresistenzkassette. Somit wurden nach der Ligation über Nacht und der Transformation in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL-Blue 1 Ampicillin-resistente Klone erhalten. Eine Kultur des mit Hilfe einer Plasmid-Isolierung und eines anschließenden Testverdaus verifizierten Klons, der das gewünschte Plasmid enthielt, wurde für eine „Midi“-Präparation des Plasmids angezogen. Die korrekte Abfolge der DNA-Sequenz in diesem isolierten Plasmid wurde mit Hilfe von Testrestriktionen verifiziert (s. Abb. 39).



**Abb. 39: Amplifikation der *PaMth1*-Flanken und Konstruktion des Vektors *pPaMth1KO1*.** (A) Schematische Darstellung der beiden zu amplifizierenden Bereiche. Die 5'-Flanke von *PaMth1*, (ca. 1000 bp) wurde mit den Oligonukleotiden „5'-flanke for-pko7-*XhoI*“ und „5'-flanke rev-pko7-*HindIII*“ amplifiziert. Die 3'-Flanke von *PaMth1* wurde mit den Oligonukleotiden „3'-flanke-for-pko7-*PstI*“ und „3'-flanke-rev-pko7-*XbaI*“ amplifiziert. Die beiden aufgereinigten Amplifikate wurden jeweils mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und in den Vektor pKO7 kloniert. Dieser wurde vorher mit den vier Enzymen *XhoI*, *HindIII*, *PstI* und *XbaI* geschnitten und aufgereinigt. In dem isolierten Deletionsplasmid umfassen die 5'- und die 3'-Flanke von *PaMth1* die Hygromycinresistenzkassette, die in dem Stamm  $\Delta PaKu70$  das *PaMth1*-Gen mittels homologer Rekombination ersetzen soll. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Kontrollrestriktionen des Deletionsplasmids *pPaMth1KO1* mit *XhoI/XbaI*, *PstI/XbaI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *XhoI/HindIII* und *KpnI* zum Nachweis der erfolgreichen Ligation der Flanken in den Vektor. Zur Kontrolle wurden 300 ng des ungeschnittenen Plasmids mit aufgetrennt. Tabellarisch wurden die erwarteten Fragmentgrößen zusammengefasst

10  $\mu\text{g}$  des isolierten Deletionsplasmids wurden in  $1 \times 10^7$  Protoplasten des *P. anserina* Stammes  $\Delta PaKu70$  (El-Khoury et al., 2008) transformiert. In diesem *P. anserina*-Stamm wurde ein Gen, das für ein Protein codiert, das für die nicht homologe Integration (NHEJ) von DNA-Sequenzen erforderlich ist, mit einer Phleomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Aus diesem Grund ist die homologe Integration von Gensequenzen in das Genom dieses Stammes erleichtert.  $\Delta PaKu70$  wurde dem Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Sansaird-Chanet zur Verfügung gestellt. Nach der Transformation dieses Phleomycinresistenten Stammes mit dem Plasmid *pPaMth1KO1*, das die Hygromycin B-Resistenzkassette mit den *PaMth1*-begrenzenden Sequenzen enthält, wurden Hygromycin resistente *P. anserina*-Stämme erhalten. Aus den Transformanden wurde genomische DNA isoliert, von der jeweils 800 $\mu\text{g}$

mit dem Enzym *EcoRV* restringiert und auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Nach der Hybridisierung mit einer DIG markierten *PaMth1*-Gensonde und der anschließenden Detektion der gebundenen Sonde wurde ein Stamm erhalten, in dem das 3,5 kbp große Fragment (s. Abb. 40), das das *PaMth1*-Gen enthält und das im *PaKu70* Elternstamm detektiert wird, nicht mehr vorhanden war (nicht gezeigt). Diese Transformant zeigt jedoch noch eine Phleomycinresistenz, dies bedeutet, dass es sich bei diesem Stamm um einen Deletionsstamm des NHEJ-Gens handelt. Aus diesem Grund wurde dieser transgene Stamm gegen das Wildstammisolat s+18260 gekreuzt und es wurden zwei Sekundärtransformanten erhalten, die nur noch die Hygromycinresistenz zeigen und gleichzeitig eine Phleomycin-Sensitivität aufweisen. In diesen Isolaten ist somit das NHEJ-Gen durch die Kreuzung mit dem Wildstamm wieder vorhanden. Gleichzeitig deutet die Hygromycin B-Resistenz darauf hin, dass es sich um *PaMth1*-Deletionsstämme handelt, in denen das *PaMth1*-Gen gegen die Hygromycin B-Resistenzkassette ausgetauscht ist. Aus diesen Transformanten wurde wiederum genomische DNA isoliert, die mit *EcoRV* restringiert und auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Bei der Hybridisierung mit der Sonde gegen *PaMth1* wird im Gegensatz zu der Wildstamm-Probe kein Gensignal detektiert (Abb. 40 B). Bei der Hybridisierung dieser *EcoRV*-geschnittenen DNA mit einer Sonde gegen die Hygromycin B-Resistenzkassette wird nur in den DNA-Proben aus den Transformanten das erwartete 3, 2 kbp große Fragment detektiert (s. Abb. 40 B). Dieses Fragment entsteht durch die Einführung einer weiteren *EcoRV*-Schnittstelle in das Genom der Transformanten durch den Austausch des *PaMth1*-Gens gegen die Hygromycin B-Resistenzkassette, die diese Restriktionsschnittstelle beinhaltet. Mit Hilfe dieser Southernblot-Analysen wurde die Deletion des *PaMth1*-Gens in den analysierten Transformanten verifiziert.



**Abb. 40: Herstellung und Verifizierung eines *PaMth1*-Deletionsstammes.** (A) Schematische Darstellung der genomischen Region mit dem *PaMth1*-Leserahmen im *P. anserina*-Wildstamm, des Deletionsplasmides und des rekombinierten Genoms im *PaMth1*-Deletionsstamm. Wenn genomische Wildstamm-DNA mit *EcoRV* geschnitten wird, entsteht ein 3,55 kbp großes DNA-Fragment, das innerhalb einer Southernblot-Analyse von einer *PaMth1*-spezifischen DNA-Sonde detektiert wird. Bei einem Ersatz des *PaMth1*-Gens durch die Hygromycin-Kassette (*hph*) durch homologe Rekombination mit dem Deletionsplasmid, befindet sich in der rekombinierten genomischen Region im *PaMth1*-Deletionsstamm eine weitere *EcoRV*-Schnittstelle. In der mit *EcoRV* geschnittenen DNA dieses Stammes wird in einer Southernblot-Analyse mit einer Hygromycin-spezifischen Sonde ein 3,26 kbp großes Fragment detektiert. (B) Verifizierung der *PaMth1*-Deletion mittels Southernblot-Analyse. Die Gesamt-DNA aus zwei Hygromycin-resistenten und Phleomycin-sensitiven Sekundärtransformanten wurde mit *EcoRV* geschnitten, in einem 1%igem TAE-Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylomembran transferiert. Bei der Hybridisierung mit einer *PaMth1*-spezifischen DNA-Sonde wird das 3,55 kbp-große Fragment nur in der Wildstamm-DNA detektiert und nicht in den Proben aus den beiden Deletionsmutanten. Dagegen wird nur in den Proben aus den Deletionsmutanten und nicht im Wildstamm das erwartete 3,26 kbp Fragment mit einer Hygromycin-spezifischen Sonde detektiert. Dies belegt den Austausch des *PaMth1*-Gens gegen die Hygromycinkassette aus dem Deletionsplasmid. Als Positivkontrolle für die Hygromycin-spezifische Sonde wurden 5 ng des mit *EcoRV* geschnittenen Vektors pExMthph aufgetragen, der eine Hygromycinkassette enthält (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2009).

Um das Fehlen des PaMTH1-Proteins zu belegen, wurden Westernblot-Analysen mit Gesamtproteinen und mitochondrialen Proteinen durchgeführt. Dazu wurden je 10 µg Gesamtprotein aus einem juvenilen und seneszenten Wildstamm und zwei juvenilen und seneszenten Transformanten in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-

Membran transferiert. Nach der Hybridisierung mit einem Antikörper gegen PaMTH1 und dem entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper wurde das Fehlen des Methyltransferase-Proteins in den Transformanden sowohl im jungen als auch im alten Stadium im Gesamtprotein verifiziert (s. Abb. 41). Als Ladekontrolle wurde für die Gesamtproteine ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin verwendet. Mit Hilfe einer analogen Westernblot-Analyse, die mit mitochondrialen Proteinen und mit einem PaMTH1-Antikörper durchgeführt wurde, wurde ebenfalls das Fehlen von PaMTH1 in den Mitochondrien der transgenen Stämme nachgewiesen. Als Ladekontrolle für die mitochondrialen Proteine wurde ein Antikörper gegen das mitochondriale Porin verwendet (s. Abb. 41).

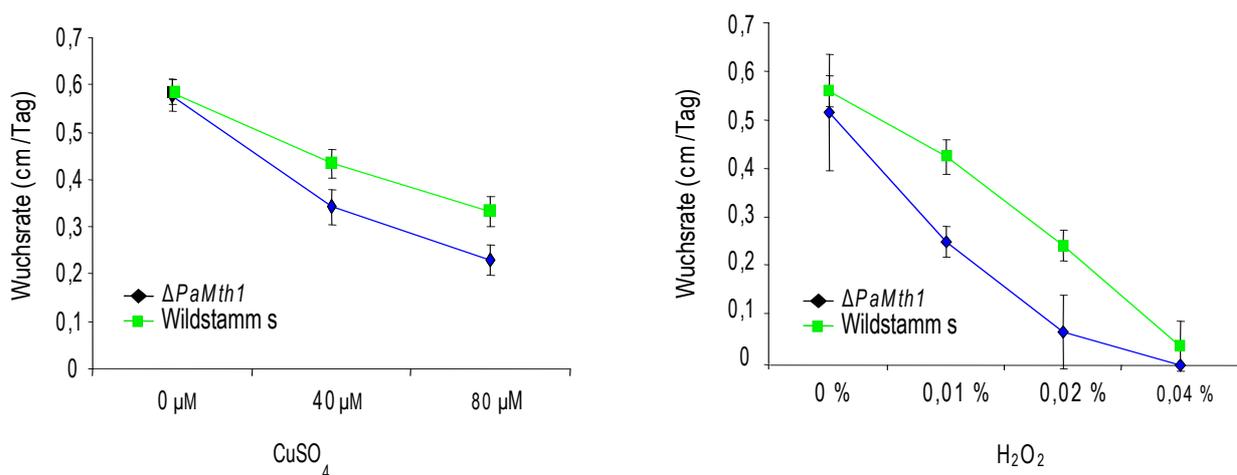


**Abb. 41: Verifizierung der *PaMth1*-Deletion in Gesamtproteinen und Mitochondrien mittels Westernblot-Analysen.** (A) Je 15  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt aus juvenilen und seneszenten Wildstamm- und *PaMth1*-Deletionsstämmen wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach der Hybridisierung mit einem PaMTH1-Antikörper werden weder in der Probe aus dem juvenilen Deletionsstamm, noch aus dem seneszenten Deletionsstamm das PaMTH1-Protein detektiert. Im seneszenten Wildstamm wird wiederum mehr PaMTH1-Protein detektiert als im juvenilen Stadium. Als Ladekontrolle für die Gesamtproteine wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin verwendet. (B) Detektion von PaMTH1 in mitochondrialen Proben aus juvenilen und seneszenten Wildstämmen und juvenilen und seneszenten *PaMth1*-Deletionsstämmen. Im seneszenten Stadium des Wildstammes wird eine erhöhte Menge PaMTH1 im Vergleich zum juvenilen Stamm gezeigt. Dagegen wird sowohl im juvenilen Stadium als auch im seneszenten Stadium des *PaMth1*-Deletionsstammes kein PaMTH1-Protein detektiert. Als Ladekontrolle für die mitochondrialen Proteine wurde ein Antikörper gegen Porin verwendet (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2009).

### 5.2.6.2 Charakterisierung der *PaMth1*-Deletionsmutanten

Anhand der Wuchsteste der *PaMth1*-Überexpressionstransformanden auf Kupfer und  $H_2O_2$ -platten wurde nachgewiesen, dass die Stressresistenz dieses transgenen Stammes im Vergleich zum Wildstamm erhöht ist. Um zu untersuchen, ob die Stressresistenz der *PaMth1*-Deletionsmutante verringert ist, wurde eine analoge Wachsraten-Analyse mit Sekundärtransformanden des Deletionsstammes durchgeführt. Dazu wurden jeweils 20 juvenile, zwei Tage alte Transformanden und 20 frisch isolierte Wildstämme auf PASM-Platten angeimpft, die 0  $\mu$ M, 40  $\mu$ M oder 80  $\mu$ M Kupfersulfat enthielten. Nach einer fünftägigen Inkubation bei Dauerlicht und 27°C und der täglichen Markierung der Wuchsfrente wurde die durchschnittliche Wachsraten durch die Division der Wuchsstrecke der

getesteten Stämme durch die Anzahl der Tage bestimmt. Anhand der statistisch ausgewerteten Daten ist zu sehen, dass die Resistenz der Deletionsstämme im Vergleich zu den getesteten Wildstämmen gegen den durch das Kupfersulfat verursachten, endogenen oxidativen Stress verringert ist (s. Abb. 42). Die  $\Delta PaMth1$ -Stämme weisen sowohl bei 40  $\mu\text{M}$  als auch bei 80  $\mu\text{M}$  eine geringere Wachstumsrate als die Wildstämme auf. Auch auf dem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -PASM-Medium mit den drei Konzentrationen 0,01 %, 0,02 % und 0,04 % sind die durchschnittlichen Wachstumsraten der Deletionsstämme im Vergleich zu den Wildstämmen verringert (s. Abb. 42).

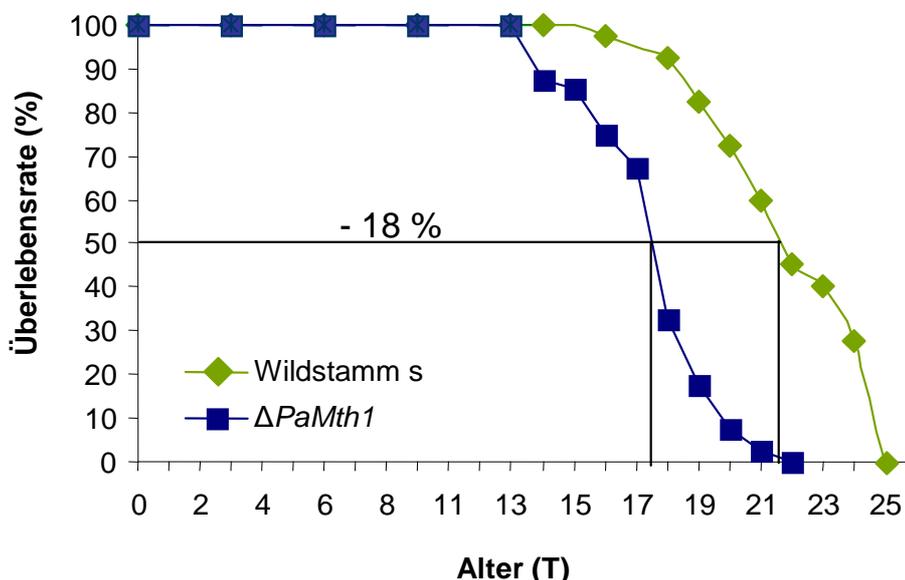


**Abb. 42: Wachstumsraten von jungen *P. anserina*-Wildstämmen und *PaMth1*-Deletionsstämmen auf PASM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Kupfersulfat oder Wasserstoffperoxid.** Je 20 juvenile Wildstämme (grün) und *PaMth1*-Deletionsstämme (blau) wurden auf PASM-Platten mit 0  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  oder 80  $\mu\text{M}$  Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) inkubiert. Nach einer fünftägigen Inkubation wurden die durchschnittlichen Wachstumsraten (cm/T) bestimmt. Anhand der Ergebnisse wird ein signifikant schlechteres Wachstum der *PaMth1*-Deletionsstämme gezeigt: 40  $\mu\text{M}$  ( $p = 6,154\text{e-}08$ ) und 80  $\mu\text{M}$  ( $p = 1,921\text{e-}08$ ). Auch auf PASM-Platten mit 0 %, 0,01 %, 0,02 % und 0,04 % Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ist die durchschnittliche Wachstumsrate der 20 *PaMth1*-Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildstamm signifikant niedriger: 0,01% ( $p = 1,443\text{e-}08$ ); 0,02% ( $p = 1,06\text{e-}07$ ) und 0,04% ( $p = 0,99$ ). Die Platten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurden im Dunkeln inkubiert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2009).

Diese Daten entsprechen den Erwartungen und zeigen in Übereinstimmung mit den Analysen der *PaMth1*-Überexpressionstransformanten, die eine erhöhte Stressresistenz zeigen, dass das Fehlen von PaMTH1 zu einer verringerten Stressresistenz führt.

Die Lebensspannenbestimmung beider *PaMth1*-Überexpressionstransformanten zeigt eine Verlängerung der mittleren Lebensspanne um 115%. Im Gegenzug dazu, sollten die *PaMth1*-Deletionsstämme eine verkürzte Lebensspanne aufweisen. Um diese Hypothese zu testen, wurden Lebensspannenanalysen mit 40 frisch isolierten Deletionsmutanten durchgeführt. Diese Stämme wurden, wie die Überexpressionstransformanten bei 27°C und Dauerlicht auf Rennrohren angezogen, die mit PASM befüllt waren. Nachdem alle zwei-drei Tage die Wuchsfrente markiert wurde und die Isolate das seneszente Stadium erreicht hatten, wurde die mittlere Lebensspanne, also der Zeitpunkt bestimmt, an dem die Hälfte aller Isolate gestorben

war. Dieser Wert beträgt bei den untersuchten Transformanten 17,5 Tage und bei den in der gleichen Analyse getesteten 40 Wildstämmen 21 Tage. Dies entspricht einer Lebensspannenverringerung um etwa 18 % (s. Abb. 43).

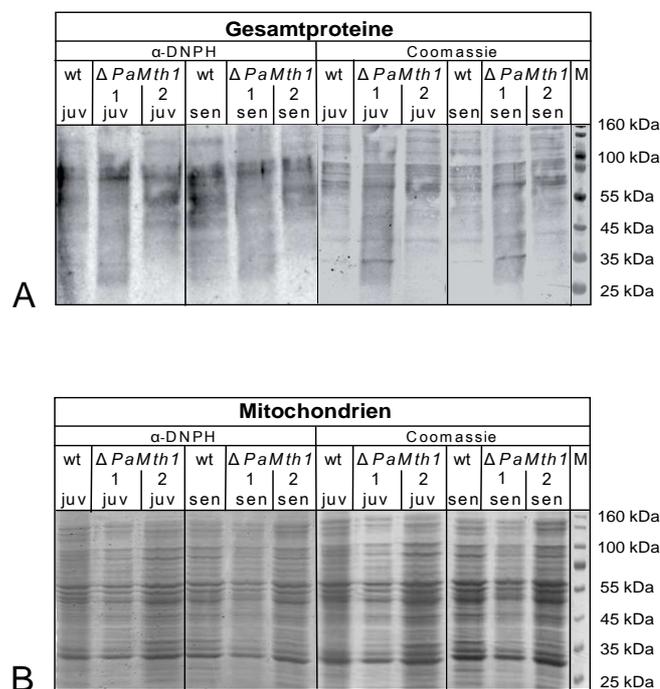


**Abb. 43: Vergleich der mittleren Lebensspannen der *PaMth1*-Deletionssmutanten und des *P. anserina* Wildstammes auf PASM-Medium.** Alle getesteten Isolate wurden auf Rennrohren mit 1%igem Glukosehaltigem PASM-Medium angezogen. Die Lebensspanne ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Die mittlere Lebensspanne des Wildstammes (n=40) beträgt 21 Tage, die mittlere Lebensspanne der Hygromycin-resistenten, Phleomycin-sensitiven Sekundärtransformanten aus  $\Delta PaMth1$  (n=40) beträgt 17,5 Tage. Dies entspricht einer Lebensspannenverkürzung des *PaMth1*-Deletionsstammes um etwa 18 % im Vergleich zum Wildstamm (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2009).

Die Befunde der Wachsraten-Analysen und die Lebensspannenanalyse sprechen dafür, dass in diesen Transformanten die Belastung durch oxidativen Stress aufgrund des fehlenden PaMTH1-Proteins höher als im Wildstamm und vor allem als in den *PaMth1*-Überexpressionsstämmen ist. Diese Stämme zeigen eine deutlich verbesserte Wachsrates auf beiden stress-induzierenden Medien und in den Proteinextrakten dieser Stämme wurden weniger oxidierte Proteine detektiert als im Wildstamm.

Um zu untersuchen, ob in den *PaMth1*-Deletionsmutanten u.U. eine erhöhte Menge oxidiertes bzw. carbonylierter Proteine vorliegt, wurden sowohl Gesamtproteine als auch mitochondriale Proteine mit Hilfe von „Oxyblot“-Analysen charakterisiert. Dazu wurden in der ersten Analyse je 10  $\mu$ g Gesamtprotein aus zwei juvenilen und einem seneszenten *PaMth1*-Deletionsstämmen und die analogen Proben aus einem Wildstamm analysiert. Mit je 10  $\mu$ g mitochondrialen Proteinen aus den gleichen Stämmen wurde eine analoge „Oxyblot“-Analyse durchgeführt. Entgegen den Erwartungen zeigen sich weder in den Proben mit Gesamtproteinen, noch in den Proben mit den mitochondrialen Proteinen Unterschiede zum

Wildstamm. In keinem der beiden untersuchten Stämme wurde wie erwartet eine erhöhte Menge oxidierter Proteine detektiert als im Wildstamm (s. Abb. 44).



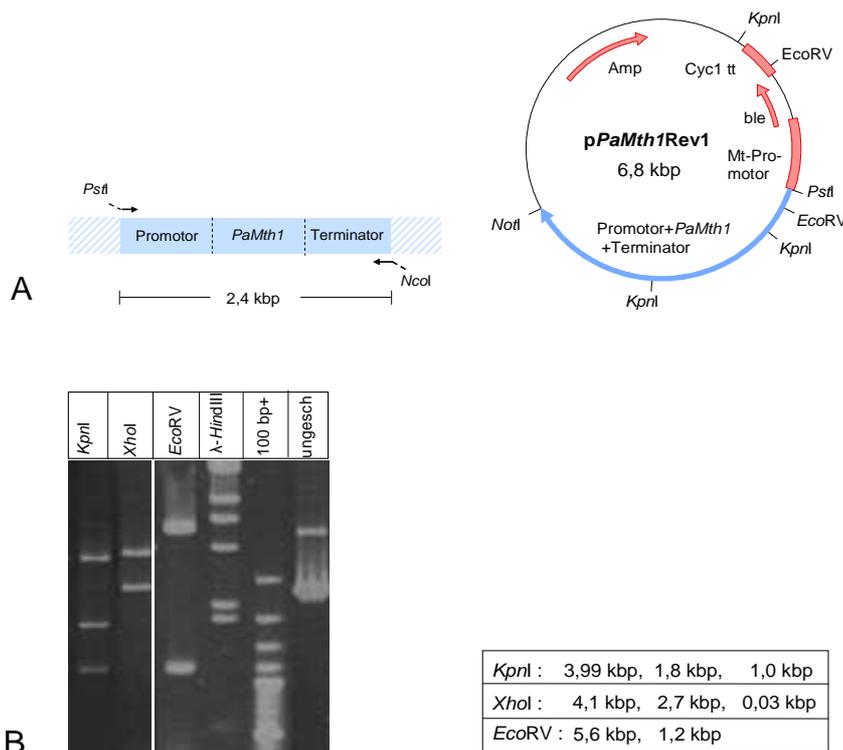
**Abb. 44: Detektion der carbonylierten Proteine in den *PaMth1*-Deletionsstämmen und im *P. anserina*-Wildstamm. (A)** „Oxyblot“-Analyse von je 10  $\mu$ g Gesamtproteinen aus juvenilen und seneszenten *P. anserina* Wildstämmen und *PaMth1*-Deletionsstämmen. Vor der Auftrennung in einem 12 %igem Polyacrylamidgel wurden die Proben mit Di-Nitro-Phenylhydrazin derivatisiert. Das an den Carbonylgruppen der Proteine entstandene Di-Nitrophenyl-Hydrazone wird von einem Antikörper ( $\alpha$ -DNPH) detektiert. Die Mengen der oxidierten Proteine sind in allen analysierten Proben sowohl aus dem Wildstamm als auch aus den *PaMth1*-Deletionsstämmen vergleichbar. Zur Kontrolle der gleichartigen Beladung des transferierten Gels wurde die Membran nach der Detektion der oxidierten Proteine mit Coomassie gefärbt. **(B)** In einer analogen „Oxyblot“-Analyse mit mitochondrialen Proteinen aus juvenilen und seneszenten Wildstämmen und *PaMth1*-Deletionsstämmen werden keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der carbonylierten Proteine in den untersuchten Proben identifiziert (modifiziert nach Kunstmann und Osiewacz, 2009).

### 5.2.7 Reversion der *PaMth1*-Deletionsstämme

Um zu verifizieren, dass die Effekte, die in den beiden analysierten transgenen *P. anserina*-Stämmen zu beobachten sind, durch die Modulation der *PaMth1*-Expression begründet sind, wurde eine Reversionsmutante aus dem *PaMth1*-Deletionsstammes in *P. anserina* hergestellt. Dazu wurde das *PaMth1*-Gen mit der angrenzenden Promotorregion und der Terminatorregion in den *PaMth1*-Deletionsstamm rücktransformiert. Im folgenden Kapitel wird die Herstellung und Charakterisierung dieser Stämme dargestellt.

#### 5.2.7.1 Herstellung von *PaMth1*-Reversionsstämmen

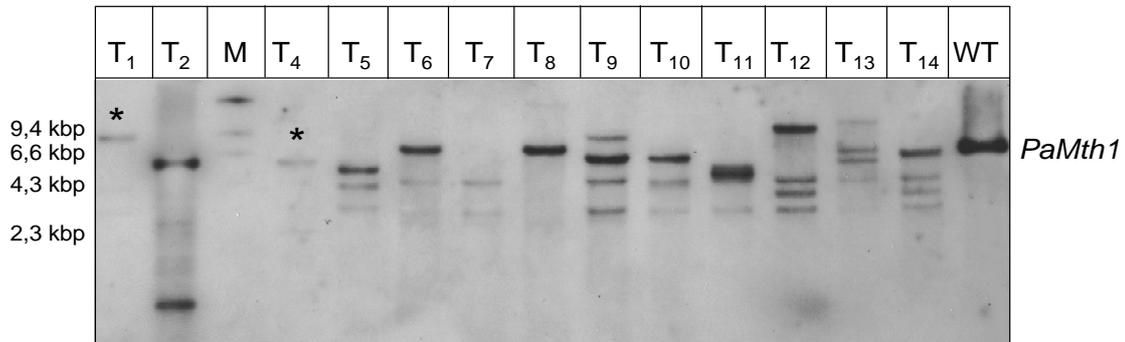
Um den Reversionsvektor *pPaMth1Rev1*, der die Kasette aus Promotor, Gen und Terminator trägt, herzustellen, wurden Oligonukleotide abgeleitet, die etwa 1000 bp strangaufwärts des *PaMth1*- Startcodons binden und etwa 500 Bp strangabwärts des Stopcodons von *PaMth1*. Diese Oligonukleotide *Mth\_rev1\_PstI-for* und *Mth\_rev1\_NotI-rev* führten bei der Amplifikation der Kasette am 5'-Ende eine *PstI*-Restriktionsstelle und am 3'-Ende eine *NotI*-Restriktionsstelle ein. Nach der Restriktion des aufgereinigten PCR-Produktes und des Vektors *pKO6* mit diesen Enzymen wurden eine Ligation im Verhältnis 1:7 (Vektor: Inserionsfragment) mit 100 ng des Vektors über Nacht angesetzt. Der Vektor *pKO6* enthält zur Selektion in *E. coli* eine Ampicillinresistenz und zur Selektion von transgenen *P. anserina*-Stämmen eine Phleomycin-Resistenzkasette. Nach der Transformation des Ligationsproduktes in kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes XL1 blue wurden ampicillinresistente Kolonien erhalten, bei denen die Aufnahme des Ligationsproduktes durch eine Plasmid-Mini-Präparation und einer anschließenden Testrestriktion überprüft wurde. Es wurde ein Klon erhalten, der das korrekte Plasmid enthielt und dieser Stamm wurde für eine Midi-Präparation des Konstruktes verwendet. Die korrekte Sequenz des isolierten Plasmids wurde mit Hilfe von Testrestriktionen und mittels Sequenzierungen verifiziert (s. Abb. 45) 10 µg dieses Expressionsplasmids wurden in  $1 \times 10^7$  Protoplasten des *PaMth1*-Deletionsstammes transformiert. Die Protoplastierung des Myzels dieses Stammes wurde mit Glucanex durchgeführt.



**Abb. 45: Konstruktion eines Vektors zur Reversion der *PaMth1*-Deletionsmutanten.** (A) Bei der PCR-Amplifikation des 2,4 kbp großen DNA-Fragmentes, das den *PaMth1*-Promotor, den *PaMth1*-Leserahmen und eine 500 Bp Terminatorsequenz enthält, wurden die Oligonukleotide *Mth\_rev1\_PstI-for* und *Mth\_rev1\_NotI-rev* verwendet. An das 5'-Ende des Amplifikats wurde eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PstI* angehängt und an das 3'-Ende eine Schnittstelle für das Enzym *NcoI*. Nach der Aufreinigung und Restriktion des PCR-Produkts und des Vektors pK06 wurde eine Ligation im Verhältnis 1:7 (Vektor: Insertionsfragment) angesetzt und das erwartete Plasmid *pPaMth1Rev1* wurde anschließend innerhalb einer Midi-Präparation isoliert. Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz (=Amp) sowie eine Phleomycin-Resistenz (=ble) zur Selektion von *E. coli*- bzw. *P. anserina*-Transformanten. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung der Testrestriktionen von *pPaMth1Ex1* in einem 1% igen TAE-Agarosegel. Das komplette Plasmid umfasst 6,8 kbp. Die Klonierungsstellen sind in der Karte eingezeichnet, die entstehenden Fragmentgrößen der Testrestriktionen sind in der Tabelle angegeben. Als Kontrolle wurden 300 ng ungeschnittener Vektor (ungesch.) aufgetrennt, als Größenstandards wurden je 250 ng  $\lambda$ -*HindIII* und 100Bp+-Leiter aufgetragen.

Nach etwa 5-7 Tagen wurden Phleomycin-resistente Transformanten erhalten, bei denen die Aufnahme des Plasmids *pPaMth1Rev1* mit Hilfe einer Southernblot-Analyse überprüft wurde (s. Abb. 46). Für diese Analyse wurde die Gesamt-DNA aus den erhaltenen Phleomycin-resistenten Primärtransformanten isoliert und es wurden je 800  $\mu$ g der DNA pro Transformant mit *HindIII* restringiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer DIG-markierten Sonde gegen *PaMth1* hybridisiert. Mit Hilfe dieser Southernblot-Analyse wurden zwei Primärtransformanten ( $T_1$  und  $T_4$ ) identifiziert, die das Plasmid genau einmal aufgenommen haben (s. Abb. 46). Diesen transgenen Stämmen fehlt das 6,8 kbp große Wildstamm-Fragment, das in der Probe des Wildstammes detektiert wird, aber in beiden Transformanten

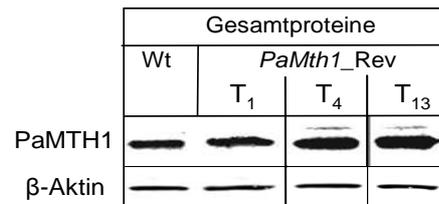
wird jeweils ein Fragment detektiert, das eine andere Größe als das Wildstamm-Fragment besitzt.



**Abb. 46: Southernblot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPaMth1Rev1* in das Genom der putativen Revertanden T1-T14.** Jeweils 800 ng genomische DNA des Wildstammes s (Wt) und der Transformanden wurde mit *Hind*III restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit einer *PaMth1*-spezifischen DIG-markierten Sonde. Das detektierte Wildstamm-Signal (WT, *PaMth1*) hat eine Größe von 6, 7 kbp. In keiner Transformanden-DNA wird ein Signal dieser Größe detektiert, sondern teilweise zahlreiche größere oder kleinere Fragmente (z. B. T<sub>10</sub> oder T<sub>12</sub>), die aufgrund der Integration des Plasmids *pPaMth1Rev1* in das Genom der Transformanden vorhanden sind. Bei zwei Transformanden konnte genau eine Einzelintegration des Plasmids nachgewiesen werden. In der Probe aus T<sub>1</sub> wird ein Fragment mit einer ungefähren Größe von 8, 5 kbp bis 9 kbp detektiert, in T<sub>4</sub> wird ein etwa 6, 0 kbp großes Fragment detektiert. Die beiden Einzelintegrationen sind mit einem Sternchen markiert. Als Standard wurden 40 ng des DIG-markierten  $\lambda$  *Hind* III aufgetragen, die Größen sind am linken Bildrand angegeben.

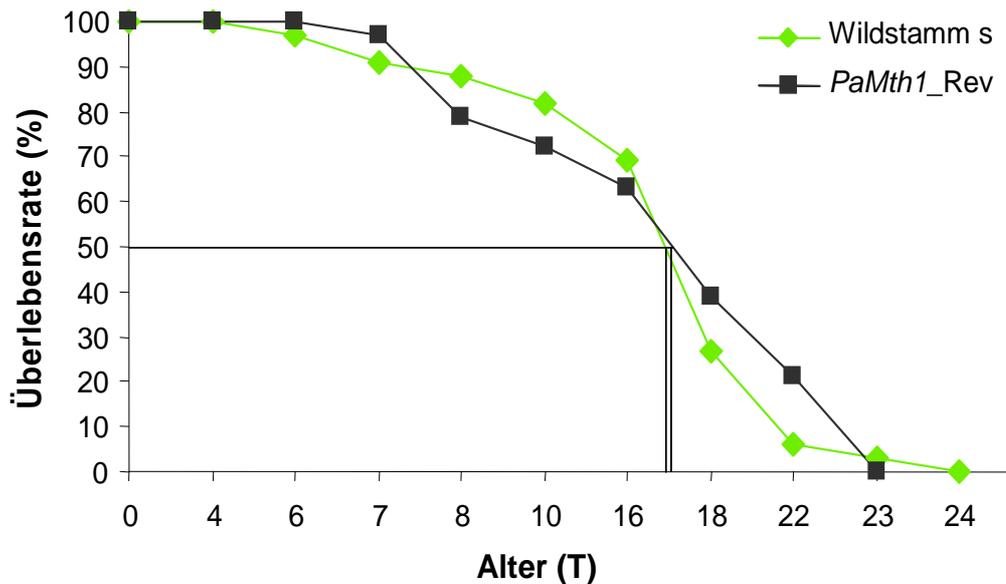
Dies bedeutet, dass es sich bei diesen beiden Transformanten um Revertanden handeln kann. Mit Hilfe dieser Analyse wurde somit die Reintegration der vollständigen Reversionskassette bestehend aus *PaMth1*-Promotor, -Gen und -Terminatorsequenz in das Genom des *PaMth1*-Deletionsmutanten gezeigt.

Um die Bildung des PaMTH1-Proteins nachzuweisen, wurden Gesamtproteine aus dem jungen Primärtransformanden *PaMth1\_Rev* T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub> und T<sub>13</sub> innerhalb einer Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen PaMTH1 untersucht. Für diese Analyse wurden je 20  $\mu$ g Gesamtproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und nach der Hybridisierung der Membran mit dem PaMTH1-Antikörper und dem Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurde die Membran ausgewertet. Anhand des Ergebnisses ist zu sehen, dass die Menge des gebildeten PaMTH1 in der Mutante T<sub>1</sub> mit der Einfachintegration der Menge PaMTH1 entspricht, die in der Probe des juvenilen Wildstammes detektiert wird (s. Abb. 47). In den Gesamtproteinproben aus dem Revertand T<sub>4</sub>, der zweiten Mutante mit einer Einzelintegration und T<sub>13</sub>, der Mutante mit der Vierfachintegration werden größere PaMTH1-Mengen detektiert.



**Abb. 47: Verifizierung der Revertanden mittels Westernblot-Analysen.** Je 20 µg Gesamtproteinextrakt aus einem juvenilen Wildstamm- und den drei *PaMth1*-Reversionsstämmen *PaMth1\_Rev* T<sub>1</sub>, T<sub>4</sub> und T<sub>13</sub> wurden in einer 12 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Nach der Hybridisierung mit einem PaMTH1-Antikörper wird in der Probe aus dem Transformand T<sub>1</sub> eine mit der PaMTH1-Menge im Wildstamm vergleichbare Menge detektiert. In der Gesamtproteinprobe aus dem Revertand T<sub>4</sub>, der zweiten Mutante mit einer Einzelintegration und T<sub>13</sub>, der Mutante mit der Vierfachintegration werden größere PaMTH1-Mengen detektiert. Als Ladekontrolle für die Gesamtproteine wurde ein Antikörper gegen β-Aktin verwendet.

Dieser Befund verifiziert die Mutanten als Revertanden des *PaMth1*-Deletionsstammes und somit wurde der Primärtransformand T<sub>1</sub> gegen den Wildstamm s+ 18260 gekreuzt und anschließend Sekundärtransformanden zur Bestimmung der Lebensspanne dieser Mutante isoliert. Für alle weiteren Analysen wurden Sekundärtransformanden verwendet, die sowohl Phleomycin- als auch Hygromycin-resistent sind. Dies verifiziert das Vorhandensein der Hygromycin-Kassette anstatt des *PaMth1*-Gens und die Integration des *pPaMth1Rev1*-Plasmids mit der Phleomycinresistenzkassette im Genom dieser Transformanden. Mit dem Ziel, die mittlere Lebensspanne dieser Revertande zu bestimmen, wurden 33 frisch isolierte, zwei Tage alte Sekundärtransformanden auf PASM-Rennrohren angeimpft und bei 27°C im Dauerlicht inkubiert, bis sie das senescente Stadium erreicht hatten. Gleichzeitig wurden als Referenz 33 juvenile, 2 Tage alte Wildstammisolate auf PASM-Rennrohren angezogen. Bei allen Isolaten wurde alle zwei bis drei Tage die Wuchsfrente markiert und am Ende wurde die mittlere Lebensspanne bestimmt. Nach der Auswertung der aufgenommenen Daten wird deutlich, dass zwischen den mittleren Lebensspannen der Revertande und des Wildstammes kein signifikanter Unterschied besteht: Beide Stämme leben im Durchschnitt 17 Tage (s. Abb. 48).



**Abb. 48: Vergleich der mittleren Lebensspannen der *PaMth1*-Deletionssmutanten und des *P. anserina* Wildstammes auf PASM-Medium.** Alle getesteten Isolate wurden auf Rennrohren mit 1 %igem Glukosehaltigem PASM-Medium angezogen. Die Lebensspanne ist in Tagen, die Überlebensrate in Prozent angegeben. Die mittlere Lebensspanne des Wildstammes (n=33) und der Hygromycin-resistenten, Phleomycin-resistenten Sekundärtransformanten aus *PaMth1\_Rev* (n=33) beträgt jeweils 17 Tage.

Zusammenfassend lässt sich damit festzustellen, dass die beobachteten Effekte in den *PaMth1*-Überexpressionstammes und dem entsprechenden Deletionsstamm ausschließlich auf die jeweilige Modulation der Expression von *PaMth1* zurückzuführen sind.

## 6 Diskussion

Aus der langjährigen Erforschung der Prozesse während des Alterns von *P. anserina* liegt ein umfangreiches Wissen über die Rolle der Mitochondrien in diesem leicht zu charakterisierenden Modellsystem vor. Einige Erkenntnisse, die sich zum Teil auf andere Modellorganismen in der Altersforschung übertragen lassen, und die damit Teil konservierter Signalwege sind, wurden in der Einleitung dargestellt. Diese und weitere Befunde betonen die Bedeutung mitochondrialer Mechanismen für das biologische Altern. Zahlreiche dieser Daten wurden im Rahmen sogenannter „Kandidatenansätze“ von *P. anserina* erhalten, in denen beispielsweise die Ergebnisse einer Untersuchung der altersabhängigen Transkription eines bestimmten Gens im Wildstamm als Grundlage für die anschließende Herstellung und physiologische Charakterisierung einer Mutante diente, in der die Genexpression dieses Gens moduliert wurde.

Im Gegensatz dazu waren es in der vorliegenden Arbeit die Hauptzielsetzungen, neue mitochondriale Proteine, die Komponenten konservierter Signalwege während der Seneszenz in *P. anserina* darstellen, zu identifizieren und anschließend zu charakterisieren. Dies wurde mit Hilfe einer ungerichteten, differentiellen Proteomanalyse mit Proteinen aus jungen und alten *P. anserina* Wildstämmen im Rahmen des EU-Projektes MiMage durchgeführt. Zeitgleich wurden von dem Projektpartner „ProteoSys“ ebenfalls Mitochondrien aus jungen und alten humanen Nabelschnur-Endothelzellen und Rattengehirnen untersucht, um konservierte Signalwege aufzudecken.

### *Auftrennung und Identifizierung differentiell-gebildeter, mitochondrialer Proteine aus jungen und alten P. anserina-Wildstämmen*

Die Untersuchung der mitochondrialen Proben aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen mittels 2D-PAGE und anschließender MALDI-TOF-Analysen hat im Gegensatz zu anderen gelelektrophoretischen, eindimensionalen Methoden, beispielsweise der 1D-SDS-PAGE, den Vorteil, dass auch weniger deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung von zwei mitochondrialen Proteomen gezeigt werden, weil die Auflösung der Auftrennung höher ist. Diese geringen Unterschiede zwischen den Proteomen aus jungen und alten *P. anserina*-Wildstämmen konnten mit Hilfe von eindimensionaler SDS- und BN-

PAGE nicht gezeigt werden (s. Abb. 17; 18). Dagegen zeigten sich schon in den initialen Versuchen der 2D-PAGE mittels Auftrennung in zwei Gelen differentiell-gebildete Proteine (s. Abb. 19). Für diese 2D-Analyse des mitochondrialen Proteoms wurden sehr reine Mitochondrienproben verwendet, in denen cytoplasmatische Verunreinigungen mittels Aufreinigung über einen Saccharosegradienten minimiert wurden, um die Identifizierung falschpositiver Proteine zu vermeiden. Der zweite wichtige Punkt bei der Isolierung war die Vermeidung einer Erwärmung der Proben, damit keine artifiziellen posttranslationalen Modifikationen während der Isolierung geschehen können. Schon anhand der zweidimensionalen Gele, die in den initialen Analysen des mitochondrialen Proteoms erhalten wurden, war zu sehen, dass die Qualität der isolierten Proteine für eine Analyse dieser Art ausreicht. Die meisten Proteine wurden im pH-Bereich zwischen 5 und 9 fokussiert und es gab keine störende Aggregat-Bildung (s. Abb. 19). Weitere über einen Saccharosegradienten aufgereinigte Mitochondrien wurden in den nachfolgenden Proteomanalysen von dem Projektpartner „ProteoSys“ für 2D-PAGE verwendet.

### ***Im Rahmen der Proteomanalyse wurden 29 differentiell-gebildete Proteine identifiziert***

In den 2D-Gelen, die im Rahmen der differentiellen Proteomanalyse von „ProteoSys“ angefertigt wurden, besitzen sehr viele „Proteinspots“ isoelektrische Punkte in dem Bereich von vier bis neun (s. Abb. 20). Auch in den initialen 2D-PAGE-Analysen wurde der Großteil der Proteine in diesem Bereich fokussiert (s. Abb. 19), hier sind die Ergebnisse demnach vergleichbar. Mit Hilfe der 2D-PAGE-Analyse mit den radioaktiv-markierten Proteinen, die von „ProteoSys“ durchgeführt wurde, wurden zahlreiche juvenil- oder seneszenzspezifisch gebildete Proteine gezeigt (s. Abb. 20) und in der anschließenden massenspektrometrischen Analyse wurden etwa 60 differentielle „Proteinspots“ identifiziert. Zusätzlich konnten viele Proteine noch nicht mittels MALDI/TOF identifiziert werden, weil zu dieser Zeit die *P. anserina*-Genomsequenz nicht publiziert war. In der Gruppe der 60 identifizierten Proteinspots existieren zahlreiche Kandidaten, die Isoformen des gleichen Proteins enthalten, die wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen zurückzuführen sind. Somit wurden nur etwa 29 Proteine identifiziert, die in *P. anserina* während des Alterns differentiell gebildet werden.

***Im seneszenten Wildstamm von *P. anserina* sind überwiegend geringere Mengen von Proteinen vorhanden, die am Energiehaushalt beteiligt sind***

Anhand der Einteilung der Proteine in die jeweilig zugehörige Stoffwechselklasse wird deutlich, dass vor allem Proteine der Atmungskette, des Zitratcyclus und des Fettsäurestoffwechsels in geringerer Menge in den mitochondrialen Proben aus den alten Wildstämmen im Vergleich zu den jungen Wildstämmen detektiert werden (s. Tab. 2).

Ein Protein der Atmungskette, das im alten Wildstamm in geringerer Menge vorhanden ist und von dem insgesamt fünf Isoformen identifiziert wurden, ist die  $\beta$ -Untereinheit der ATPase (Groebe et al., 2007). Mehrere Isoformen der Untereinheit dieses Atmungskettenkomplexes und zusätzlich eine verringerte Proteinmenge wurden von dem Projektpartner „ProteoSys“ ebenfalls in mitochondrialen Proben aus dem Rattengehirn und in Proben aus menschlichen „human umbilical vein endothelial cells“ (HUVEC)-Zellen identifiziert. Die ATPase ist ein Protein, von dem beispielsweise auch schon in anderen Studien mit Mäusen sowohl auf Transkript-Ebene (Manczak et al., 2005) als auch auf Protein-Ebene (Chakravarti et al., 2009) gezeigt wurde, dass die jeweilige Menge in den Mitochondrien während des Alterns abnimmt.

Zusätzlich wurde in allen drei untersuchten Modellsystemen an diesem Protein eine „N-formyl Kynurenin“-Bildung mittels MALDI/TOF nachgewiesen (Groebe et al., 2007). Hier scheint es sich demnach um einen konservierten „hot spot“ für posttranslationale oxidative Modifikationen zu handeln, denn beispielsweise in Herzen alter Mäuse wurden ebenfalls oxidative Modifikationen an der ATPase gezeigt (Yarian et al., 2005). Auch im Rahmen einer vergleichenden Proteomanalyse von Maus-Nieren aus jungen und alten Tieren wurde gezeigt, dass von der ATPase mehrere Isoformen detektiert werden, die durch posttranslationale Modifikationen verursacht wurden (Chakravarti et al., 2009). Zusätzlich wurde in Herzmuskelzellen aus der Ratte eine erhöhte Carbonylierung der ATPase gezeigt (Chung et al., 2008). Demnach scheint es sich bei der oxidativen Modifikation der ATPase und der Verringerung der Menge dieses Proteins im Alter um konservierte Vorgänge zu handeln, die mit Hilfe der differentiellen Proteomanalyse in *P. anserina* bestätigt werden.

Die beiden Stoffwechselwege neben der Atmungskette, deren Proteine in vergleichbarer Weise betroffen sind, sind der Zitratcyclus und der Fettsäurestoffwechsel. Bei den identifizierten Proteinen, die diesen beiden Stoffwechselwegen zugeordnet werden, wird deutlich, dass die meisten Proteine ebenfalls in geringeren Mengen in den Mitochondrien seneszenten Wildstämme als in juvenilen Stämmen vorhanden sind. Es wurde z. B. gezeigt,

dass die Malat- und Isozitat-Dehydrogenase in geringeren Mengen im alten Stadium vorhanden sind. Auch hier scheint es sich bei der Beeinträchtigung des Zitratcyclus um einen konservierten Vorgang zu handeln, denn geringere Mengen dieser beiden Enzyme wurden von „ProteoSys“ auch in den Proben aus alten Ratten gefunden. Auch in einer Proteomanalyse mit Gehirnen aus jungen und alten Mäusen wurden diese beiden Proteine in kleinerer Menge im alten Stadium gezeigt (Carrette et al., 2006). Neben der Atmungskette und dem Zitratcyclus sind auch Proteine des Fettstoffwechsels betroffen. In den Proben aus alten *P. anserina* Stämmen wird im Vergleich zu den Proben aus jungen Stämmen gezeigt, dass eine verringerte Menge der Enzyms Enoyl-CoA Hydratase, die in der Fettsäureoxidation die sehr wichtige Funktion der Acetyl-CoA-Bildung übernimmt, vorhanden ist. Dies könnte, wie bei den Atmungskettenkomplexen, eine Folge einer stärkeren oxidativen Schädigung und dem verstärkten folgenden Abbau des geschädigten Proteins sein. Es wurde beispielsweise auch in Endothelzellen gezeigt, dass sie zusammen mit der mitochondrialen Aconitase ein primäres Ziel der oxidativen Schädigung durch Radikale darstellt (Addabbo et al., 2009). In dem Nematoden *C. elegans* wurden z. B. ebenfalls eine verringerte Menge der Enoyl-Hydratase und gleichzeitige AGE-Modifikationen an diesem Protein gezeigt (Rabbani und Thornalley, 2008). Passend zu diesen Befunden ist die Lebensspanne von Glyoxalase 1 (*Glo1*)- Überexpressionmutanten in *C. elegans* verlängert (Morcos et al., 2008). GLO1 katalysiert die Entgiftungsreaktion von Methylglyoxal mit Glutathion zu Lactat. Durch diese Reaktion verringert sich die Konzentration des Methylglyoxals, das für die Bildung der AGE-Modifikationen (s. o.) verantwortlich ist (Sukdeo et al., 2004). So werden wahrscheinlich Proteine wie die Enoyl-Hydratase vor AGE- Modifikationen geschützt (Rabbani und Thornalley, 2008)

Anhand der Analysen zeigt sich, dass gerade energieliefernde Enzyme, beispielsweise aus der Atmungskette, durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt oder oxidativ modifiziert werden können. Dies kann u. a. an der topologischen Nähe dieser Proteine zum Ort der mitochondrialen Entstehung von ROS liegen. Diese Befunde könnten außerdem eine Erklärung für den gestörten Energiestoffwechsel sein, der in vielen senszenten Modellorganismen belegt wurde.

---

***Seneszenzspezifisch verringerte Bildung von ROS-Abwehr-Proteinen in den Mitochondrien alter *P. anserina*-Wildstämme***

Proteine der ROS-Abwehr in den Mitochondrienpräparation der alten Wildstämme sind, wie erwartet, in anderen Mengen vorhanden, als in den Mitochondrien der jungen Wildstämme. Es werden z. B. deutlich geringere Mengen des putativen Peroxiredoxins gefunden. Das Peroxiredoxin übernimmt in den Mitochondrien die Wasserstoffperoxid-Entgiftung (Nonn et al., 2003). Der Befund, dass die Peroxiredoxin-Menge in den Mitochondrien von *P. anserina* während der Alterung sinkt, bietet einen neuen, interessanten Ansatz zur Erforschung der mitochondrialen Schutzsysteme gegen ROS. Diesem Forschungsansatz wird zurzeit in einer anderen Dissertation im Arbeitskreis nachgegangen (Dissertation S. Zintel). Außerdem wurden geringere Mengen der mitochondrialen Superoxid-Dismutase in den Mitochondrien der alten Wildstämme detektiert als in den Mitochondrien der juvenilen Wildstämme. Die reduzierte Menge der Superoxid-Dismutase könnte eine Erklärung für die Zunahme von reaktiven Sauerstoffspezies im alten Wildstamm liefern. Bei der Abnahme der SOD-Menge kann es sich allerdings auch um eine negative Auswirkung der größeren ROS-Menge handeln, die auf einen verstärkten Abbau des geschädigten Proteins zurückzuführen ist.

Ein weiteres Protein, das sehr wahrscheinlich an der ROS-Abwehr beteiligt ist, ist ein juvenilspezifisch gebildetes Flavohämoglobin. Dieses Protein, das im seneszenten Stadium in geringerer Menge vorhanden ist, zeigt eine 50%ige Identität zu dem Flavohämoglobin FHB1 aus *Aspergillus oryzae* (SwissProt-Nr. Q2U124, Sequenzvergleich siehe Anhang). Dieses Protein übernimmt in *A. oryzae* eine Rolle in der Detoxifizierung von Stickstoffmonoxid über eine Dioxygenase-Funktion und wurde in einer neueren Arbeit in den Mitochondrien von *A. oryzae* lokalisiert (Zhou et al., 2009). Hiermit wurde sehr wahrscheinlich eine neue Komponente der ROS-Abwehr in den *P. anserina*-Mitochondrien identifiziert, dessen funktionelle Aspekte in zukünftigen Forschungsarbeiten analysiert werden können.

***In seneszenten *P. anserina* Stämmen wird eine größere Menge von Chaperonen gefunden, die bei der Proteinsynthese eine Rolle übernehmen***

Ein Protein, das in stark erhöhter Menge in den Proben aus den seneszenten *P. anserina*-Wildstamm-Isolaten identifiziert wurde, ist eine Protein-Disulfid-Isomerase. Dieses Enzym katalysiert die Umlagerung und Neubildung von Di-Sulfid-Brücken bei der Faltung von Proteinen. Es ähnelt in seiner Struktur dem Thioredoxin, das in der mitochondrialen Matrix

vorkommt. Der Hauptort, in der Zelle, an dem jedoch die Protein-Disulfid-Isomerasen zu finden sind, ist das endoplasmatische Reticulum (ER) (Lumb und Bulleid, 2002), ein Protein dieser Klasse wurde allerdings auch schon in Mitochondrien aus der Rattenleber gefunden (Rigobello et al., 2000). In zukünftigen Analysen muss diese Lokalisation des Proteins in *P. anserina* mit Hilfe einer GFP-Fusion aufgeklärt werden, um so eine ER-Kontamination der mitochondrialen Proben auszuschließen und die Rolle dieses Proteins während des Alterns in den Mitochondrien von *P. anserina* näher zu charakterisieren.

Zusätzlich wurde im seneszenten Stamm eine erhöhte Menge des Proteins SSC1 identifiziert. Dieses gehört zur Hsp70-Hitzeschock-Proteinfamilie und es übernimmt ebenfalls während der Proteinfaltung eine wichtige Chaperonfunktion. Die Beteiligung an der korrekten Proteinfaltung wurde beispielsweise in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt (Liu und Steinacker, 2001). In der vorliegenden Proteomanalyse wurden außerdem erhöhte Mengen der Hitzeschockproteine 60 und 70 in seneszenten Nabelschnur-Endothelzellen gefunden. Auch hier deutet sich an, dass es sich um eine konservierte Maßnahme zur Erhaltung einer korrekten Proteinsynthese und-faltung in den Mitochondrien handeln kann, die während der Alterung u. U. beeinträchtigt sein könnte. Die Identifizierung dieser Proteine in mitochondrialen Proben aus seneszenten *P. anserina*-Stämmen bietet einen neuen Aspekt in der Analyse der Rolle der mitochondrialen Proteinfaltung und-homöostase in *P. anserina*.

### ***Identifizierung einer erhöhten Menge eines Apoptosefaktors im seneszenten Stadium von P. anserina***

Im Rahmen der vorliegenden Proteomanalyse wurde eine erhöhte Menge des Proteins Cyclophilin D in den mitochondrialen Proben aus den seneszenten Wildstämmen identifiziert. Dieses Protein ist ein in der mitochondrialen Matrix lokalisiertes Protein, das an der Apoptose beteiligt ist (s. o.). Es ist ein Bestandteil der sogenannten „mitochondrial permeability transition pore“. Es scheint die Öffnung dieser Pore während der Apoptose zu regulieren, denn wenn Herzmuskelzellen mit Cyclosporin A, einem Inhibitor von Cyclophilin D behandelt werden, wird die Öffnung der Pore verhindert. Die Identifizierung dieses Proteins in Mitochondrien von *P. anserina* stellt neben der Charakterisierung der Metacaspasen (Hamann et al., 2007) einen weiteren Ansatzpunkt für die Apoptoseforschung in diesem Ascomyceten dar. Die molekularbiologische Analyse der Rolle dieses Protein wurde aufgrund des Ergebnisses dieser Proteomanalyse im Arbeitskreis aufgenommen (Dissertation D. Brust).

---

### ***Identifizierung einer stark erhöhten Menge einer Methyltransferase mit unbekannter Funktion in den Mitochondrien alter Wildstämme***

Das zweite Protein, das in stark erhöhter Menge in den Proteinisolaten identifiziert wurde, ist eine S-Adenosyl-Methionin-abhängige (SAM) Methyltransferase (PaMTH1) (s. Einleitung). Es wurde überraschend in der Liste dieser mitochondrialen Proteine gefunden, denn bis dahin gab es keine Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation dieses Proteins. Es wurde zudem im Rahmen einer früheren Suche nach seneszenzspezifisch gebildeten Proteinen mit Hilfe eindimensionaler SDS-Gelelektrophoresen mit Gesamtproteinen identifiziert (Averbeck et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde eine prominente Proteinbande mit einer Größe von 27 kDa aus Gesamtproteinen des seneszenten Wildstammes isoliert und mit Hilfe von Proteinsequenzierung als PaMTH1 identifiziert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion dieser neu identifizierten differentiell-gebildeten Methyltransferase während der Alterung in *P. anserina* mit Hilfe molekularbiologischer, biochemischer und physiologischen Analysen untersucht.

#### ***Die Klasse I-Methyltransferase PaMTH1***

Wie in der Einleitung beschrieben wird, existieren in der Proteinsuperfamilie der Methyltransferasen verschiedene Unterklassen von Enzymen, die durch Homologie, Größen- und Substratspezifität-Vergleiche erstellt wurden. Bei dem initialen Vergleich der PaMTH1-Proteinsequenz mit den Proteinsequenzen von anderen bekannten Methyltransferasen zeigt sich, dass in der Proteinsequenz von PaMTH1 typische Motive, also Konsensussequenzen für Methyltransferasen vorhanden sind (Averbeck et al., 2000). Eins davon ist das Motiv I, (Kagan und Clarke, 1994), das z. B. für die Wechselwirkung der Methyltransferase mit dem Methyl donor S-Adenosyl-Methionin (SAM) wichtig ist (s. Abb. 15). Das Vorhandensein dieser Motive deutet klar darauf hin, dass es sich bei PaMTH1 um ein Enzym dieser Art von SAM-abhängigen Methyltransferasen handeln sollte. Gleichzeitig besitzen alle drei Methyltransferasen zahlreiche Aminosäuren, die an der Bindung dieser Kation-abhängigen Methyltransferasen an das Magnesium-Kation beteiligt sind. Bei dieser Analyse werden allerdings auch Unterschiede in der Homologie der verglichenen Enzyme deutlich. So unterscheidet sich PaMTH1 z. B. im Bereich zwischen den Motiven B und C deutlich von den anderen beiden Methyltransferasen. Der Vergleich mit der pflanzlichen und der Säuger-

Methyltransferase zeigt die erwarteten Gemeinsamkeiten und Unterschiede der drei Enzyme, gibt aber keinen Aufschluss über weitere Eigenschaften, wie z. B. Dimer-Bildung oder Substratspezifität.

Die Einordnung in einen Stammbaum zeigt deutlich, dass PaMTH1 zur Klasse I der Methyltransferasen gehört (s. Abb. 21). Wie in der Einleitung dargestellt wird, handelt es sich bei den Klasse I-Methyltransferasen um Kation-abhängige kleinere Methyltransferasen, die häufig Caffeoyl-CoA während der Lignin-Biosynthese methylieren (Ye et al., 1994). In der Klasse I setzt sich PaMTH1 zusammen mit den beiden nächsten verwandten Methyltransferasen aus den Ascomyceten *Neosartorya fischeri* und *Aspergillus clavatus* von den pflanzlichen Methyltransferasen ab. Diese Befunde entsprechen den Erwartungen, denn Ascomyceten bilden im Gegensatz zu Pflanzen keine Lignine, die dort in die pflanzliche Zellwand eingelagert werden und somit die Verholzung der Zelle bewirken (Lignifizierung). Zusätzlich setzen sich die drei Methyltransferasen erwartungsgemäß noch deutlicher von den Methyltransferasen der zweiten Klasse ab. Anhand der hier vorliegenden Ergebnisse wird daher deutlich, dass PaMTH1 zwar zur ersten Klasse der Methyltransferasen gehört, u. U. aber eine ähnliche Substratspezifität wie z. B. die Catechol-O-Methyltransferase aus dem Menschen und der Ratte vorweisen könnte. Diese ist beispielweise in der Lage das Klasse II-Methyltransferase-Substrat Quercetin 100 mal besser zu methylieren als ihr eigentliches Substrat (Zhu et al., 1994). Auch für die PFOMT aus der Eispflanze, einem pflanzlichen Klasse I-Enzym wurde gezeigt, dass sie neben ihren eigentlichen Substraten Quercetin methylieren kann (Ibdah et al., 2003).

Auf der Grundlage des Ergebnisses dieser Homologievergleiche wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit die PaMTH1-Substratspezifität mit Hilfe biochemischer Methoden analysiert. Diese Analysen hatten das Ziel über die Kenntnis der Substratspezifität Hinweise auf die *in vivo*-Funktion und auf die Rolle von PaMTH1 während der Alterung in *P. anserina* zu erhalten. Zusätzlich sollte diese Rolle mit Hilfe von Northernblot-Analysen untersucht werden, in denen herausgefunden werden sollte, ob *PaMth1* transkriptionell während des Alterns reguliert wird.

### ***Im seneszenten Wildstamm ist die große PaMTH-Proteinmenge auf eine erhöhte PaMth1-Transkriptmenge zurückzuführen***

Aufgrund der erhöhten Proteinmenge, die im Myzel des alten Wildstammes vorhanden ist, stellte sich die Frage, ob es sich hierbei um die Folge einer ebenfalls erhöhten

Transkriptmenge im seneszenten Stadium handeln kann. Im Rahmen von Northernblot-Analysen wurde gezeigt, dass die *PaMth1*-Transkriptmenge in drei unabhängigen alten Wildstämmen im Vergleich zu den entsprechenden jungen Wildtsämmen deutlich erhöht ist (s. Abb. 22). In keiner RNA-Probe aus einem jungen Stamm konnte dagegen ein Transkript nachgewiesen werden. Dieses wird allerdings mit Hilfe einer RT-PCR in der cDNA aus einem jungen Wildstamm nachgewiesen. Dieser Befund zeigt, dass in den jungen Stämmen eine relativ kleine Menge *PaMth*-Transkript vorhanden ist, die nur mit Hilfe der im Vergleich zum Northernblot sensitiveren RT-PCR nachgewiesen werden kann. Das Fehlen eines Transkripts in den jungen Stämmen würde einen Gegensatz zu der anschließend durchgeführten Westernblot-Analyse mit Gesamtproteinen aus einem jungen und einem alten Wildstamm darstellen. Diese Westernblot-Analyse wurde durchgeführt, nachdem ein Antikörper gegen ein Peptid von PaMTH1 in Kaninchen hergestellt und getestet worden war. Dadurch wurden im Rahmen der Westernblot-Analyse von Gesamtproteinen aus jungen und seneszenten Wildstämmen sowohl das Vorhandensein des PaMTH1-Proteins in der Probe aus dem jungen Stamm als auch der seneszenzspezifische Anstieg der Proteinmenge im seneszenten Stadium verifiziert (s. Abb. 23). Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, geht diese erhöhte Proteinmenge aus der erhöhten *PaMth1*-Transkriptmenge hervor. Die Gründe für den Anstieg in der Menge dieses Transkripts sind allerdings unklar. Es ist noch nicht sicher, ob es sich um eine Transkriptions-Induktion oder eine Transkript-Stabilisierung handelt.

### ***PaMTH1 ist in P. anserina sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium in den Mitochondrien lokalisiert***

Die Identifizierung von PaMTH1 als seneszenzspezifisch-gebildetes Protein in den mitochondrialen Proben aus *P. anserina* stellte, wie im Ergebnisteil beschrieben wird, ein unerwartetes Ergebnis dar. Wenn die PaMTH1-Sequenz mit Hilfe eines online-Programmes zur Identifizierung von mitochondrialen Eintransportsequenzen (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) überprüft wird, wird deutlich, dass für dieses Protein weder eine eindeutige mitochondriale Lokalisation, noch eine Sekretion vorausgesagt wird. Die Wahrscheinlichkeit, dass PaMTH1 im Mitochondrium zu finden ist, ist sehr gering, es kann jedoch auch nicht woanders eingeordnet werden. Aufgrund des Gegensatzes zwischen dem fehlenden Eintransportsignal und der Lokalisierung dieses Proteins in den mitochondrialen Proben während der differentiellen Proteomanalyse wurde eine

Lokalisationsanalyse von PaMTH1 mit Hilfe einer GFP-Fusion in *P. anserina* durchgeführt. Zusätzlich sollte so eine cytoplasmatische PaMTH1-Kontamination der mitochondrialen Proben, die für die Proteomanalyse verwendet wurden, ausgeschlossen werden.

In PaMTH1-GFP-bildenden Transformanten wurde das Fusionsprotein sowohl mit Hilfe konfokaler Lasermikroskopie als auch im Rahmen von Westernblot-Analysen nur im seneszenten Stadium in den Mitochondrien gefunden (s. Abb. 26). Dieser Befund ließ, solange keine Westernblot-Analyse mit dem PaMTH1-Antikörper durchgeführt worden war, die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei der Erhöhung der Menge von PaMTH1 in den Mitochondrien des alten Wildstammes, um die Folge einer seneszenzspezifischen Translokation des PaMTH1-Proteins aus dem Cytoplasma an oder in die Mitochondrien handeln könnte. Mit dem Peptid-Antikörper gegen PaMTH1 wurde das Protein jedoch in mitochondrialen Proben aus jungen und alten Wildstämmen detektiert. Ebenso wird anhand der Westernblot-Analysen der seneszenzspezifische Anstieg der PaMTH1-Menge in den Mitochondrien verifiziert.

Die genaue submitochondriale Lokalisation und ein endgültiger Ausschluss einer seneszenzspezifischen Translokation wurden mit Hilfe des „Digitonin-Assays“ gezeigt. Im Rahmen dieser Analyse wurde bestätigt, dass sich PaMTH1 sowohl in jungen als auch seneszenten Wildstämmen in der mitochondrialen Matrix befindet (s. Abb. 27). Hiemit handelt es sich um ein sehr interessantes neu identifiziertes Protein in den Mitochondrien von *P. anserina*, dessen Rolle während des Alterns noch unbekannt ist.

Um diese weiter zu analysieren, wurde in einem weiteren Schritt die Substratspezifität mit Hilfe eines spektrometrischen Aktivitätstest mit verschiedenen Methyltransferasesubstraten und einem heterolog aufgereinigten PaMTH1-Fusionsprotein aus *E. coli* untersucht.

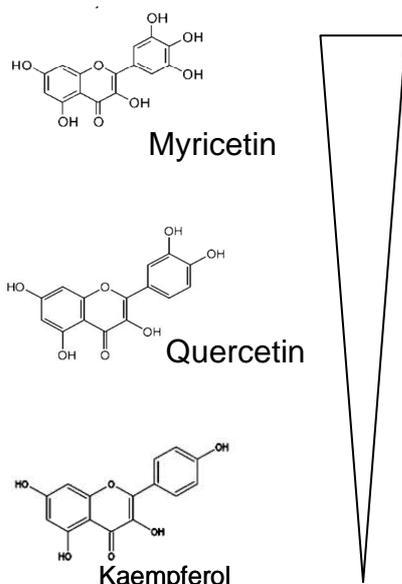
### ***Die Methylierung von Flavonoiden mit benachbarten Dihydroxylgruppen durch PaMTH1 gibt einen Hinweis auf die in vivo-Funktion***

Für den gekoppelten Test der Methyltransferaseaktivität wurde ein rekombinantes „strep-tag“-Fusionsprotein von PaMTH1 aus *E. coli* verwendet. Der „strep-tag“ wurde gewählt, weil er sehr klein ist (1 kDa) und die Aktivität des Proteins nicht zu sehr beeinflussen sollte. Außerdem ist es gelungen, dieses Fusionsprotein über eine Säule nativ in aktiver Form ohne Nebenprodukte aufzureinigen. Die Reinheit dieses Eluats wurde mit Hilfe einer Westernblot-Analyse mit einem PaMTH1-Antikörper gezeigt (s. Abb. 29). Somit konnten mit diesem Protein spezifische Substratstests durchgeführt werden. Zur Auswahl der entsprechenden

Substrate, die getestet werden sollten, wurde auf das Ergebnis der Stammbaumeinordnung von PaMTH1 zurückgegriffen. Dieses zeigt, dass PaMTH1 in die Klasse I der Methyltransferasen in die Nähe der pflanzlichen Methyltransferasen eingeordnet wird. Für Klasse I-Methyltransferasen aus Säugern und mittlerweile auch für einige Vertreter der pflanzlichen Klasse I-Methyltransferasen wurde in anderen Studien gezeigt, dass sie Flavonoide annehmen können, die eigentlich Substrate zahlreicher Klasse II-Methyltransferasen in Pflanzen darstellen (s. o). Der Befund, dass PaMTH1 in der Klasse I-Enzyme zusammen mit den beiden anderen Methyltransferasen aus Ascomyceten eine eigene Gruppe bildet, deutet darauf hin, dass dieses Enzym eine andere Substratspezifität und damit eine andere Funktion als die pflanzlichen Methyltransferasen in der Ligninbiosynthese haben muss. Im Rahmen des Substrattests wurden aus diesen Gründen verschiedene Flavonoide und Catechol als Testsubstrate eingesetzt.

Es zeigte sich, dass PaMTH1 reines Catechol sehr schlecht methyliert, das Flavonoid Myricetin dagegen bevorzugt methyliert. Auch die Flavonoide Quercetin, Luteolin und Eriodyctiol werden methyliert. Allerdings werden Quercetin und Luteolin wesentlich besser akzeptiert als Eriodyctiol. Die weiteren getesteten Flavonoide Apigenin, Kaempferol, Naringenin und zusätzlich L-DOPA und Thiophenol wurden dagegen nicht von PaMTH1 methyliert.

Das Ergebnis des Aktivitätstest zeigt, dass die Methyltransferase aus *P. anserina* bestimmte Flavonoide und in sehr geringem Maß auch Catechol als Substrate annimmt (s. Abb. 31). Die angenommenen Substrate müssen benachbarte Dihydroxylgruppen an einem Phenolring besitzen, denn nur Flavonoide dieser Art werden von PaMTH1 methyliert. Kaempferol oder Apigenin und auch Naringenin besitzen diese nicht und mit diesen drei Flavonoiden wurde keine Aktivität gemessen. Das Thiophenol, das beispielsweise keine OH-Gruppe besitzt, auf das die Methylgruppe übertragen werden könnte, wird ebenfalls nicht methyliert. Auch die Flavonoide, die jeweils nur eine OH-Gruppe besitzen, werden nicht angenommen. Überraschend wurde auch nicht L-DOPA als Substrat verwendet, obwohl es über zwei benachbarte Dihydroxylgruppen verfügt (s. Tab. 3). An diesem Befund zeigt sich deutlich, dass von PaMTH1 eher Stoffe akzeptiert werden könnten, die etwas größer sind und die über ein Ringsystem verfügen. In der Gruppe der akzeptierten Flavonoide existieren zusätzlich Abstufungen in den gemessenen Aktivitäten. Hier zeigt sich, dass mit steigender Anzahl der vorhandenen Hydroxylgruppen die Aktivitätsrate ebenfalls erhöht zu sein scheint (s. Abb. 49).



**Abb. 49: Zusammenhang zwischen der Anzahl der Hydroxylgruppen am B-Ring des Flavonoids und der PaMTH1-Spezifität.** Mit abnehmender Anzahl der Hydroxylgruppen am B-Ring nimmt die Akzeptanz (Pfeil) von PaMTH1 für das Substrat ab. Die Existenz von benachbarten Dihydroxylgruppen ist entscheidend. Substrate mit nur einer Hydroxylgruppe wie Kaempferol werden nicht methyliert.

Die generelle Voraussetzung für die Eignung als Substrat für PaMTH1 scheint das Vorhandensein von zwei benachbarten OH-Gruppen an einem Phenolring zu sein, eine zusätzliche Hydroxylgruppe verstärkt die Spezifität noch. Substanzen mit einer OH-Gruppe oder ohne OH-Gruppe werden nicht akzeptiert.

Diese Aktivitätsteste liefern eine Aussage über die chemischen Eigenschaften des *in vivo*-Substrats von PaMTH1. Es muss sich um einen Stoff handeln, der relativ groß ist und der benachbarte Dihydroxylgruppen besitzt. Diese Befunde lassen vermuten, dass PaMTH1 u. U. ähnlich wie die COMT in Säugern die Entstehung von reaktiven Stoffen durch Methylierung von Substraten mit Dihydroxylgruppen verhindert. Diese Stoffe können unter dem Einfluss einer erhöhten ROS-Menge oder in Verbindung mit Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer durch die Bildung von Semichinonen und ROS prooxidativ wirken (s. Einleitung). So wurde für die COMT in den Nervenzellen gezeigt, dass diese Toxifizierung durch eine Methylierung verringert wird (s. Einleitung). Eine Funktion von PaMTH1 bei der Verhinderung der Bildung von ROS durch die Methylierung von Stoffen, die benachbarte Dihydroxylgruppen besitzen, ist eine Option für ihre *in vivo*-Funktion. Weitere Befunde, die für diese PaMTH1-Wirkungsweise und den Schutz vor der Bildung reaktiver Substanzen sprechen, sind die Ergebnisse der Analyse der Modulation der *PaMth1*-Expression in *P. anserina*.

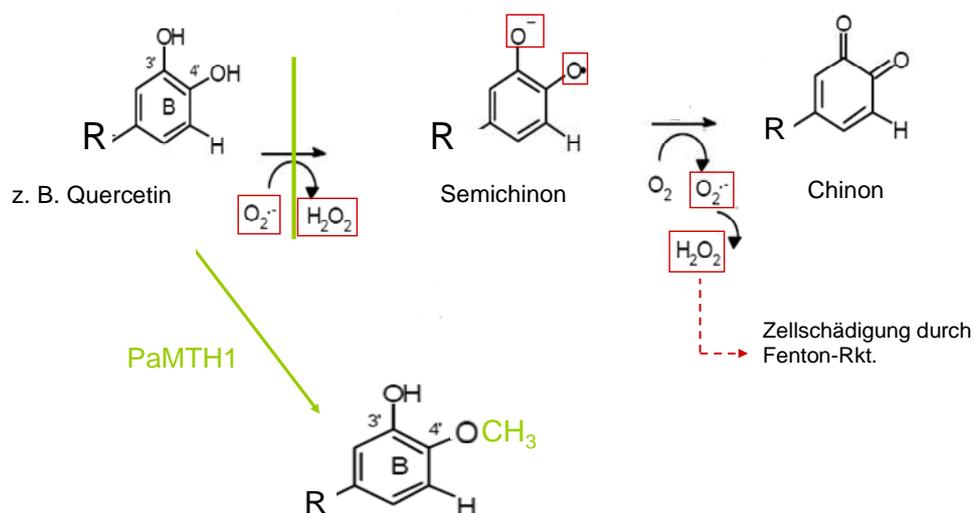
---

***Die Ergebnisse der Analyse der Modulation der PaMth1-Expression in P. anserina deuten auf eine Schutzwirkung von PaMTH1 hin***

Die konstitutive *PaMth1*-Überexpression und die daraus resultierende erhöhte Menge des PaMTH1-Proteins während der gesamten Lebenszeit der Mutanten hat u. a. zur Folge, dass die Proteincarbonylierungen im juvenilen und im seneszenten Stadium in Gesamtproteinen und in mitochondrialen Proteinen im Vergleich zum Wildstamm der Mutante deutlich verringert sind. Dies konnte mit Hilfe der „Oxyblot“-Analysen gezeigt werden (s. Abb. 35). Desweiteren zeigt die *PaMth1*-Überexpressionsmutante im Vergleich zum Wildstamm ein verbessertes Wachstum auf Kupfersulphat und Wasserstoffperoxid, beides Stoffe, bei denen ROS zugeführt wird (s. Abb. 36). Diese Befunde deuten auf einen optimierten Zustand aufgrund einer Verringerung der endogenen oxidativen Belastung hin. Um zu untersuchen, ob sich eine allgemein verbesserte physiologische Situation auch auf die Lebensspanne auswirkt, wurden die mittleren Lebensspannen des *PaMth1*-Überexpressionstammes und des Wildstammes auf PASM-Medium bestimmt und verglichen. Die statistisch und graphisch ausgewerteten Lebensspannendaten zeigen, dass die *PaMth1*-Überexpressionsstämme über eine um 115% verlängerte mittlere Lebensspanne im Vergleich zum Wildstamm verfügen (s. Abb. 37). Einen weiteren Hinweis auf die Schutzrolle von PaMTH1 gegen ROS geben die Ergebnisse der physiologischen Analyse der *PaMth1*-Überexpressionsstämme, denn diese zeigen weder im Sauerstoffverbrauch, in der Fertilität oder der Wachstumsrate unter normalen Bedingungen Unterschiede zum Wildstamm (s. Abb. 38). Zur Bestätigung und Komplementation dieser Ergebnisse, die auf eine Schutzfunktion von PaMTH1 hinweisen, wurden *PaMth1*-Deletionsmutanten von *P. anserina* hergestellt.

Passend zu diesen positiven Auswirkungen einer Überexpression von PaMTH1, die mit Hilfe von Westernblot-Analysen auf Proteinebene belegt wurde, zeigt die *PaMth1*-Deletion negative Auswirkungen sowohl auf die Resistenz gegen oxidativen Stress im Medium als auch auf die Lebensspanne. Die Wachstumsraten auf Wasserstoffperoxid und Kupfersulphat sind im Vergleich zum Wildstamm herabgesetzt (s. Abb. 42) und die *PaMth1*-Deletionsstämme zeigen eine 18%ige Verkürzung der mittleren Lebensspanne (s. Abb. 43). Bei der Analyse der Menge der carbonylierten Proteine dieses Stammes mittels „Oxyblot“ fällt jedoch auf, dass es nicht zu dem erwartungsgemäßen Anstieg der Carbonyle kommt, sondern, dass keine signifikanten Unterschiede im Gehalt der carbonylierten Proteine in den untersuchten Proben detektiert werden (s. Abb. 44). Dies entspricht nicht den Erwartungen. Allerdings ist zu dieser eindimensionalen gelelektrophoretischen Methode zum Nachweis der carbonylierten Proteine

zu festzustellen, dass kleinere Unterschiede im Carbonylierungsgrad der Proteine eher schlecht nachzuweisen sind. Es könnte sein, dass u. U. in den Deletionsmutanten wenige, aber wichtige Proteine stärker geschädigt sind als im Wildstamm. Dies könnte nur mit Hilfe einer 2D-„Oxyblot“-Analyse gezeigt werden. Da auch die Reversionsmutanten dieser *PaMth1*-Deletionsmutanten, die durch die Transformation der kompletten Kasette aus Promotorbereich, Gen und Terminatorbereich erhalten wurden, wieder eine normale Länge der Lebensspanne zeigen (s. Abb. 48), deuten die erhaltenen Befunde aus den Expressionsmodulations-Analysen darauf hin, dass *PaMth1* in *P. anserina* eine Schutzrolle gegen die Entstehung reaktiver Substanzen, die Proteinschädigungen verursachen, übernimmt. Aufgrund der PaMTH1-Substratspezifität für potentiell toxische Substanzen mit benachbarten Dihydroxylgruppen könnte die Schutzrolle darin bestehen, dass die Entstehung von ROS durch die Oxidation dieser OH-Gruppen durch die Methylierung dieser Stoffe verhindert wird (s. Abb. 50).



**Abb. 50: Putativer Mechanismus der Verhinderung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Methyltransferase-Aktivität von PaMTH1.** Durch die Oxidation von Stoffen, die eine Dihydroxylgruppen besitzen, werden im ersten Schritt die zellschädigenden Komponenten Wasserstoffperoxid und das Semichinon gebildet. Das Wasserstoffperoxid kann durch die Reaktion die Fenton-Reaktion zellschädigend über die Fenton-Reaktion wirken und das Semichinon kann durch die Reaktion mit Sauerstoff neues Wasserstoffperoxid generieren. Diese Reaktionsabfolge kann durch die Methylierung einer der beiden Hydroxylgruppen verhindert werden (Zhu et al., 1994).

Zusammenfassend geben die erhaltenen Ergebnisse der Analyse der Rolle von PaMTH1 während des Alterns in *P. anserina* einen deutlichen Hinweis auf die Verhinderung der Entstehung von ROS durch die Methylierung eines Stoffes, der nicht-methyliert durch die Reaktion mit ROS zur Generierung von weiteren ROS führt. Mit Hilfe der ungerichteten Proteomanalysen wurde somit ein neues Protein identifiziert, das während der Alterung eine bedeutende Schutzrolle übernimmt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es mit Hilfe der

Identifizierung von Flavonoiden mit benachbarten Dihydroxylgruppen als *in vitro*-Substrate des rekombinanten PaMTH1-Proteins gelungen, erste Informationen über den Mechanismus, der für den lebensspannenverlängernden Effekt der *PaMth1*-Überexpression verantwortlich ist, zu gewinnen. Allerdings wurde das *in vivo*-Substrat und damit die putativ-toxische Substanz, die vor allem während der Alterns unter normalen Umständen im Wildstamm eine schädigende Wirkung auszuüben scheint, mit Hilfe der vorliegenden Analysen nicht identifiziert.

Bei den angebotenen Flavonoiden handelt es sich um „Modell“-Substrate, die sehr wahrscheinlich in ihrer Struktur dem *in vivo*-Substrat ähneln. Obwohl es nicht ganz auszuschließen ist, dass es sich bei dem *in vivo*-Substrat beispielsweise auch um Myricetin oder Quercetin handeln könnte, denn *P. anserina* lebt auf Herbivorendung und so könnte eine Aufnahme dieser Stoffe aus den pflanzlichen Überresten in diesem Habitat möglich sein. Diese Flavonoide könnten u. U. als Antioxidanz oder zumindest als relativ neutrale Substanz in einem mittelalten „gesunden“ *P. anserina*-Stamm vorhanden sein. Im alten Stamm ändert sich jedoch die physiologische Situation, u. a. nimmt z. B. sehr wahrscheinlich die ROS-Bildung aufgrund einer fortschreitenden Schädigung der Atmungskettenkomplexe zu und zusätzlich wurde gezeigt, dass die Kupferkonzentration im Cytoplasma des Pilzes während der Alterns ansteigt (Scheckhuber et al., 2009). Unter diesen Umständen könnten die Flavonoiden durch die Reaktion mit den vorhandenen ROS oder mit Kupfer prooxidativ wirken und zusätzlich eine Quelle von ROS darstellen, also eine zellschädigende Wirkung zeigen. Dies würde auch die verstärkte Bildung von PaMTH1 als Schutzenzym im alten Wildstamm erklären. Trotzdem bleiben noch Fragen unbeantwortet.

## 7 Ausblick

### A) Identifizierung eines Substrats durch massenspektrometrische Analysen von *P. anserina*-Zellextrakten

Um die Hypothese der Verhinderung der Bildung gefährlicher Semichinone durch eine Methylierung eines toxischen Stoffes genauer zu belegen, muss das *in vivo*-Substrat identifiziert werden. Somit können beispielsweise die Herkunft des Substrats bestimmt und eine Aussage über die ersten Ziele der oxidativen Schädigung durch das unmethylierte Substrat in der Reaktion mit ROS getroffen werden. Es könnte untersucht werden, ob es sich um einen von außen aufgenommenen Stoff handelt oder beispielsweise um ein Auf- oder Abbauprodukt in einem bestimmten Stoffwechselweg. Wenn es gelingt, ein PaMTH1-Substrat mit benachbarten Dihydroxylgruppen zu identifizieren, kann die Bildung von ROS beispielsweise in der Reaktion dieses Stoffes mit Wasserstoffperoxid und Kupfersulphat mittels EPR-Messungen belegt werden (Garlick *et al.*, 1987; Ashton *et al.*, 1998). Jedoch ist die Identifizierung eines *in vivo*-Substrats von Methyltransferasen, die kleine Metabolite oder Stoffe wie die Flavonoide methylieren und der anschließende Nachweis der methylierten Komponenten in einem Zellextrakt nicht einfach. Ein Ansatz könnte beispielsweise die Analyse mit Hilfe einer HPLC-Auftrennung und der anschließenden massenspektrometrischen, vergleichenden Untersuchung der Zusammensetzung von Zellextrakten aus dem *P. anserina* Wildstamm, der *PaMth1*-Überexpressions- und *PaMth1*-Deletionsstämmen darstellen. Es müsste sich in den Extrakten aus der Überexpressionsmutante eine größere Menge eines methyliertes Produktes befinden, während sich in den Extrakten aus den Deletionsmutanten u. U. das unmethylierte Substrat ansammelt. Diese Stoffe könnten beispielsweise mit Hilfe von NMR-Analysen genauer untersucht werden. Dadurch ist es möglich, die chemischen Eigenschaften und die Struktur des *in vivo*-Substrats der Methyltransferase PaMTH1 zu charakterisieren und einen Eindruck über das Vorkommen und die *in vivo*-Funktion dieses Substrates zu bekommen.

Ein weiterer Ansatz zur Klärung der Frage, ob PaMTH1 *in vivo* Flavonoide methyliert, ist der Vergleich der Extrakte aus diesen drei Stämmen, die vorher auf Flavonoid-haltigem Medium angezogen wurden. Hier sollte es mittels massenspektrometrischer Untersuchungen möglich sein, das Vorhandensein der methylierten Flavonoide im Extrakt dieser Stämme durch den Vergleich der Spektren mit den Referenzspektren der nicht-methylierten und der methylierten

Flavonoide nachzuweisen (Salyan et al., 2006). Hierbei müssten sich auch wieder Unterschiede in den Zusammensetzungen der *PaMth1*-Deletionsmutante und der – Überexpressionsmutante zeigen. Kommt es zur Übereinstimmung der aufgenommenen Spektren der Produkte mit den Spektren der methylierten Referenzstoffe, gibt dies einen Hinweis darauf, dass die Flavonoide durch das Myzel aufgenommen und methyliert werden konnten. Dieses könnte dann auch unter normalen Bedingungen im Umfeld des Habitats des Herbivorendungs der Fall sein.

### ***B) Analyse der PaMTH1-Struktur zur Untersuchung der Reaktionsweise und der Eigenschaften des Substrats***

Zur Aufklärung der Frage nach dem *in vivo*-Substrat ist ebenfalls die Untersuchung der dreidimensionalen Struktur von PaMTH1 mit Hilfe von Röntgenstruktur- oder NMR-Analysen hilfreich. Durch die Strukturanalyse des aufgereinigten und kristallisierten Proteins und dem anschließenden Vergleich mit anderen, bereits aufgeklärten Methyltransferase-Strukturen ergibt sich die Möglichkeit einer Aussage über die für die Methylierungen wichtigen Regionen des Proteins und den Reaktionsablauf der Methylierung. Diese Informationen geben gleichzeitig Hinweise auf die Beschaffenheit der Substrate. Diese Untersuchung könnten einen erheblichen Beitrag zur Aufklärung und Verifizierung der in der vorliegenden Arbeit vorgeschlagenen Wirkungsweise von PaMTH1 liefern, denn es könnten beispielsweise „docking“-Experimente mit der erhaltenen Struktur und verschiedenen Klassen von Substrate durchgeführt werden, um Daten über den Reaktionsablauf und weitere Substrate zu erhalten.

### ***C) Identifizierung der „Ziele des Schutzes durch PaMTH1“ und Analyse der Auswirkung dieser Schutzreaktion***

Neben der Strukturaufklärung und der Frage nach dem *in vivo*-Substrat ergibt sich die Frage nach einer weitergehenden biologischen Auswirkung der Methylierung des *in vivo*-Substrats und der damit verbundenen Herabsetzung der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies. In der vorliegenden Arbeit konnte in den *PaMth1*-Überexpressionsmutanten gezeigt werden, dass der Anteil der carbonylierten Proteine in diesen Stämmen sowohl in den mitochondrialen als auch im Gesamtproteinextrakt deutlich vermindert ist. Dies könnte eine bedeutende Ursache für die Langlebigkeit dieser Stämme darstellen, da beispielsweise wichtige Enzyme des Energiestoffwechsel im Mitochondrium weniger oxidiert werden und somit länger

funktionstüchtig bleiben. Dies könnte die Erklärung für die verbesserte physiologische Situation und die beobachtete Lebensspannenverlängerung der *PaMth1*-Überexpressionsmutanten sein. Mit Hilfe einer zweidimensionalen „Oxyblot“-Analyse von Gesamtproteinextrakten und mitochondrialen Proteinen ist es möglich, die weniger carbonylierten, vor ROS-geschützten Proteine in dem Proteom der *PaMth1*-Überexpressionstransformanden zu identifizieren (Johansson et al., 2004). Dies könnte auf durch einen Abgleich der erhaltenen Proteinmuster der carbonylierten Proteine mit Westernblot-Analysen mit den im Arbeitskreis vorhandenen Antikörpern gegen einzelne Proteine, von denen bekannt ist, dass sie ROS-empfindlich sind, geschehen Dies könnte z. B. mit der mitochondrialen Aconitase durchgeführt werden und zusätzlich könnten spektrophotometrische Aktivitätsanalysen zu den erhaltenen Daten in Bezug gesetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Identifizierung neuer, unbekannter Proteine, die weniger carbonyliert sind mit Hilfe einer zweidimensionalen „Oxyblot“-Analyse, die mit MALDI/TOF-Analysen gekoppelt ist. Diese Daten würden einen Hinweis auf die direkten Ziele des Schutzes durch die Verhinderung der Bildung von ROS in den Zellen von *P. anserina* geben. Somit könnte u. U. der Mechanismus der Lebensverlängerung weiter aufgeklärt werden. Anhand eines Vergleichs des Musters der weniger carbonylierten Proteine aus der *PaMth1*-Überexpressionsmutante mit den Proteinen aus anderen langlebigen Mutanten, die weniger carbonylierte Proteine zeigen, z. B. Überexpressionsmutanten der *P. anserina* LON-Protease, bei der die Proteinqualitätskontrolle verbessert ist, können Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den Mechanismen der Lebensverlängerung in diesen Mutanten aufgedeckt werden. Mit Hilfe der Analyse der Unterschiede, die durch die genetische Manipulation einer Komponente der ROS-Generierung (PaMTH1) oder der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle (PaLON) hervorgerufen werden, wird in diesen Studien verdeutlicht, welche Ansatzpunkte zur Lebensspannenverlängerung in *P. anserina* für existieren.

## 8 Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen führten zu folgenden Ergebnissen:

### **1. Eindimensionale Gelelektrophoresen**

Die Analyse mitochondrialer Proteine aus juvenilen und seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen mit Hilfe von eindimensionaler SDS- und eindimensionalen Blau-Nativen-Gelelektrophoresen zeigt keine deutlichen, seneszenzspezifischen Unterschiede. Im Gegensatz dazu werden in initialen Versuchen der nicht-radioaktiven 2D-PAGE differentiell-gebildete Proteine visualisiert.

### **2. 2D-PAGE mit radioaktiv-markierten, mitochondrialen Proteinen aus jungen und alten *P. anserina*-Wildstämmen.**

In der ungerichteten Proteomanalyse wurden 29 differentiell-gebildete Proteine identifiziert und zusätzlich zahlreiche Isoformen einiger Proteine gezeigt.

Von der  $\beta$ -ATPase wurden modifizierte Isoformen gefunden. Außerdem wurde eine seneszenzspezifisch verringerte Bildung von ROS-Abwehr-Proteinen in den Mitochondrien detektiert. Im Gegensatz dazu wurde eine größere Menge eines Chaperons gefunden, das bei der Proteinsynthese eine Rolle spielt: eine Protein-Disulfid-Isomerase, die die Umlagerung und Neubildung von Di-Sulfid-Brücken bei der Faltung von Proteinen katalysiert. Zusätzlich wurde eine erhöhte Menge des Proteins SSC1 identifiziert. Dieses gehört zur Hsp70-Hitzeschock-Proteinfamilie. Es wurde ebenfalls eine erhöhte Menge des Apoptosefaktors Cyclophilin D in den mitochondrialen Proben aus den seneszenten Wildstämmen identifiziert. Die Identifizierung dieses Proteins in Mitochondrien von *P. anserina* stellt neben der Charakterisierung der Metacaspasen (Hamann et al., 2007) einen weiteren Ansatzpunkt für die Apoptoseforschung in *P. anserina* dar. Die molekularbiologische Analyse dieses Proteins wurde aufgrund dieser Proteomanalyse im Arbeitskreis aufgenommen (Dissertation D. Brust). Ein weiteres Protein, das in stark erhöhter Menge in den Proteinisolaten identifiziert wurde, ist PaMTH1. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Struktur und die Funktion dieser neu identifizierten differentiell-gebildeten Methyltransferase während der Alterung in

*P. anserina* mit Hilfe molekularbiologischer, biochemischer und physiologischen Analysen untersucht.

### 3. Charakterisierung von PaMTH1

Im Rahmen von Northernblot-Analysen wurde gezeigt, dass die *PaMth1*-Transkriptmenge in drei unabhängigen alten Wildstämmen im Vergleich zu den entsprechenden jungen Wildtsämmen deutlich erhöht ist. In einer Westernblot-Analyse von Gesamtproteinen und Mitochondrien aus jungen und seneszenten Wildstämmen wird der seneszenzspezifische Anstieg der Proteinmenge verifiziert. Die genauere Einordnung von PaMTH1 in die Klasse I der Methyltransferasen und die Ergebnisse der Analyse der Substratspezifität geben einen Hinweis auf eine Schutzfunktion durch die Verhinderung einer ROS-Entstehung unter der Beteiligung von Substanzen mit einer Catecholgruppe. Die Ergebnisse der Analyse der Modulation der *PaMth1*-Expression in *P. anserina* deuten ebenfalls auf eine Schutzwirkung von PaMTH1 hin: *PaMth1*-Überexpressionsstämme zeigen eine verbesserte Wachsrate auf stress-induzierenden Medien, weniger carbonylierte Proteine und vor allem eine verlängerte Lebensspanne ohne physiologische Nachteile im Vergleich zum Wildstamm. Dagegen lebt die *PaMth1*-Deletionsmutante kürzer und wächst schlechter auf ROS-induzierenden Medien, Sie zeigt allerdings keine erhöhte Menge von carbonylierten Proteinen im eindimensionalen „Oxyblot“. Die beobachtete Lebensspannenverkürzung der *PaMth1*-Deletionsmutante wird jedoch durch die Reversion dieser Stämme wieder aufgehoben, sodass die Hypothese des Schutzes vor der ROS-Generierung durch die Methylierung von Dihydroxylgruppen anhand der erhaltenen Daten unterstützt wird.

## 9 Literatur

Addabbo,F., Montagnani,M. und Goligorsky,M.S. (2009). Mitochondria and Reactive Oxygen Species. *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.130054

Averbeck,N.B., Jensen,O.N., Mann,M., Schägger,H. und Osiewacz,H.D. (2000). Identification and characterization of PaMTH1, a putative *o*-methyltransferase accumulating during senescence of *Podospora anserina* cultures. *Curr. Genet.* **37**, 200-208.

Bai,H.W., Shim,J.Y., Yu,J. und Zhu,B.T. (2007). Biochemical and molecular modeling studies of the O-methylation of various endogenous and exogenous catechol substrates catalyzed by recombinant human soluble and membrane-bound catechol-O-methyltransferases. *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1409-1425.

Bors,W., Heller,W., Michel,C. und Saran,M. (1990a). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol.* **186**, 343-355.

Bors,W., Heller,W., Michel,C. und Saran,M. (1990b). Radical chemistry of flavonoid antioxidants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**, 165-170.

Bota,D.A. und Davies,K.J. (2002). Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism. *Nat. Cell Biol.* **4**, 674-680.

Bota,D.A., Ngo,J.K. und Davies,K.J. (2005). Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 665-677.

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.

Bravo,L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* **56**, 317-333.

Brown,J.E., Khodr,H., Hider,R.C. und Rice-Evans,C.A. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu<sup>2+</sup> ions: implications for their antioxidant properties. *Biochem. J.* **330**, 1173-1178.

Busam,G., Junghanns,K.T., Kneusel,R.E., Kassemeyer,H.H. und Matern,U. (1997). Characterization and expression of caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase proposed for the induced resistance response of *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol.* **115**, 1039-1048.

Cabiscol,E., Belli,G., Tamarit,J., Echave,P., Herrero,E. und Ros,J. (2002). Mitochondrial Hsp60, resistance to oxidative stress, and the labile iron pool are closely connected in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**, 44531-44538.

Canada,A.T., Giannella,E., Nguyen,T.D. und Mason,R.P. (1990). The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 441-449.

Cao,G. und Cutler,R.G. (1995). Protein oxidation and aging. I. Difficulties in measuring reactive protein carbonyls in tissues using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Arch. Biochem. Biophys.* **320**, 106-114.

- Cao,G., Sofic,E. und Prior,R.L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 749-760.
- Carrette,O., Burkhard,P.R., Hochstrasser,D.F. und Sanchez,J.C. (2006). Age-related proteome analysis of the mouse brain: a 2-DE study. *Proteomics*. **6**, 4940-4949.
- Cavalieri,E., Frenkel,K., Liehr,J.G., Rogan,E. und Roy,D. (2000). Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr* 75-93.
- Chakravarti,B., Seshi,B., Ratanaprayul,W., Dalal,N., Lin,L., Raval,A. und Chakravarti,D.N. (2009). Proteome profiling of aging in mouse models: differential expression of proteins involved in metabolism, transport, and stress response in kidney. *Proteomics*. **9**, 580-597.
- Chang,J., Cornell,J.E., Van,R.H., Hakala,K., Ward,W.F. und Richardson,A. (2007). Effect of aging and caloric restriction on the mitochondrial proteome. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **62**, 223-234.
- Chen,Y.R., Chen,C.L., Zhang,L., Green-Church,K.B. und Zweier,J.L. (2005). Superoxide Generation from Mitochondrial NADH Dehydrogenase Induces Self-inactivation with Specific Protein Radical Formation. *J. Biol. Chem.* **280**, 37339-37348.
- Chung,W.G., Miranda,C.L. und Maier,C.S. (2008). Detection of carbonyl-modified proteins in interfibrillar rat mitochondria using N'-aminooxymethylcarbonylhydrazino-D-biotin as an aldehyde/keto-reactive probe in combination with Western blot analysis and tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* **29**, 1317-1324.
- Cipolat,S., Rudka,T., Hartmann,D., Costa,V., Serneels,L., Craessaerts,K., Metzger,K., Frezza,C., Annaert,W., D'Adamio,L., Derks,C., Dejaegere,T., Pellegrini,L., D'Hooge,R., Scorrano,L., De Strooper,B. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163-175.
- Considine,M.J., Goodman,M., Echtay,K.S., Laloi,M., Whelan,J., Brand,M.D. und Sweetlove,L.J. (2003). Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 22298-22302.
- Dean,R.T.,Fu,S, Stocker,R und Davies,M.J. (1997). Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* **15**, 1-18.
- Dei,R. *et al.* (2002). Lipid peroxidation and advanced glycation end products in the brain in normal aging and in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **104**, 113-122.
- Desagher,S. und Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* **10**, 369-377.
- De Souza,R.F.V., Sussuchi,E.M., und De Giovanni,W.F. (2003). Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chem.* **33**, 1125-1144.
- Devanesan,P., Todorovic,R., Zhao,J., Gross,M.L., Rogan,E.G. und Cavalieri,E.L. (2001). Catechol estrogen conjugates and DNA adducts in the kidney of male Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol: potential biomarkers for estrogen-initiated cancer. *Carcinogenesis* **22**, 489-497.
- Di,F.,V, Ardizzone,N., Marciano,V., Bartolotta,T., Cappello,F., Farina,F. und Zummo,G. (2005). Senescence-associated HSP60 expression in normal human skin fibroblasts. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* **284**, 446-453.

- Dröse,S. und Brandt,U. (2008). The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **283**, 21649-21654.
- Esser,K. (1974). *Podospora anserina*. In: *Handbook of Genetics*, ed. R.C.King New York: Plenum Press, 531-551.
- Finley,E.L., Dillon,J., Crouch,R.K. und Schey,K.L. (1998). Identification of tryptophan oxidation products in bovine alpha-crystallin. *Protein Sci.* **7**, 2391-2397.
- Flint,D.H., Tuminello,J.F. und Emptage,M.H. (1993). The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**, 22369-22376.
- Frese,D. und Stahl,U. (1992). Oxidative stress and ageing in the fungus *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 277-288.
- Frezza,C. et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189.
- Glomb,M.A. und Pfahler,C. (2001). Amides Are Novel Protein Modifications Formed by Physiological Sugars. *J. Biol. Chem.* **276**, 41638–41647.
- Gredilla,R., Grief,J. und Osiewacz,H.D. (2006). Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospora anserina*. *Exp. Gerontol.* **41**, 439-447.
- Groebe,K., Krause,F., Kunstmann,B., Unterluggauer,H., Reifschneider,N.H., Scheckhuber,C.Q., Sastri,C., Stegmann,W., Wozny,W., Schwall,G.P., Poznanović,S., Dencher,N.A., Jansen-Dürr,P., Osiewacz,H.D., Schratzenholz,A. (2007). Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. *Exp. Gerontol.* **42**, 887-898.
- Gutteridge,C., Winyard,P.G., Blake,D.R., Lunec,J., Brailsford,S. und Halliwell,B. (1985). The behaviour of caeruloplasmin in stored human extracellular fluids in relation to ferroxidase II activity, lipid peroxidation and phenanthroline-detectable copper. *Biochem. J.* **230**, 517-523.
- Halliwell,B. und Gutteridge,J.M.C. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1-14.
- Hamann,A., Brust,D. und Osiewacz,H.D. (2007). Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.* **65**, 948-958.
- Harman,D. (1956). A theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* **11**, 298-300.
- Hartl,F.U., Schmidt,B., Wachter,E., Weiss,H. und Neupert,W. (1986). Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase *Cell* **47**, 939-951.
- Hunzinger,C., Wozny,W., Schwall,G.,Poznanovic,S., Stegmann,W., Zengerling,H., Schoepf,R., Groebe,K., Cahill,M., Osiewacz,H.D, Jägemann,N., Bloch,M., Dencher,N.A., Krause,F., Schratzenholz,A. (2006). Comparative profiling of the mammalian mitochondrial proteome: multiple aconitase-2 isoforms including N-formylkynurenine modifications as part of a protein biomarker signature for reactive oxidative species. *J. Proteome. Res.* **5**, 625-633.

- Ibdah, M., Zhang, X.H., Schmidt, J. und Vogt, T. (2003). A novel  $Mg^{2+}$ -dependent O-methyltransferase in the phenylpropanoid metabolism of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Biol. Chem.* **278**, 43961-43972.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. und Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* **25**, 2966-2977.
- Johansson, E., Olsson, O. und Nyström, T. (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 22204-22208.
- Joshi, C.P. und Chiang, V.L. (1998). Conserved sequence motifs in plant S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases. *Plant Mol Biol.* **37**, 663-674.
- Kagan, R.M. und Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 417-427.
- Kanski, J., Hong, S.J. und Schöneich, C. (2005). Proteomic analysis of protein nitration in aging skeletal muscle and identification of nitrotyrosine-containing sequences in vivo by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **280**, 24261-24266.
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. und Tabtlang, R. (1993). A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366**, 461-464.
- Kirkwood, T.B. (2002). Molecular gerontology. *J. Inherit. Metab. Dis.* **25**, 189-196.
- Kirkwood, T.B. und Austad, S.N. (2000). Why do we age? *Nature* **408**, 233-238.
- Kopycki, J.G., Stubbs, M.T., Brandt, W., Hagemann, M., Porzel, A., Schmidt, J., Schliemann, W., Zenk, M.H. und Vogt, T. (2008). Functional and structural characterization of a cation-dependent O-methyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **283**, 20888-20896.
- Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A. und Osiewacz, H.D. (2004). Supramolecular Organization of Cytochrome c Oxidase- and Alternative Oxidase-dependent Respiratory Chains in the Filamentous Fungus *Podospira anserina*. *J. Biol. Chem.* **279**, 26453-26461.
- Kück, U., Kappelhoff, B., und Esser, K. (1985). Despite mtDNA polymorphism the mobile intron (pDNA) of the COI gene is present in ten different races of *Podospira anserina*. *Curr. Genet.* **10**, 59-67.
- Kuhla, B., Haase, C., Flach, K., Luth, H.J., Arendt, T., und Munch, G. (2007). Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation. *J. Biol. Chem.* **282**, 6984-6991.
- Kunstmann, B. und Osiewacz, H.D. (2008). Over-expression of an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase leads to an extended lifespan of *Podospira anserina* without impairments in vital functions. *Aging Cell* **7**; 651-62
- Kunstmann, B. und Osiewacz, H.D. (2009). The S-adenosylmethionine dependent O-methyltransferase PaMTH1: a longevity assurance factor protecting *Podospira anserina* against oxidative stress. *Aging* **1**; 328-334.

- Lanthier,J., Bouthillier,A., Lapointe,M., Demeule,M., Beliveau,R., und Desrosiers,R.R. (2002). Down-regulation of protein L-isoaspartyl methyltransferase in human epileptic hippocampus contributes to generation of damaged tubulin. *J. Neurochem.* **83**, 581-591.
- Lecellier,G. und Silar,P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* **25**, 122-123.
- Leidhold,C. und Voos,W. (2007). Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1113**, 72-86.
- Liehr,J.G. und Roy,D. (1990). Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic. Biol. Med.* **8**, 415-423.
- Liu,Y. und Steinacker,J.M. (2001). Changes in skeletal muscle heat shock proteins: pathological significance. *Front Biosci.* **6**, D12-D25.
- LoPachin,R.M., Jones,R.C., Patterson,T.A., Slikker,W., Jr., und Barber,D.S. (2003). Application of proteomics to the study of molecular mechanisms in neurotoxicology. *Neurotoxicology* **24**, 761-775.
- Lopez,J.L. (2007). Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **849**, 190-202.
- Luce,K und Osiewacz,H.D. (2009). Increasing organism health span by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat. Cell Biol* (angenommen)
- Lumb,R.A. und Bulleid,N.J. (2002). Is protein disulfide isomerase a redox-dependent molecular chaperone? *EMBO J.* **21**, 6763-6770.
- Marcillat,O., Zhang,Y., Lin,S.W. und Davies,K.J. (1988). Mitochondria contain a proteolytic system which can recognize and degrade oxidatively-denatured proteins. *Biochem. J.* **254**, 677-683.
- Marcou,D. (1961). Notion de longevite et nature cytoplasmatique du determinant de senescence chez quelques champignons. *Ann. Sci. Natur. Bot.* 653-764.
- McDonald,T.G. und Van Eyk,J.E. (2003). Mitochondrial proteomics. Undercover in the lipid bilayer. *Basic Res. Cardiol.* **98**, 219-227.
- Metodiewa,D., Jaiswal,A.K., Cenas,N., Dickancaite,E. und Segura-Aguilar,J. (1999). Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic. Biol. Med.* **26**, 107-116.
- Mitsumoto,A., Takeuchi,A., Okawa,K. und Nakagawa,Y. (2002). A subset of newly synthesized polypeptides in mitochondria from human endothelial cells exposed to hydroperoxide stress. *Free Radic. Biol. Med.* **32**, 22-37.
- Monnier,V.M., Sell,D.R., Nagaraj,R.H., Miyata,S., Grandhee,S., Odetti,P. und Ibrahim,S.A. (1992). Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes* **41 Suppl 2**, 36-41.
- Morcos,M. *et al.* (2008). Glyoxalase-1 prevents mitochondrial protein modification and enhances lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **7**, 260-269.
- Morel,I., Lescoat,G., Cillard,P. und Cillard,J. (1994). Role of flavonoids and iron chelation in antioxidant action. *Methods Enzymol.* **234**, 437-443.

- Nijtmans,L.G., de,J.L., Artal,S.M., Coates,P.J., Berden,J.A., Back,J.W., Muijsers,A.O., van der,S.H. und Grivell,L.A. (2000). Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J.* **19**, 2444-2451.
- Nyström,T. (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* **24**, 1311-1317.
- Osiewacz,H.D. (2002a). Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 755-764.
- Osiewacz,H.D. (2002b). Genes, mitochondria and aging in filamentous fungi. *Ageing Res. Rev.* **28**, 1-18.
- Palma,E., Tiepolo,T., Angelin,A., Sabatelli,P., Maraldi,N.M., Basso,E., Forte,M.A., Bernardi,P. und Bonaldo,P. (2009). Genetic ablation of cyclophilin D rescues mitochondrial defects and prevents muscle apoptosis in collagen VI myopathic mice. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddp126
- Parl,F.F., Dawling,S., Roodi,N. und Crooke,P.S. (2009). Estrogen metabolism and breast cancer: a risk model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1155**, 68-75.
- Pearl, R., (1928). The rate of living, A. A. Knopf, Inc., New York, 1-184.
- Pietta,P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.
- Perron,N., und Brumaghim,J.L. (2009). A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol Compounds Related to Iron Binding. *Cell Biochem. Biophys.* **53**, 75-100
- Pietta,P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035-1042.
- Prillinger,H. und Esser,K. (1977). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol. Gen. Genet.* **156**, 333-345.
- Rabbani,N. und Thornalley,P.J. (2008). Dicarbonyls linked to damage in the powerhouse: glycation of mitochondrial proteins and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1045-1050.
- Rice-Evans,C.A., Miller,N.J. und Paganga,G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* **20**, 933-956.
- Rigobello,M.P., Donella-Deana,A., Cesaro,L. und Bindoli,A. (2000). Isolation, purification, and characterization of a rat liver mitochondrial protein disulfide isomerase. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 266-272.
- Robaszekiewicz,A., Balcerczyk,A. und Bartosz,G. (2007). Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol. Int.* **31**, 1245-1250.
- Roberts,J.E. und Dillon,J. (1989). Comparison of endogenous and exogenous photosensitization in the lens using in vitro and photophysical studies. *Lens Eye Toxic. Res.* **6**, 309-318.
- Salyana,M.E.K, Pedicordb, D.L L., Bergeronb,L.,Mintierc,A., Hunihand,L., Kuitc,K., Balandae,L.A., Robertsons,B.J., Federc J., Westphald,R., Shipkovaa,P.A. und Blat,Y. (2006). A general liquid chromatography/mass spectroscopy-based assay for detection and quantitation of methyltransferase activity. *Anal. Biochem.* **349**, 112-117.

- Scheckhuber,C.Q., Erjavec,N., Tinazli,A., Hamann,A., Nyström,T. und Osiewacz,H.D. (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. *Nat. Cell Biol.* **9**, 99-105.
- Scheckhuber,C.Q., Grief,J., Boilan,E., Luce,K., bacq-Chainiaux,F., Rittmeyer,C., Gredilla,R., Kolbesen,B.O., Toussaint,O. und Osiewacz,H.D. (2009). Age-related cellular copper dynamics in the fungal ageing model *Podospora anserina* and in ageing human fibroblasts. *PLoS. ONE* **4**, e4919.
- Schieke,S.M., Phillips,D., McCoy,J.P., Jr., Aponte,A.M., Shen,R.F., Balaban,R.S. und Finkel,T. (2006). The mTOR pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. *J. Biol. Chem.* **281**, 27643-27652
- Schulte,E., Kück,U. und Esser,K. (1988). Extrachromosomal mutants from *Podospora anserina*: Permanent vegetative growth in spite of multiple recombination events in the mitochondrial genome. *Mol. Gen. Genet.* **211**, 342-349.
- Shringarpure,R., Grune,T. und Davies,K.J. (2001). Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol. Life Sci.* **58**, 1442-1450.
- Sickmann,A. *et al.* (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 13207-13212.
- Snow,L.M., Fugere,N.A. und Thompson,L.V. (2007). Advanced glycation end-product accumulation and associated protein modification in type II skeletal muscle with aging. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* **62**, 1204-1210.
- Stahl,U., Tudzynski,P., Kück,U. und Esser,K. (1979). Plasmid-like DNA in Senescent Cultures of the Ascomycetous Fungus *Podospora anserina*. *Z. Physiol. Chem.* **360**, 1045.
- Stumpferl,S.W., Stephan,O. und Osiewacz,H.D. (2004). Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. *Eukaryotic Cell* **3**, 200-211.
- Sukdeo,N., Clugston,S.L., Daub,E. und Honek,J.F. (2004). Distinct classes of glyoxalase I: metal specificity of the *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Neisseria meningitidis* enzymes. *Biochem. J.* **384**, 111-117.
- Suzuki,C.K., Suda,K., Wang,N. und Schatz,G. (1994). Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration. *Science* **264**, 273-276.
- Takeda,A. *et al.* (2001). Neuronal and glial advanced glycation end product [Nepsilon-(carboxymethyl)lysine] in Alzheimer's disease brains. *Acta Neuropathol.* **101**, 27-35.
- Taylor,S.W., Fahy,E., Murray,J., Capaldi,R.A. und Ghosh,S.S. (2003). Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 19587-19590.
- Unterluggauer,H., Mazurek,S., Lener,B., Hutter,E., Eigenbrodt,E., Zwerschke,W. und Jansen-Dürr,P. (2008). Premature senescence of human endothelial cells induced by inhibition of glutaminase. *Biogerontology*. **9**, 247-259.
- Valle,A., Silvestri,E., Moreno,M., Chambery,A., Oliver,J., Roca,P. und Goglia,F. (2008). Combined effect of gender and caloric restriction on liver proteomic expression profile. *J. Proteome. Res.* **7**, 2872-2881.

- Van Deyck,L. und Langer,T. (1999). ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Life Sci.* **56**, 825-842.
- Vernon,D.M. und Bohnert,H.J. (1992). Increased Expression of a myo-Inositol Methyl Transferase in *Mesembryanthemum crystallinum* Is Part of a Stress Response Distinct from Crassulacean Acid Metabolism Induction. *Plant Physiol.* **99**, 1695-1698.
- Verzijl,N., DeGroot,J., Oldehinkel,E., Bank,R.A., Thorpe,S.R., Baynes,J.W., Bayliss,M.T., Bijlsma,J.W., Lafeber,F.P. und Tekoppele,J.M. (2000). Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J.* **350 Pt 2**, 381-387.
- Vieira-Coelho,M.A. und Soares-da-Silva,P. (1993). Dopamine formation, from its immediate precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine, along the rat digestive tract. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **7**, 235-243.
- Wissing,S. *et al.* (2004). An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.* **166**, 969-974.
- Wu,M., Xu,L.G., Li,X., Zhai,Z. und Shu,H.B. (2002). AMID, an apoptosis-inducing factor-homologous mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 25617-25623.
- Yan,L.J., Levine,R.L. und Sohal,R.S. (1997). Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A* **94**, 11168-11172.
- Yarian,C.S., Rebrin,I. und Sohal,R.S. (2005). Aconitase and ATP synthase are targets of malondialdehyde modification and undergo an age-related decrease in activity in mouse heart mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 151-156.
- Ye,Z.H., Kneusel,R.E., Matern,U. und Varner,J.E. (1994). An alternative methylation pathway in lignin biosynthesis in *Zinnia*. *Plant Cell* **6**, 1427-1439.
- Zhou,S., Fushinobu,S., Nakanishi,Y., Kim,S.W., Wakagi,T. und Shoun,H. (2009). Cloning and characterization of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **381**, 7-11.
- Zhu,B.T., Ezell,E.L. und Liehr,J.G. (1994). Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo. *J. Biol. Chem.* **269**, 292-299.
- Zigler,J.S., Jr. und Goosey,J.D. (1981). Photosensitized oxidation in the ocular lens: evidence for photosensitizers endogenous to the human lens. *Photochem. Photobiol.* **33**, 869-874.

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ 32P-dCTP $\alpha$ 32P-2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat	juv juvenil
AmAc Ammoniumazetat	kbp Kilo-Basenpaare
Amp Ampicillin	kDa Kilo-Dalton
AOX alternative Oxidase	l Liter
AIF Apoptoseinduzierender Faktor	LB Luria Bertani
APS Ammoniumperoxidsulfat	LBA Luria Bertani Ampicillin
As Aminosäure(n)	LBT Luria Bertani Tetrazyklin
ATP Adenosintriphosphat	M molar
Ble Phleomycin	mat Kreuzungstyp
BMM Biomalz-Mais-Medium	min Minute(n)
BN blau-nativ	MnSOD Mangan-Superoxiddismutase
bp Basenpaare	MOPS Morpholinopropansulfonsäure
BSA bovines Serumalbumin	mRNA „messenger RNA“
cDNA komplementäre DNA	mtDNA mitochondriale DNA
COX Cytochrom-c-Oxidase	NADH Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
CuZnSOD Kupfer, Zink-Superoxiddismutase	OD optische Dichte
d Tage	OPL „Oligo-primed labeling“
kDa Kilo-Dalton	PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
DH Dehydrogenase	PCR Polymerase-Kettenreaktion
DIG Digoxigenin	PEG Polyethylenglykol
DMPC Dimethylpyrocarbonat	eGFP „enhanced“ grün fluoreszierendes Protein
DNA Desoxyribonucleinsäure	pH potentia hydrogenii
dNTPs 2'-Desoxy-Nukleosid-5'-triphosphate	pIDNA „plasmid-like“ DNA
EtBr Ethidiumbromid	RNA Ribonucleinsäure
EtOH Ethanol	ROS reaktive Sauerstoffspezies
g Gramm	rRNA ribosomale RNA
GFP grün fluoreszierendes Protein	RT Raumtemperatur
GTC Guanidinthiocyanat	RT-PCR Reverse-Transkript PCR
HUVEC „Human umbilical vein endothelial cell“	SDS Natriumdodezylsulfat

sen seneszent  
SG Sammelgel  
SK Superkomplex  
SSC Natriumsalzzitrat  
Tab. Tabelle  
TAE Tris-Azetat-EDTA  
Taq *Thermus aquaticus*  
TEMED Tetramethylethylendiamin  
Tet Tetrazyklin  
TEZ Transformationseffizienz  
TG Trenngel  
Tris Tris(hydroxymethyl)aminomethan  
tRNA Transfer-RNA  
Upm Umdrehungen pro Minute  
V Volt  
v/v „volume/volume“  
Vol. Volumen  
Wt Wildtyp  
w/v „weight/volume“

## 10. 2Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1:** Entstehung von ROS an den Atmungskettenkomplexen I und III.  
**Abb. 2:** ROS-Bildung an den Catecholgruppen des 17  $\beta$ -Estradiols  
**Abb. 3:** Antioxidative Wirkung von Quercetin.  
**Abb. 4:** Prooxidative Wirkung von Quercetin.  
**Abb. 5:** Bildung der Carbonyl-Gruppe an einem Protein mittels Oxidation durch das Hydroxyl-Radikal.  
**Abb. 6:** Nachweisprinzip der „Oxyblot“-Methode.  
**Abb. 7:** Identifizierung carbonylierter Proteine mit Hilfe einer 2D-„Oxyblot“-Analyse in alten *A. thaliana*-Pflanzen.  
**Abb. 8:** Entstehung von Glykierungsendprodukten („AGE“) an oxidierten Proteinen.  
**Abb. 9:** Oxidation von Tryptophan und Entstehung von N-Formyl-Kynurenin.  
**Abb. 10:** Einige Komponenten der mitochondrialen Proteinqualitätskontrolle.  
**Abb. 11:** Initiation der Apoptose.  
**Abb. 12:** Phänotyp von jungen und alten *P. anserina*-Kulturen auf Standardmedium.  
**Abb. 13:** Auftrennung von Gesamtproteinen eines juvenilen und eines seneszenten Wildstammes in einer denaturierenden SDS-PAGE.

- Abb. 14:** Funktion des S-Adenosyl-Methionin (SAM) als Methyl donor in Reaktionen mit Methyltransferasen.
- Abb. 15:** Homologievergleich verschiedener Methyltransferase-Proteinsequenzen mit der PaMTH1 Sequenz aus *P. anserina* (Averbeck et al., 2000).
- Abb. 16:** Hemmung der Dopamin-Synthese durch Methylierung von L-DOPA und direkte Dopamin Methylierung durch die COMT in Nervenzellen von Säugern.
- Abb. 17:** Analyse von mitochondrialen Proben aus drei juvenilen und den entsprechenden seneszenten *P. anserina*-Wildstämmen.
- Abb. 18:** Analyse der mitochondrialen Atmungskette im juvenilen und seneszenten Wildstamm s.
- Abb. 19:** Auftrennung mitochondrialer Proteine aus einem juvenilen und dem entsprechenden seneszenten *P. anserina*-Wildstamm mittels isoelektrischer Fokussierung und 2D-SDS Gelelektrophorese.
- Abb. 20:** Zweidimensionale Gele einer differentiellen Proteomanalyse mit mitochondrialen Proteinen aus juvenilen und seneszenten *P. anserina* Wildstämmen.
- Abb. 21.:** Stammbaum von verschiedenen Kation-abhängigen Klasse I und Kation-unabhängigen Klasse II-O-Methyltransferasen.
- Abb. 22:** Analyse der *PaMthI*-Transkription während der Alterung in *P. anserina* Wildstamm s.
- Abb. 23:** Nachweis einer erhöhten PaMTH1-Menge in Gesamtproteinen aus alten Wildstämmen mittels Westernblot-Analyse.
- Abb. 24:** Konstruktion eines Vektors zur Herstellung von PaMTH1-GFP-Fusions-Protein bildenden Transformanten in *P. anserina*.
- Abb. 25:** Southernblot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPaMthI*gfp1 in das Genom der putativen Transformanten *PaMthI\_gfpT<sub>1</sub>-T<sub>5</sub>*.
- Abb. 26:** Verifizierung der mitochondrialen Lokalisation von PaMTH1.
- Abb. 27:** Analyse der submitochondrialen Lokalisation von PaMTH1 in juvenilem und seneszentem Wildstamm s.
- Abb. 28:** Konstruktion eines Vektors zur Herstellung eines „strep-tag“-PaMTH1-Fusions-Protein bildenden *E. coli*-Stammes.
- Abb. 29:** Heterologe Expression eines „strep-tag“-PaMTH1-Fusionsproteins in *E. coli*
- Abb. 30:** Reaktionsschema des gekoppelten photometrischen Aktivitätstests zur Bestimmung einer Methyltransferase-Aktivität.
- Abb. 31:** Gemessene Absorptionsabnahmen in einem gekoppelten Methyltransferase-Aktivitätstest mit dem rekombinanten PaMTH1 und verschiedenen Substraten.
- Abb. 32:** Konstruktion eines Vektors zur konstitutiven Überexpression von *PaMthI* in *P. anserina*.
- Abb. 33:** Southernblot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPaMthI*Ex1 in das Genom der Transformanten *PaMthI\_ÜEx1* (T1) und *PaMthI\_ÜEx2* (T2).
- Abb. 34:** Nachweis der PaMTH1-Menge in Gesamtproteinen und Mitochondrien von juvenilen und seneszenten *P. anserina PaMthI*-Überexpressionsstämmen.
- Abb. 35:** Vergleich der Menge der oxidierten Proteine der *PaMthI*-Überexpressionsstämme, des Wildstammes und der *PaDnmI*-Deletionsmutante.
- Abb. 36:** Wuchsraten von jungen Wildstämmen *PaMthI*-Überexpressionsstämmen auf PASM-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Kupfersulphat oder Wasserstoffperoxid.
- Abb. 37:** Vergleich der mittleren Lebensspannen der *PaMthI*-Überexpressionsmutanten und des *P. anserina* Wildstammes auf PASM-Medium.
- Abb. 38:** Physiologische Charakterisierung des *PaMthI*-Überexpressionsstammes.
- Abb. 39:** Amplifikation der *PaMthI*-Flanken und Konstruktion des Vektors *pPaMthI*KO1
- Abb. 40:** Herstellung und Verifizierung eines *PaMthI*-Deletionsstammes.
- Abb. 41:** Verifizierung der *PaMthI*-Deletion in Gesamtproteinen und Mitochondrien mittels Westernblot Analysen.
- Abb. 42:** Wuchsraten von jungen *P. anserina*-Wildstämmen und *PaMthI*-Deletionsstämmen auf PASM Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen Kupfersulphat oder Wasserstoffperoxid.



## 11 Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für die Vergabe dieses hochinteressanten Themas. Weiterhin bin ich sehr dankbar für seine Unterstützung und sein großes Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. B. Ludwig, dafür dass er das Zweitgutachten über diese Arbeit erstellt.

allen Hochschullehrern, die für meine wissenschaftliche Ausbildung verantwortlich waren.

Christian Scheckhuber, der mir mit Rat und Tat fortwährend zur Seite stand und von dem ich sehr viel lernen konnte. Ich bin sehr dankbar für die beherzte Hilfe bei kleineren und größeren Problemen.

Dr. Andrea Hamann, die mir häufiger durch hilfreiche Anmerkungen neue Ideen und Denkanstöße gegeben hat.

Alexandra Werner, die ich jederzeit um Rat fragen konnte und die mir schon einige Male großzügig geholfen hat.

Allen anderen Mitgliedern des Arbeitskreises, die mir während meiner gesamten Arbeitszeit sehr freundlich entgegengekommen sind. Vor allem möchte ich mich bei Andrea Weil, Jörg Servos, Ingmar Strobel, Karin Luce und bei den ehemaligen Mitgliedern Sigi Kost, Elfie Rödel, Jürgen Grief, Stefan Stumpferl, Sascha Ludwig, Jossi Wüstehube, Tobias Kensche und Kadina Masic bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den Praktikanten Marijke, Bernadett, Thorsten, Tula, Martin, Ralph, Nadim und Sebastian bedanken, die durch ihre Praktika wichtige Beiträge zu meiner Arbeit geleistet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Ingrid, Peter und meinem Freund Michael für ihre Unterstützung und den Beistand in allen Lebenslagen.

Abschließend allen Freunden und Verwandten, die mir durch ihr Interesse an meiner Ausbildung und durch wertvolle Ratschläge geholfen haben.

## 12 Publikationsliste

Groebe,K., Krause,F., Kunstmann,B., Unterluggauer,H., Reifschneider,N.H., Scheckhuber,C.Q., Sastri,C., Stegmann,W., Wozny,W., Schwall,G.P., Poznanović,S., Dencher,N.A., Jansen-Dürr,P., Osiewacz,H.D., Schrattenholz,A. (2007). Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospora anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. *Exp. Gerontol.* **42**, 887-898.

Kunstmann,B., Osiewacz,H.D. (2008). Over-expression of an S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase leads to an extended lifespan of *Podospora anserina* without impairments in vital functions. *Aging Cell* **7**; 651-62

Kunstmann,B., Osiewacz,H.D. (2009). The S-adenosylmethionine dependent O-methyltransferase PaMTH1: a longevity assurance factor protecting *Podospora anserina* against oxidative stress. *Aging* **1**; 328-334

## **LEBENS LAUF**

Birgit Kunstmann



### **Persönliche Angaben**

Geboren: 31. Juli 1979 in 59075 Hamm (Westf.)  
Familienstand: ledig  
Eltern: Manfred und Gisela Kunstmann, geb. Leimkötter

### **Schulbildung**

08/1986 – 05/1990 Gebrüder-Grimm-Grundschule, Hamm  
08/1990 – 05/1999 Galilei-Gymnasium, Hamm  
**Abschluss:** Abitur am Galilei-Gymnasium Hamm

### **Studium**

10/1999 – 06/2004 Studium der Biologie an der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main  
  
08/2003 - 06/2004 Diplomarbeit im Arbeitskreis Prof. Dr. Osiewacz,  
Institut für molekulare Biowissenschaften,  
Johann Wolfgang Goethe-Universität,  
Frankfurt am Main

**Titel der Arbeit:** " Vergleichende Proteomanalyse bei dem Ascomyceten *Podospora anserina* unter besonderer Berücksichtigung mitochondrialer Proteine"

**Abschluss:** Diplom Biologin (Note: 1,0; Gesamtnote: 2,1)

### **Promotion**

09/2004 – 07/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von  
Prof. Dr. H. D. Osiewacz  
  
- 05/2009 Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit im  
AK von Prof. Dr. H. D. Osiewacz