

Massenspektrometrische und gelelektrophoretische Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Modellorganismen

Zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)
genehmigte Dissertation von Dipl.-Ing. Eva Regine Schäfer aus Darmstadt



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Chemie
AK Dencher

**Massenspektrometrische und gelelektrophoretische Analyse altersabhängiger
Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Modellorganismen.**

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte

Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Eva Regine Schäfer
aus Darmstadt

Referent: Prof. Dr. Norbert A. Dencher

Korreferent: PD Dr. Ansgar Poetsch

Tag der Einreichung: 27. Mai 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2011

Darmstadt 2011

D17

Die vorliegende Arbeit wurde unter Leitung von Herrn Prof. Dr. N. A. Dencher in der Zeit von Juli 2007 bis Mai 2011 im Fachbereich Chemie am Clemens-Schöpf-Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden bereits auf Tagungen vorgestellt:

Vorträge

E. R. Schäfer, A. Cellerino, C. Englert, M. Frenzel, E. Terzibasi & N. A. Dencher

*Partial Mitochondrial Proteome and Supramolecular Organisation of OXPHOS Complexes in the Short-lived Fish *Nothobranchius furzeri*.*

17. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Alternsforschung, 10. November 2007, Karlsruhe, Vortrag, Tagungsband Seite 14.

Posterpräsentationen

E. R. Schäfer, A. Cellerino, C. Englert, M. Frenzel, E. Terzibasi & N. A. Dencher

*Partial Mitochondrial Proteome and Supramolecular Organisation of OXPHOS Complexes in the Short-lived Fish *Nothobranchius furzeri*.*

Annual Conference of the German Genetics Society: Genetics of Aging, 11. - 13. Oktober 2007, Jena, Poster, Tagungsband Seite 38.

E. R. Schäfer, A. Hamann, F. Krause, A. Poetsch, S. Rexroth, A. Werner, H. D. Osiewacz & N. A. Dencher

*Kynurenylation of a specific tryptophan residue of *Podospora anserina* ATP synthase alpha subunit.*

3rd EU-Summer School in Proteomic Basics: Quantification and Post-Translational Modifications of Proteins, 2. - 8. August 2009, Brixen/Bressanone, Südtirol/Italien, Tagungsband Seite 79.

E. R. Schäfer, A. Werner, H. D. Osiewacz, F. Krause, A. Poetsch, S. Rexroth & N. A. Dencher

*Kynurenylation of a specific tryptophan residue of *Podospora anserina* ATP synthase alpha subunit.*

MiMage-Conference: Mitochondria in Ageing and Age-Related Disease, 26. - 30. September 2009, Les Diablerets, Schweiz, Tagungsband Seite 40.

E. R. Schäfer, A. Poetsch, S. Rexroth, A. Werner, H. D. Osiewacz & N. A. Dencher

*Age-dependent kynurenylation of a specific tryptophan residue in the ATP synthase alpha subunit of *Podospora anserina*.*

61. Mosbacher Kolloquium – The Biology of Aging: Mechanisms and Intervention, 8. - 10. April 2010, Mosbach/Baden, Poster, Tagungsband Seite 45.

E. R. Schäfer, A. Poetsch, S. Rexroth, A. Werner, A. Hamann, H. D. Osiewacz & N. A. Dencher

*Age-dependent alterations of the (mitochondrial) proteome of the fungal ageing model *Podospora anserina* – a systems biology approach*

4th EU-Summer School in Proteomic Basics: High-Throughput Data Analysis and Statistics, 1. - 7. August 2010, Brixen/Bressanone, Südtirol/Italien, Tagungsband.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Vermittlung interessanter und fruchtbarer wissenschaftlicher Kooperationen, die ganz wesentlich zur vorliegenden Arbeit beigetragen haben, herzlich danken.

Desweiteren gilt mein großer Dank PD Dr. Ansgar Poetsch von der Ruhr-Universität Bochum für die Übernahme des Korreferats sowie Herrn Prof. Dr. Gerd Buntkowsky und Herrn Prof. Dr. Ralf Kaldenhoff für die kurzfristige Bereitschaft das Amt eines Fachprüfers zu übernehmen. Frau Prof. Dr. Christina M. Thiele danke ich herzlich für die erste Übernahme eines Prüfungsvorsitzes bei einer Promotionsprüfung in ihrer akademischen Karriere – auch an einem eher ungewöhnlichen Wochentag.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz vom Institut für Molekulare Biowissenschaften der Goethe-Universität Frankfurt am Main möchte ich mich für die fruchtbare wissenschaftliche Kooperation während der letzten Jahre bedanken, insbesondere natürlich für die zur Verfügung gestellten Proben des filamentösen Pilzes *Podospira anserina*. Ein ganz besonderer Dank gebührt dabei Frau Alexandra Werner für die Anzucht der Pilzkulturen und die Isolierung der Mitochondrien.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacques R. Vanfleteren von der Universität Gent in Belgien für die Bereitstellung von Proben aus *Caenorhabditis elegans* und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert M. Tanguay von der Université Laval in Québec City, Kanada für Proben aus *Drosophila melanogaster*. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben des extrem kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärfplings *Nothobranchius furzeri* wurden mir freundlicherweise von Dr. Alessandro Cellerino vom Leibniz-Institut für Alternsforschung in Jena überlassen, so dass auch ihm an dieser Stelle mein Dank gilt.

Bei PD Dr. Ansgar Poetsch sowie Dr. Sascha Rexroth aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Rögner an der Ruhr-Universität Bochum bedanke ich mich ganz herzlich für eine extrem fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit sowie die Einführung in verschiedene Techniken der Massenspektrometrie und die Durchführung zahlloser Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit. Dr. Sascha Rexroth möchte ich in diesem Zusammenhang nochmals für die Analyse, Auswertung und das zur Verfügung stellen der Daten der *P. anserina* Proben mit und ohne Desferal danken. PD Dr. Ansgar Poetsch gilt mein Dank auch für die Durchführung und Auswertung einer MudPIT-Analyse von *P. anserina* Proben. Für seine freundliche Unterstützung bei der Datenauswertung verdient auch Dr. Christian Trötschel ein großes

Dankeschön in diesem Zusammenhang. Bei Frau Tanja Bojarzyn aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. Ansgar Poetsch möchte ich mich für die Unterstützung beim Lösen und Aliquotieren der isotopenmarkierten Standardpeptide bedanken. Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Matthias Rögner und PD Dr. Ansgar Poetsch an der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die stets freundliche Atmosphäre bei meinen Besuchen – mein besonderer Dank gilt dabei Dipl. Biol. Esther Sendtko und Johannes Jäger.

Liebe Moni, liebe Sandra, lieber Nico: Kollegen wie euch findet man nicht so schnell und ich vermisse schon jetzt unsere gemeinsamen Tage an der TU Darmstadt. Viele Worte will ich hier nicht verlieren, ich denke ihr wisst, wie dankbar ich euch für die miteinander verbrachte Zeit bin. Ich wünsche euch alles Gute auf eurem weiteren Weg und hoffe, euch auf meinem nicht aus den Augen zu verlieren. Liebe Manu: du bist die perfekte Ergänzung für unseren Trupp – auch wenn du nicht die australische Staatsangehörigkeit besitzt – und ich bedaure, nur für recht kurze Zeit deine Kollegin gewesen zu sein.

Herrn Dr. Holger Seelert danke ich herzlich für seine stete Hilfsbereitschaft und die detaillierte Kenntnis auch der verstecktesten Geräte, Chemikalien und Paper. Allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dencher – Frau Christine Schröpfer, Frau Elisabeth Trapp, Frau Gerda Zeising, Frau Michaela Fröhlich und Herrn Dipl. Bio.-Phys. Michael Muschol sowie Frau Lidija Cavlovic – gilt mein Dank für die schöne Zusammenarbeit über mehr oder weniger viele Jahre.

Meiner Familie und meinem Freundeskreis danke ich für die stete Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte während meiner Promotion sowie ihr Verständnis, wenn ich während des Zusammenschreibens keine Zeit für erfreulicher Aktivitäten hatte.

Für seine Unterstützung und seinen unerschütterlichen Glauben an mich danke ich außerdem Tim Jekewitz, der stets auch Verständnis für einen unter Papierbergen versinkenden Schreibtisch und meine stark reduzierte Teilnahme an häuslichen Aufgaben aufbringen konnte.

Für meine Familie

Falls Gott die Welt geschaffen hat,
war seine Hauptsorge sicher nicht,
sie so zu machen,
dass wir sie verstehen können.

ALBERT EINSTEIN

Für Tim

In der Wissenschaft beginnt alles Neue damit,
dass jemand brummt
"Hmmm... ist ja komisch."

ISAAC ASIMOV

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	5
2.1	Modellorganismen der Alternsforschung	5
2.2.1	<i>Podospora anserina</i>	6
2.2.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	9
2.2.3	<i>Drosophila melanogaster</i>	11
2.2.4	<i>Nothobranchius furzeri</i>	12
2.2	Motivation.....	14
3	Materialien	17
3.1	Chemikalien.....	17
3.2	Geräte.....	19
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	21
3.4	Software	22
3.5	Organismen.....	23
3.5.1	<i>Podospora anserina</i>	23
3.5.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	25
3.5.3	<i>Drosophila melanogaster</i>	26
3.5.4	<i>Nothobranchius furzeri</i>	27
4	Methoden	31
4.1	Isolierung der Mitochondrien.....	31
4.1.1	<i>Nothobranchius furzeri</i>	31
4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration	32
4.3	Solubilisierung von Membranproteinen für BN- und CN-PAGE	33
4.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	34
4.4.1	BN- und CN-PAGE	34
4.4.2	2D-SDS-PAGE.....	34
4.4.3	Glycin-SDS-PAGE	35
4.4.4	Gelfärbemethoden	35
4.4.4.1	Roti [®] -Blue-Färbung	35
4.4.4.2	Coomassie-Färbung	35
4.4.4.3	Silber-Färbung.....	35
4.4.4.4	SYPRO [®] Ruby-Färbung	35
4.4.4.5	Pro-Q [®] Diamond-Färbung	35
4.4.5	In-Gel Enzymaktivitätstests	36
4.5	Western-Blotting.....	36
4.6	Massenspektrometrische Methoden.....	37
4.6.1	Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	37
4.6.2	Flüssig-Chromatographie Elektrospray-Ionisierungs Tandem- Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)	38
4.6.2.1	LC-ESI-MS/MS einzelner Proteinbanden	38
4.6.2.2	LC-ESI-MS/MS komplexer Mitochondrienproben	40
4.6.2.3	Multidimensionale Proteinidentifikations-Technik (MudPIT)	41
4.6.3	Multiple Reaction Monitoring (MRM)	42
4.7	<i>In vitro</i> Oxidation	44

4.8	Quantifizierung.....	46
4.8.1	Gelelektrophoretische Methoden	46
4.8.1.1	Quantifizierung aus der ersten Dimension mit Quantity One.....	46
4.8.1.2	Quantifizierung aus der zweiten Dimension mit Delta2D.....	46
4.8.2	Massenspektrometrische Methoden	47
4.8.2.1	<i>Spectral Counting</i>	47
4.8.2.2	Peakfläche	48
4.8.2.3	Absolute Quantifizierung mittels interner Standards (AQUA)	48
4.9	Statistische Methoden.....	50
4.9.1	Standardabweichung des Mittelwerts	50
4.9.2	Wilcoxon-Rangsummentest	51
5	Ergebnisse und Diskussion.....	55
5.1	<i>Podospora anserina</i>	55
5.1.1	Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe von <i>P. anserina</i>	55
5.1.1.1	ATP-Synthase (Komplex V).....	66
5.1.1.2	Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase (Komplex IV)	81
5.1.1.3	Ubichinol-Cytochrom- <i>c</i> -Oxidoreduktase (Komplex III ₂)	86
5.1.1.4	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)	91
5.1.1.5	Superkomplexe.....	96
5.1.1.6	Zusammenfassung.....	115
5.1.2	Analyse posttranslationaler Modifikationen mittels LC-ESI-MS/MS.....	117
5.1.2.1	Spezifische Oxidation eines Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von <i>P. anserina</i>	119
5.1.2.2	Einfluss artifiziereller <i>in vitro</i> Oxidation mittels Fenton-Reagenz auf die Oxidation eines spezifischen Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von <i>P. anserina</i>	129
5.1.2.3	Einfluss von SCAVEGR TM auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus <i>P. anserina</i>	131
5.1.2.4	Einfluss von Desferal auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus <i>P. anserina</i>	138
5.1.2.5	Spezifische 4-Hydroxy-2-nonenal Modifikation eines Histidin-Restes der ATP-Synthase β -Untereinheit von <i>P. anserina</i>	142
5.1.2.6	Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine aus <i>P. anserina</i> mittels MudPIT	144
5.2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	148
5.2.1	Einfluss des Alterns auf das mitochondriale Proteom des <i>C. elegans</i> Wildtyps N2 und die Mutante <i>daf-2</i> (e1370)	148
5.2.2	Identifizierung von Proteinen aus <i>Caenorhabditis elegans</i> mittels Peptide Mass Fingerprinting.....	152
5.3	<i>Drosophila melanogaster</i>	157
5.3.1	Identifizierung von Proteinen aus <i>Drosophila melanogaster</i> mittels Peptide Mass Fingerprinting.....	157
5.4	<i>Nothobranchius furzeri</i>	161
5.4.1	Optimierung der Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. furzeri</i>	161
5.4.2	Identifizierung des Superkomplexes I ₁ IV ₁ in <i>Nothobranchius furzeri</i>	163
5.4.3	Einfluss von Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom von <i>N. furzeri</i>	164
5.4.4	Einfluss des Antioxidans Resveratrol auf das mitochondriale Proteom von <i>N. furzeri</i>	169
6	Abkürzungsverzeichnis	173
7	Literatur	177
	Anhang.....	197

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden altersabhängige Veränderungen des mitochondrialen Proteoms des filamentösen Pilzes *Podospora anserina*, des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*, der Schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* sowie des extrem kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärpflings *Nothobranchius furzeri* untersucht.

Für *Podospora anserina* wurde eine detaillierte Quantifizierung der Komplexe I, III₂ und IV und der aus ihnen aufgebauten Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) sowie der ATP-Synthase (Komplex V) durchgeführt. Dies erfolgte durch die Kombination von 2-dimensionaler (2D) Gelelektrophorese, der Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO[®] Ruby und die Quantifizierung mit der Software Delta2D. Um auch Membranproteine wie beispielsweise die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung analysieren zu können und Protein-Protein-Interaktionen zu erhalten, wird für die Auftrennung in der ersten Dimension die blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) verwendet. Es standen Mitochondrien von je drei 6, 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten (14 bzw. 15 Tage alt) *P. anserina* Kulturen zur Verfügung. Es konnte eine generelle Abnahme aller Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bezogen auf die mit 6 Tagen jüngste Altersstufe festgestellt werden, wobei von den 6 über die 9 zu den 13 Tage alten Kulturen meist eine kontinuierliche Abnahme erfolgt, so dass die Menge des betrachteten Komplexes oder Superkomplexes in der Regel bei den 13 Tage alten Proben am geringsten ist. Die seneszenten Kulturen setzen diesen Trend nie fort, sondern weisen oft in etwa die gleiche Menge wie die 9 Tage alten Proben auf. Dies kann höchstwahrscheinlich auf Unterschiede in der Gewinnung der seneszenten Proben zurückgeführt werden. Die ATP-Synthase konnte sowohl als Monomer als auch als Dimer detektiert werden, wobei das Monomer stets in leichtem Überschuss zum Dimer vorliegt. Bei den 13 Tage alten *P. anserina* Kulturen konnte außerdem ein im Vergleich mit den 6 und 9 Tage alten Proben um 38% höheres Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase festgestellt werden. Ebenfalls detektierbar war freier F₁-Teil der ATP-Synthase, dessen Vorkommen jedoch nur zwischen 2,3% bei den seneszenten und 4,6% bei den 9 Tage alten Kulturen beträgt. Die Menge an freiem F₁-Teil nimmt zwar mit zunehmendem Alter ab, da dies jedoch auch für Gesamtmenge der ATP-Synthase gilt, liegt unabhängig vom Alter der gleiche Prozentsatz der ATP-Synthase in Form von freiem F₁-Teil vor. Unabhängig vom Alter konnten in allen Proben die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) identifiziert werden, wobei stets etwa 4-mal so viel Superkomplex b wie c vorliegt. Im Vergleich mit den 6 und 9 Tage alten Kulturen ist das Verhältnis von Superkomplex b zu c bei den 13 Tage alten Proben allerdings um 28% höher. Die in einer früheren Arbeit bei *Podospora anserina* identifizierten Superkomplexe a (I₁III₂) und III₂IV₁^[1] konnten in der vorliegen

Arbeit nicht gefunden werden. Während die Mengen der Komplexe und Superkomplexe der OxPhos mit dem Alter abnehmen, was auch für die Gesamtmenge der Komplexe I und III₂, bestehend aus der Menge von individuellem und in Superkomplexen vorliegendem Komplex, gilt, ändert sich die prozentuale Verteilung dieser beiden Komplexe auf individuellen Komplex sowie die Superkomplexe b und c nicht maßgeblich mit dem Alter. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinträchtigung des Energiehaushalts der Zelle und könnte somit eine der Ursachen und/oder Konsequenzen des Alternsprozesses sein.

In Zusammenarbeit mit Dr. Ansgar Poetsch und Dr. Sascha Rexroth aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Matthias Rögner an der Ruhr-Universität Bochum wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit außerdem altersabhängige posttranslationale Modifikationen der ATP-Synthase von *Podospora anserina* untersucht. Dabei konnten die spezifische Oxidation eines Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit sowie eine ebenfalls spezifische 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) Modifikation eines Histidin-Restes der β -Untereinheit festgestellt werden. Im Falle der Oxidation des Tryptophans konnte dessen Umsetzung zu Hydroxy-Tryptophan, *N*-Formylkynurenin und Kynurenin beobachtet werden. Quantifizierung dieser Tryptophan-Modifikationen mittels Flüssig-Chromatographie Elektrospray-Ionisierung Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS) und *Spectral Counting* konnte zeigen, dass die prozentuale Verteilung der drei Modifikationen unabhängig vom Alter der Kultur und dem Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase ist und *N*-Formylkynurenin mit einem Anteil von 64% bezogen auf die Menge an unmodifiziertem Tryptophan am häufigsten vorkommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das ATP-Synthase Dimer unabhängig vom Alter stärker von der Tryptophan-Oxidation betroffen ist als das Monomer. Unabhängig vom Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase zeigten seneszente im Vergleich mit 9 Tage alten, juvenilen *P. anserina* Kulturen einen größeren Prozentsatz an modifiziertem Tryptophan. Die Methode des *Spectral Counting* erlaubt allerdings nur eine relative Quantifizierung, so dass, um die Oxidation des im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina* zukünftig auch absolut quantifizieren zu können, entsprechende Übergänge für die Analyse mittels *Multiple Reaction Monitoring* optimiert wurden. Zusätzlich wurde der Einfluss der *in vitro* Oxidation mittels Fenton-Reagenz, des Einsatzes des kommerziell erhältlichen Antioxidantien-Cocktails SVAVEGRTM bei der Solubilisierung sowie des Einsatzes des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien auf den Oxidationsgrad dieses Tryptophan-Restes analysiert. Der Einsatz von SCAVEGRTM bei der Solubilisierung kann nicht empfohlen werden, da insbesondere die

Menge an detektierbarem Hydroxy-Tryptophan dadurch zunimmt und der Antioxidantien-Cocktail somit keine protektive sondern eine artifiziell oxidierende Funktion zeigt. Anders verhält es sich bei der Verwendung des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien. Diese hat einen positiven Effekt, da für das Dimer der ATP-Synthase eine statistisch signifikante Abnahme der Mengen an Hydroxy-Tryptophan und *N*-Formylkynurenin festgestellt wurde. Auf die Oxidation des Tryptophan-Restes beim Monomer hatte der Einsatz des Eisenchelators jedoch keine Auswirkungen. Ein Einsatz von Desferal bei der Isolierung von Mitochondrien aus *Podospora anserina* wird empfohlen, um artifizielle Oxidation bei der Probenhandhabung zu unterbinden und wird, basierend auf den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse auch bereits durchgeführt. Die *in vitro* Oxidation mittels Fenton-Reagenz resultierte zwar in einem veränderten Bandenmuster bei der blau-nativen Gelelektrophorese, hatte jedoch keine Auswirkungen auf den Oxidationsgrad des im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina*. Um weitere für die Alternsforschung vielversprechende Zielproteine posttranslationaler Modifikationen zu identifizieren, wurde die multidimensionale Proteinidentifikations-Technik (MudPIT) eingesetzt. Dabei konnte unter anderem die Oxidation von Tryptophan zu Kynurenin bei der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) der oxidativen Phosphorylierung sowie der Isocitrat-Dehydrogenase und der Citrat-Synthase des Citratzyklus festgestellt werden.

Eine altersabhängige Analyse des mitochondrialen Proteoms des *Caenorhabditis elegans* Wildtyps sowie der langlebigen *daf-2(e1370)*-Mutante ergab eine erhebliche altersabhängige Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung beim Wildtyp, die in der *daf-2(e1370)*-Mutante abgemildert wird und mit den auf anderen Methoden basierenden Erkenntnissen von Brys *et al.* (2010)^[2] übereinstimmt, die an den selben Proben gewonnen wurden. Individueller Komplex I konnte bei keiner der untersuchten Proben detektiert werden, und auch die Komplexe III₂ und IV liegen nur in sehr geringer Menge als individuelle Komplexe vor, so dass die Gesamtmenge von Komplex I und die Hauptmengen der Komplexe III₂ und IV in Form von Superkomplexen vorliegen. Dabei konnten nur Superkomplexe mit der Beteiligung von Komplex I und III₂, also der Zusammensetzung I₁III₂IV_{0-n} identifiziert werden. Die *daf-2(e1370)*-Mutante scheint dabei unabhängig vom Alter eine etwas größere Menge von Superkomplexen zu besitzen als der Wildtyp. Die ATP-Synthase kann als Monomer, Dimer und Tetramer identifiziert werden, wobei Monomer und Dimer den weitaus größeren Teil ausmachen und unabhängig vom Alter sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante im gleichen Verhältnis vorliegen.

Bei der Analyse des mitochondrialen Proteoms von *Drosophila melanogaster* wurde ein von anderen Organismen abweichendes Proteinmuster festgestellt, das insbesondere im Bereich der ATP-Synthase auffällig ist, für die wesentlich mehr Banden erkennbar sind als erwartet. Eine Analyse mittels *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) ergab eine sehr häufige Identifizierung der α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase, auch an Positionen im 2D-BN/SDS-Gel wo diese nicht zu erwarten wäre. Eine Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tanguay von der Université Laval in Québec City, Kanada, die die Proben zur Verfügung gestellt hatte, machte klar, dass die Mitochondrien-Proben von *Drosophila melanogaster* eine recht hohe Kontamination mit Lysosomen aufweisen. Diese führt zu einer teilweisen Proteolyse der in der Probe enthaltenen Proteine so dass verschiedene Produkte des proteolytischen Abbaus auf den 2D-BN/SDS-Gelen zu finden sind und die zusätzlichen Proteinbanden sowie die häufige massenspektrometrischen Identifizierung von α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase im geringeren Massenbereich bedingen. Aus diesem Grund war eine Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von *Drosophila melanogaster* mit diesen Proben nicht sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurde weiterhin das mitochondriale Proteom des extrem kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärpflings *Nothobranchius furzeri* untersucht. Dabei konnte neben den bei den anderen Organismen identifizierten Superkomplexen auch I_1IV_1 ohne Beteiligung des Komplex III_2 Homodimers identifiziert werden. Dieser Superkomplex war bisher nur aus Rinderherzmitochondrien^[3-5], dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*^[6, 7] und der Hefe *Yarrowia lipolytica*^[8] bekannt und beweist eine direkte Interaktion der Komplexe I und IV der oxidativen Phosphorylierung. Der Vergleich zwischen *ad libitum* ernährten Fischen und solchen mit lebenslanger oder kurzzeitiger Kalorienrestriktion ergab eine erhebliche Abnahme der ATP-Synthase Menge und ein vollständiges Vorliegen dieser als Monomer bei lebenslanger Kalorienrestriktion. Bei Tieren mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion konnte ein im Vergleich zur *ad libitum* ernährten Kontrolle verändertes Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase festgestellt werden. Außerdem wurde nur in Proben von Fischen mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion der Superkomplex III_2IV_1 identifiziert. Weiterhin wurden erste Hinweise auf eine Veränderung des mitochondrialen Proteoms von *Nothobranchius furzeri* durch die Verabreichung des natürlichen Antioxidans Resveratrol gefunden. Diese scheinen sich insbesondere auf die Oligomerisierung der ATP-Synthase sowie das Vorliegen von individuellem Komplex IV_1 auszuwirken, da die Proben von mit Resveratrol behandelten Tieren eine etwas größere Menge von ATP-Synthase Dimer, Trimer und Tetramer sowie weniger individuellen Komplex IV_1 zu besitzen scheinen.

2 Einleitung

2.1 Modellorganismen der Altersforschung

Auch wenn das Ziel der Altersforschung (Gerontologie) das Verständnis des Alternsprozesses beim Menschen ist, können viele Experimente nicht oder nur schwer am Menschen selbst durchgeführt werden, so dass der Einsatz von Modellorganismen erforderlich ist, an denen stellvertretend für den Menschen geforscht wird. Welcher Organismus dafür gewählt wird, hängt von verschiedenen Faktoren, nicht zuletzt von der untersuchten Fragestellung ab. So besitzt die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* beispielsweise keine NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I der oxidativen Phosphorylierung)^[9-11], so dass sie für die Analyse von Defekten dieses Enzyms, dessen Mangelfunktion die am weitesten verbreitete Ursache für Fehlfunktionen der Atmungskette ist^[12, 13], nicht geeignet ist. Auch die Lebensspanne spielt eine entscheidende Rolle bei der Auswahl des passenden Modellorganismus. Während der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* nur 2 Wochen und die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* 2 Monate lebt, werden Mäuse (*Mus musculus*) etwa zwei Jahre alt^[14]. Je älter ein Organismus wird, desto langsamer er also altert, umso länger dauert es auch, bis ein umfassendes gerontologisches Experiment mit verschiedenen alten Individuen abgeschlossen werden kann. Auch die Kosten für die Haltung steigen in erheblichem Maße mit der Lebensdauer des Organismus, so dass auch die verfügbaren Gelder bei der Auswahl des geeigneten Modellsystems nicht unberücksichtigt bleiben sollten. Im gleichen Maße steigen die Kosten für die Haltung außerdem mit der evolutionären Nähe eines Organismus zum Menschen. So gelten für Säugetiere oder gar Primaten wesentlich striktere Richtlinien und sind Genehmigungen für bestimmte Experimente unter Umständen schwieriger zu erhalten als für Invertebraten oder niedere Vertebraten wie beispielsweise Fische. Auch die Verfügbarkeit von für die Altersforschung relevanten Mutanten, wie beispielsweise der langlebigen *daf-2(e1370)*-Mutanten von *Caenorhabditis elegans*^[2, 15] oder der vorzeitig alternden mtDNA Mutator-Maus^[16] und von Techniken für Mutagenese und RNA-Interferenz (RNAi) spielt eine Rolle bei der Auswahl des geeigneten Organismus.

Die Entscheidung für oder gegen einen bestimmten Modellorganismus ist somit auch immer von Kompromissen geprägt, da Lebensspanne, verfügbare genetische Techniken und Mutanten sowie die Kosten für die Haltung und durchführbare Experimente gegeneinander abgewogen und auf die untersuchte Fragestellung abgestimmt werden müssen.

Nachfolgend wird detaillierter auf die vier in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modellorganismen *Podospora anserina*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Nothobranchius furzeri* eingegangen.

2.2.1 *Podospora anserina*

Der Schlauchpilz (Ascomycet) *Podospora anserina* ist in der Natur auf dem Dung von Pflanzenfressern zu finden^[17] und gehört zu den wenigen filamentösen Pilzen die nicht unsterblich sind, sondern sich durch eine spezifische Lebensspanne auszeichnen^[18, 19]. Diese beträgt beim am intensivsten untersuchten Wildstamm „s“ im Mittel 25 Tage^[20]. Seit der ersten Beschreibung des seneszenten Phänotyps durch Rizet (1953)^[21] hat sich *P. anserina* als Modellsystem für die Analyse biologischer Grundlagen des Alterns etabliert. Die in alten Kulturen des Pilzes auftretenden Veränderungen des Phänotyps werden als „Seneszenz-Syndrom“ bezeichnet^[20, 22] und umfassen eine verringerte Wachstumsrate, den Verlust der Fertilität sowie eine verstärkte Pigmentierung des Myzels^[23]. Auf der mikroskopischen Ebene können ebenfalls altersabhängige Veränderungen beobachtet werden^[24]. Schlussendlich kommt es zu einem totalen Wachstumsstillstand und dem Tod des Myzels an den Hyphen-spitzen^[19, 22]. Abbildung 2.2.1^[22] zeigt eine *Podospora anserina* Kultur mittleren Alters sowie eine seneszente Kultur im Vergleich, so dass sich die stärkere Pigmentierung und das irreguläre Wachstum der seneszenten Kultur gut erkennen lassen. Neben Wildstämmen, die an verschiedenen Orten aus der Natur entnommen wurden, existieren auch zufällig isolierte sowie gezielt erstellte Mutanten von *P. anserina*, die jeweils eine charakteristische Lebensspanne aufweisen^[20]. Dazu zählt beispielsweise die langlebige Mutante *grisea*, bei der eine Funktionsverlustmutation im für den Transkriptionsfaktor GRISEA codierenden Gen vorliegt. Das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors führt wiederum dazu, dass das für einen Kupfer-Transporter codierende *PaCtr3*-Gen nicht exprimiert wird^[25, 26]. Da Kupfer ein Co-Faktor für die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der oxidativen Phosphorylierung) ist, führt die *Grisea*-Mutation zur Inaktivierung von Komplex IV^[27]. *Podospora anserina* besitzt jedoch eine

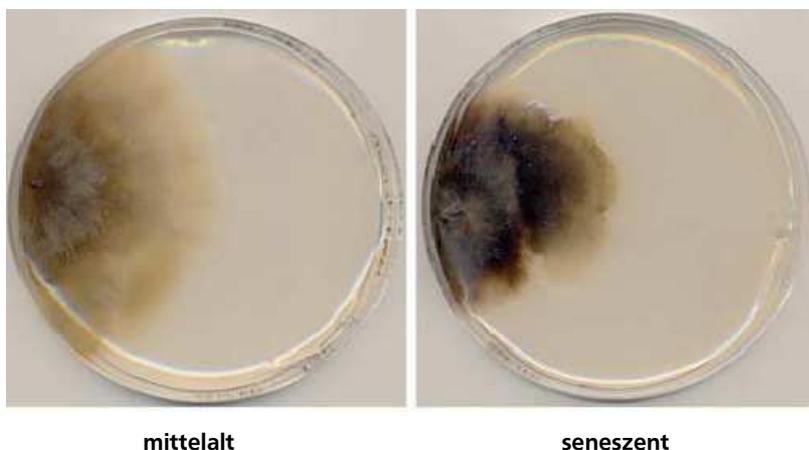


Abbildung 2.2.1 Vergleich einer *Podospora anserina* Kultur mittleren Alters und einer seneszenten Kultur auf synthetischem Medium. Es lässt sich erkennen, dass der seneszente Phänotyp durch irreguläres Wachstum und verstärkte Pigmentierung gekennzeichnet ist^[22].

sogenannte „alternative Oxidase“ (AOX)^[28], so dass die grisea Mutante nicht letal ist, sondern im Gegenteil sogar eine um etwa 60% verlängerte Lebensspanne aufweist^[27]. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass bei der „alternativen“ Atmung Elektronen von Komplex I mittels Ubichinon direkt auf die AOX übertragen werden, wodurch Komplex III₂ – neben Komplex I der Hauptproduzent von Superoxidradikal-Anionen (O₂^{·-})^[29-31] – umgangen und die Produktion von O₂^{·-} vermindert wird^[20]. Somit treten auch weniger Folgeprodukte des Superoxidradikal-Anions wie das hochreaktive Hydroxyl-Radikal auf, so dass die grisea Mutante im Vergleich zum Wildtyp weniger durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, von engl. *reactive oxygen species*) und die durch diese verursachten Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA belastet ist^[20]. Die *P. anserina* Mutante ex1 weist eine Deletion des Hauptteils des *CoxI*-Gens in der mitochondrialen DNA (mtDNA) auf, das für eine Untereinheit von Komplex IV codiert, so dass auch diese Mutante auf die Atmung mittels AOX angewiesen ist. Im Vergleich zur grisea Mutanten lebt ex1 jedoch nicht nur länger als der Wildtyp, sondern scheint sogar unsterblich zu sein, da der entsprechende Stamm mittlerweile seit über 20 Jahren im Labor wächst ohne Anzeichen des Alterns zu zeigen^[20]. Das die grisea Mutante nicht ebenfalls unsterblich ist hängt damit zusammen, dass durch das Fehlen des GRISEA Transkriptionsfaktors auch die beiden Superoxiddismutasen SOD1 und SOD2 nicht aktiv sind^[27] und ihr somit ein wichtiger Teil des Schutzmechanismus gegen ROS fehlt. Sowohl die grisea als auch die ex1 Mutante wurden zusammen mit Kulturen des Wildtyps „s“ bereits in der Dissertation von Krause (2004)^[1] qualitativ mittels gelelektrophoretischer Methoden untersucht, wodurch erstmalig Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bei *Podospora anserina* identifiziert werden konnten. Bei den beiden Mutanten konnte außerdem der bis dato unbekannt Superkomplex I₂III₂ sowie ein Homodimer von Komplex I nachgewiesen werden^[1]. Der Alterungsprozess des *P. anserina* Wildtyps, der auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wird, ist gekennzeichnet durch eine umfassende Reorganisation der mtDNA^[32-35]. Dabei wird das erste Intron des *PaCox1*-Gens, das für die erste Untereinheit von Komplex IV der oxidativen Phosphorylierung codiert und auch als pl-Intron bezeichnet wird, freigesetzt und immer stärker amplifiziert^[32-34]. Aus diesem formt sich während des Alternsprozesses die sogenannte plDNA oder senDNA α , die in den Mitochondrien akkumuliert wird. Die plDNA umfasst 2,5 kbp und liegt ringförmig vor, so dass eine große Ähnlichkeit mit bakteriellen Plasmiden besteht^[20, 36, 37]. Durch diese massive Umorganisation der mtDNA und die Freisetzung des *PaCox1*-Introns in Form von plDNA kommt es schließlich zum Verlust großer Teile der mtDNA inklusive des *PaCox1*-Gens^[20]. Die Freisetzung und Amplifizierung des pl-Introns und die Akkumulation der plDNA in den Mitochondrien wurden lange als Ursache des Alternsprozesses bei *Podospora anserina* angenommen^[20], jedoch konnte mittlerweile festgestellt

werden, dass das pl-Intron bei einigen Stämmen stabil in die mtDNA integriert ist und nicht freigesetzt wird, diese aber trotzdem altern^[27, 38-40]. Diese Stämme, zu denen auch die schon erwähnten Mutanten *grisea* und *ex1* gehören, sind jedoch alle langlebig, so dass die plDNA als eine Art Beschleuniger des Alternsprozesses zu wirken scheint^[22].

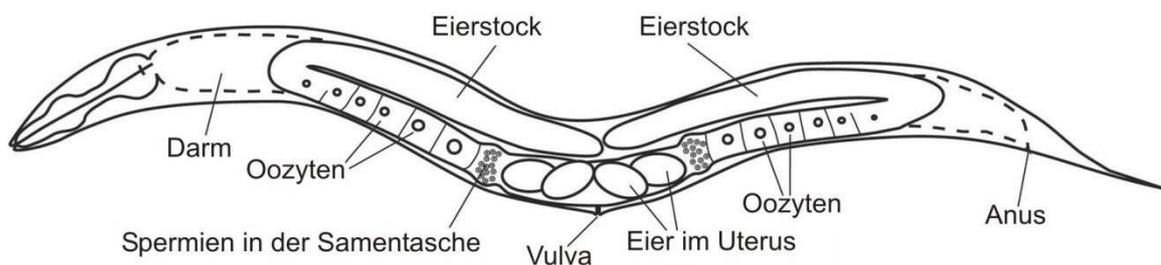
Aufgrund seiner relativ geringen Lebensspanne von nur etwa 25 Tagen beim Wildtyp „s“^[20] und der Vielzahl an verfügbaren Mutanten eignet sich der filamentöse Pilz *Podospora anserina* gut als Modellorganismus für die Alternforschung. Allerdings sind Pilze evolutionsbiologisch recht weit vom Menschen entfernt, so dass diese sicherlich auch ihnen eigene Mechanismen des Alterns besitzen, die nicht auf das humane Altern übertragbar sind. Nichtsdestotrotz kann auch ein Pilz aufschlussreiche Ergebnisse über evolutionär konservierte Mechanismen geben, sobald diese identifiziert sind. Interessant ist in diesem Zusammenhang beispielsweise, dass bei *P. anserina* eine Lebensverlängerung durch verminderte Kalorienzufuhr (CR, von engl. *calorie restriction*) festgestellt werden konnte^[41-44], wie sie auch schon bei Mäusen^[45], Ratten^[46] und den ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen *Caenorhabditis elegans*^[47-50], *Drosophila melanogaster*^[51-53] und *Nothobranchius furzeri*^[54] nachgewiesen werden konnte. Dabei könnte es sich also um einen allgemeingültigen Mechanismus handeln, der wesentlich schneller und kostengünstiger an kurzlebigen Spezies mit geringen Haltungskosten und einem großen Experimentierspielraum erforscht werden kann.

Auch das altersabhängige Vorliegen von beispielsweise durch ROS verursachten posttranslationalen Modifikationen (PTMs) lässt sich anhand kurzlebiger Organismen, die in einem kurzen Zeitraum eine Vielzahl von Proben unterschiedlichen Alters liefern können, wesentlich effektiver untersuchen. Bei der Analyse juveniler und seneszenten *Podospora anserina* Kulturen konnte beispielsweise neben einer generellen Zunahme der Menge von SAM-abhängiger O-Methyltransferase (SAM-OMT) in seneszenten Kulturen auch die N-Formylkynurenin-Modifikation dieses Enzyms festgestellt werden^[55]. Die Modifikation war dabei spezifisch auf drei Tryptophan-Reste beschränkt und während in juvenilen Kulturen etwa 25% der SAM-OMT modifiziert waren, trugen in den seneszenten Proben circa 50% die Modifikation. Vor allem bei Proteinen, die stark evolutionär konserviert sind und bei denen eine große Sequenzhomologie zum entsprechenden Protein in Säugern existiert, ist eine umfassende Analyse auf altersabhängige PTMs bei kurzlebigen Organismen wie *Podospora anserina* sinnvoll, da so in einer vergleichsweise kurzen Zeitspanne ein umfangreiches Altersprofil verschiedener Modifikationen erstellt werden kann. Von den identifizierten PTMs werden dann nur die interessantesten und vielversprechendsten auch in Säugern oder gar dem Menschen selbst analysiert.

2.2.2 *Caenorhabditis elegans*

Der Fadenwurm (Nematode) *Caenorhabditis elegans* ist bereits seit den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts ein etablierter Modellorganismus der Alternsforschung^[56, 57]. Er lebt im Boden gemäßigter Klimazonen und ernährt sich hauptsächlich von Bakterien^[58, 59]. Es existieren zwei Geschlechter, Hermaphroditen (XX) und Männchen (X0) (siehe Abbildung 2.2.2)^[60]. Hermaphroditen besitzen ein weibliches Soma und produzieren sowohl Spermien als auch Oozyten. Sie können sich durch Selbstbefruchtung oder Paarung mit einem Männchen fortpflanzen. Bei der Selbstbefruchtung entstehen Männchen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von etwa 1:500, während der Nachwuchs aus der Paarung eines Hermaphroditen mit einem Männchen je 50% beider Geschlechter enthält^[60]. *C. elegans* weist das Phänomen der sogenannten Eutelie (Zellkonstanz) auf, das heißt, jedes erwachsene Individuum besitzt die gleiche Gesamtzahl an Zellen und auch jeweils die gleiche Anzahl an Zellen pro Zelltyp^[61, 62]. Jeder erwachsene Hermaphrodit besitzt genau 959 und jedes erwachsene Männchen genau 1031 Zellen^[63]. Der Lebenszyklus von *C. elegans* ist recht einfach und dauert unter optimalen Bedingungen nur 2,5 Tage^[56]. Steht nur wenig Futter zur Verfügung oder ist die Populationsdichte sehr hoch, können L2-Larven in das sogenannte Dauer-Stadium übergehen. Dabei wird kein Futter aufge-

Hermaphrodit (XX)



Männchen (X0)

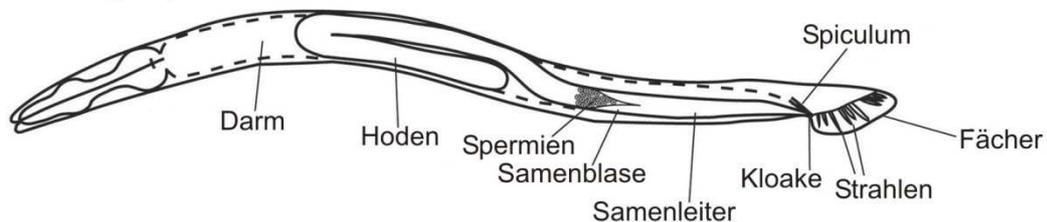


Abbildung 2.2.2 Schematische Darstellung der beiden Geschlechter von *Caenorhabditis elegans*. Hermaphroditen (XX) produzieren sowohl Spermien als auch Oozyten und können sich entweder durch Selbstbefruchtung oder durch Paarung mit einem Männchen (X0) vermehren. Die beiden Geschlechter unterscheiden sich bedeutend in Körpergröße und -aufbau. Das Männchen besitzt zwar mehr Zellen, ist mit einer Körperlänge von ca. 0,8 mm^[64] aber trotzdem deutlich kleiner als der 1,2 mm – 1,5 mm lange Hermaphrodit^[56]. Große Unterschiede gibt es außerdem beim Nervensystem, insbesondere dem im männlichen Schwanz lokalisierten Teil^[63]. (modifiziert nach Zarkower (2006)^[60])

nommen und es kann eine erhöhte Stressresistenz beobachtet werden. In diesem Stadium kann *C. elegans* mehrere Monate überleben^[58, 65-67]. Verbessern sich die Lebensbedingungen, kann durch Häutung direkt vom Dauer- in das L4-Stadium übergangen werden und es werden im Weiteren reguläre Entwicklung und Alternsprozess unabhängig von der Zeitspanne des Dauer-Stadiums durchlaufen^[68]. Die mittlere Lebensspanne von *C. elegans* beträgt 10 Tage, die maximale 20 Tage bei einer Temperatur von 25 °C^[59] und ist einer der Vorteile dieses Fadenwurms bei seiner Verwendung als Modellorganismus der Alternsforschung. Ebenfalls vorteilhaft ist die Möglichkeit, *C. elegans* unbeschadet in flüssigem Stickstoff zu lagern^[56, 58], so dass stets eine ausreichende Menge sowie eine große Vielfalt an Stämmen verfügbar ist. Das Genom von *C. elegans* wurde als das erste eines Vielzellers bereits 1998 sequenziert^[69] und es stehen Techniken für Mutagenese und RNAi zur Verfügung^[58]. Der Alternsprozess von *C. elegans* wird durch charakteristische Veränderungen des Phänotyps begleitet. Zu diesen zählen neben einem exponentiellen Anstieg der Mortalitätsrate^[70-73], körperlichem Verfall^[74] und einer Abnahme von Fruchtbarkeit, Bewegung, Futteraufnahme und Kotabsatz^[75-81] auch die Akkumulation von Deletionen in der mtDNA^[82, 83]. Die Lebensspanne von *C. elegans* kann auf vielfältige Weise beeinflusst werden, wobei sowohl genetische als auch pharmakologische Faktoren sowie die Eingriffe in die Lebensbedingungen des Nematoden eine Rolle spielen^[58]. Generell ist eine Kultivierung im Temperaturbereich zwischen etwa 10 °C und 25 °C möglich, wobei die Lebensspanne stark von der Umgebungstemperatur abhängt und Individuen, die bei 15 °C kultiviert werden etwa 2,5-mal länger leben als solche bei einer Temperatur von 25 °C^[48, 58, 84]. Zu den evolutionär konservierten Regulatoren des Alternsprozesses gehören Insulinähnliche Wachstumsfaktoren^[85, 86], die auch bei *C. elegans* die Lebensspanne beeinflussen. Bei diesem codiert das *daf-2*-Gen für den einzigen in diesem Fadenwurm exprimierten Insulin/IGF-1 Rezeptor^[87] und Mutationen dieses Gens führen zu einer Verlängerung der Lebensspanne um bis zu 150%^[75, 88, 89]. Proben der *daf-2*-(e1370)-Mutante aus dem Labor von Prof. Dr. Jacques R. Vanfleteren, Universität Gent, Belgien, werden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert. Im Vergleich zum Wildtyp weisen sie einen veränderten Metabolismus auf, der teilweise Ähnlichkeiten mit dem Dauer-Stadium aufweist^[2]. Erwachsene *daf-2*-(e1370) Tiere nehmen erheblich weniger Futter auf und verbrauchen weniger CO₂ als der Wildtyp^[90]. Wie schon in Abschnitt 2.2.1 über den filamentösen Pilz *Podospira anserina* erwähnt, führt eine verminderte Kalorienzufuhr (CR, von engl. *calorie restriction*) bei einer Vielzahl von Organismen zu einer Verlängerung der Lebensspanne^[41-46, 51-54]. Dies ist auch für *Caenorhabditis elegans* der Fall^[47-50] und wie schon im Falle von *P. anserina* gilt auch hier, dass dieser Mechanismus an einem kurzlebigen Organismus wesentlich schneller und kostengünstiger erforscht werden kann als beispielsweise an Mäusen oder Ratten.

2.2.3 *Drosophila melanogaster*

Die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* gehört zu den genetisch am besten charakterisierten Organismen der Altersforschung und ihr Genom wurde bereits im Jahr 2000 vollständig sequenziert^[91]. Ihre Lebensspanne liegt zwischen 2 und 3 Monaten^[14, 92] und ist einer der großen Vorteile dieses Modellorganismus. *D. melanogaster* ist außerdem recht einfach in der Haltung und es existiert eine Vielzahl von Techniken für die Mutagenese, um beispielsweise die Lebensspanne zu beeinflussen^[93]. Erwachsene Fliegen besitzen fast ausnahmslos postmitotische Zellen; nur einige Zellen der Keimdrüsen und des Darms besitzen noch immer die Fähigkeit sich zu teilen^[94]. Der Alternsprozess von *D. melanogaster* kann somit sehr gut anhand der postmitotischen Zellen untersucht werden, die nach dem Eintritt ins Erwachsenenalter bis zum Tod präsent sind^[95]. Wie bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* (siehe Abschnitt 2.2.2) gibt es auch bei *Drosophila melanogaster* einen inversen Zusammenhang zwischen Umgebungstemperatur und Lebensspanne, so dass eine Reduzierung der Umgebungstemperatur auf 18 °C die Lebensspanne mehr als verdoppeln kann^[96-98]. Auch eine verminderte Kalorienzufuhr führt zu einer Verlängerung der Lebensspanne^[51-53], wie sie auch bei Mäusen^[45], Ratten^[46] und den ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen *Podospora anserina*^[41-44], *Caenorhabditis elegans*^[47-50] und *Nothobranchius furzeri*^[54] beobachtet werden kann. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Überexpression des 22 kDa Hitzeschockproteins (Hsp22) bei *Drosophila melanogaster* einen lebensverlängernden Effekt hat und die Resistenz gegen oxidativen Stress erhöht^[99]. Diese Mutante aus dem Labor von Prof. Dr. Robert M. Tanguay, Université Laval, Québec City, Kanada, steht auch in der vorliegenden Arbeit zur Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms zur Verfügung. Hsp22 gehört zu den sogenannten kleinen Hitzeschockproteinen (sHsps, von engl. *small heat shock proteins*) und seine Expression ist abhängig vom Entwicklungsstadium reguliert^[100]. Es ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert^[99] und das am häufigsten vorkommende Hitzeschockprotein in *D. melanogaster*^[101, 102]. Während junge Fliegen nur wenig Hsp22 exprimieren, enthalten alte Individuen sogar eine größere Menge als nach einem induzierten Hitzeschock^[102].



Abbildung 2.2.3 Individuum der Schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster*. Sie besitzt eine Lebensspanne von 2 bis 3 Monaten^[14, 92] und eignet sich aufgrund dessen sowie ihres vollständig entschlüsselten Genoms^[91] sehr gut als Modellorganismus der Altersforschung. (Bild von Rickard Ignell^[103])

2.2.4 *Nothobranchius furzeri*

Der Türkise Prachtgrundkärpfling *Nothobranchius furzeri* gehört zu einer Familie afrikanischer Zahnkärpflinge, die sich alle durch eine für einen Vertebraten sehr kurze Lebensspanne auszeichnen. Bei *N. furzeri* liegt diese – abhängig vom betrachteten Wildstamm – zwischen 12 - 13 Wochen (GRZ-Stamm)^[104, 105] und 25 - 32 Wochen^[104]. Diese kurze Lebensspanne hängt mit dem Lebensraum des Fisches zusammen, der sich typischerweise in Überschwemmungsgebieten befindet in denen während der Regenzeit saisonale Tümpel entstehen. Durch die Entwicklung Dürre-resistenter Eier, die bis zu zwei Jahre in Diapause die Trockenzeit überstehen können, haben sich die Fische optimal an ihre Umwelt angepasst^[105]. Durch das Besetzen einer solchen ökologischen Nische entgehen sie außerdem dem Konkurrenzkampf mit anderen Knochenfischen, da außer Spezies der *Nothobranchiidae* nur noch Lungenfische in diesen saisonalen Tümpeln anzutreffen sind^[106-108]. Letztere verfolgen jedoch eine entgegengesetzte Strategie, da nicht die Eier sondern der erwachsene Fisch die Trockenzeit im Schlamm überdauern kann. Dementsprechend werden Lungenfische auch wesentlich älter; ihre Lebenserwartung in Gefangenschaft beträgt über 20 Jahre^[105]. *N. furzeri* zeigt – wie alle Spezies der *Nothobranchiidae* – einen ausgeprägten Sexualdichromatismus. Während die Weibchen eher unscheinbar gefärbt sind, sind die Männchen sehr farbenprächtig (siehe Abbildung 2.2.4)^[109], was die *Nothobranchiidae* auch zu beliebten Aquarienfischen macht^[105].

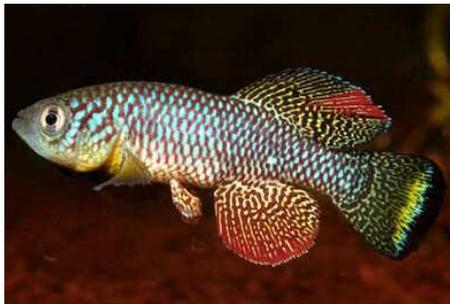


Abbildung 2.2.4 Männchen (links) und Weibchen (rechts) des *Nothobranchius furzeri* Stamms GRZ. Der Sexualdichromatismus lässt sich deutlich erkennen. (Bilder von Alexander Dorn^[109])

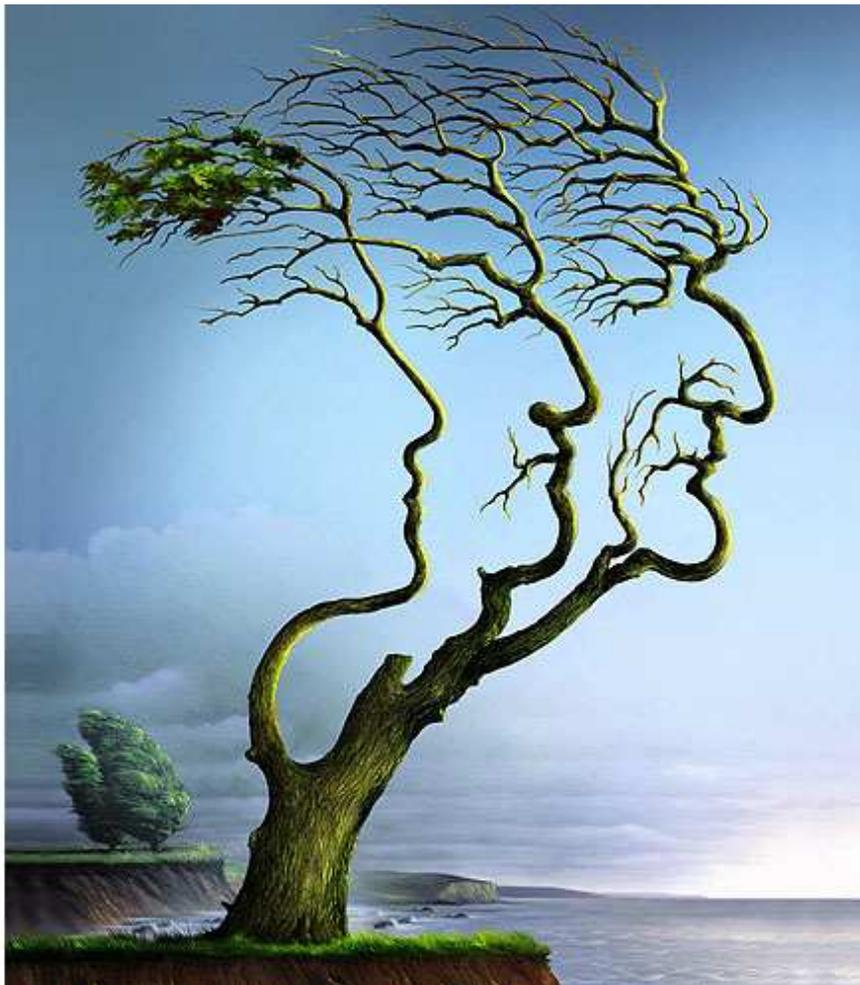
Als Modellorganismus der Alternsforschung ist *Nothobranchius furzeri* insofern von großem Interesse, dass er nicht nur eine kurze Lebensspanne besitzt, denn das erfüllen ja auch weitaus besser etablierte Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans* (siehe Abschnitt 2.2.2) oder *Drosophila melanogaster* (siehe Abschnitt 2.2.3), sondern es sich außerdem auch um einen Vertebraten handelt und somit die evolutionäre Nähe zum Menschen größer ist als bei Nematoden oder Insekten. Modellorganismen, die ebenfalls eine größere evolutionäre Nähe

zum Menschen aufweisen, sind beispielsweise Mäuse oder Ratten, die mit 2 bis 5 Jahren^[14, 110] jedoch auch eine wesentlich längere Lebensspanne besitzen. Als Nachteil ist der zurzeit noch geringe Umfang verfügbarer Techniken für Mutagenese und RNAi zu nennen. Mit einer Größe von etwa 5 cm^[111] sind die Fische außerdem recht klein, so dass ein einzelnes Individuum nur wenig Material für altersabhängige Studien des Proteoms liefert.

Wie bei *Caenorhabditis elegans* (siehe Abschnitt 2.2.2) und *Drosophila melanogaster* (siehe Abschnitt 2.2.3) kann auch bei *N. furzeri* die Lebensspanne durch die Umgebungstemperatur beeinflusst werden. Reduktion der Wassertemperatur von 25 °C auf 22 °C führt zu einer Verlängerung von mittlerer und maximaler Lebensspanne gleichermaßen und verlangsamt die Entstehung altersbedingter Defizite der Lernfähigkeit und des Bewegungsapparats^[112, 113]. Auch eine reduzierte Kalorienzufuhr verlängert das Leben von *N. furzeri*. Die vergleichende Analyse eines Laborstamms und eines direkt aus dem Habitat entnommenen Stamms ergab hierbei unterschiedliche Reaktionen^[54]. Zwar wurde die maximale Lebensspanne bei beiden Stämmen durch die Kalorienrestriktion verlängert, beim Laborstamm jedoch stärker als bei dem direkt aus dem Habitat entnommenen. Bei letzterem kam es weiterhin zu einer erhöhten Sterbewahrscheinlichkeit im jungen Alter^[54]. Proben von *N. furzeri* die einer lebenslangen oder kurzzeitigen Kalorienrestriktion unterworfen waren, werden auch in der vorliegenden Arbeit untersucht und wurden von Dr. Alessandro Cellerino vom Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena zur Verfügung gestellt. Von diesem stammen auch Proben von Fischen, die das Antioxidans Resveratrol verabreicht bekommen haben. Resveratrol ist in der Lage bei verschiedenen Organismen, darunter auch *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster*^[114], Effekte zu imitieren, die eigentlich durch Kalorienrestriktion auftreten, und so die Lebensspanne zu verlängern^[115]. Bei *N. furzeri* konnte beobachtet werden, dass die Verabreichung von Resveratrol in einer Dosis von 600 µg pro Gramm Futter bei erwachsenen Tieren zu einer Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensspanne um 56% bzw. 59% führt^[116]. Weitere Effekte, die in *N. furzeri* durch Resveratrol hervorgerufen wurden, sind der Erhalt der lokomotorischen Funktion sowie eine verminderte Neurodegeneration bei 9 Wochen alten Fischen im Vergleich mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe^[116].

2.2 Motivation

Da der Prozess des Alterns alle Menschen betrifft und wie sonst wohl kaum ein anderer physiologischer oder biochemischer Vorgang auch bei der breiten Allgemeinheit auf ungeheures und ganz persönliches Interesse stößt, erscheint es nicht verwunderlich, dass Alchemie und Wissenschaft schon seit Menschengedenken versuchen, ihn zu verstehen, zu verlangsamen oder gar aufzuhalten oder umzukehren. Doch trotz des enormen Interesses an diesem Prozess, dem sich mit Ausnahme von einigen Mikroorganismen weder Mensch noch Tier noch Pflanze zu entziehen wissen und dessen Auswirkungen jedem nur allzu gut bekannt sind, ist noch sehr wenig über die eigentlichen Ursachen des Alterns bekannt. Sicher ist nur, dass es sich um einen sehr komplexen Vorgang handelt, bei dem genetische, biochemische und zellphysiologische Defekte und Veränderungen ebenso eine Rolle spielen wie natürliche Abnutzungserscheinungen und äußere Einflüsse. Der Prozess des Alterns unterscheidet sich teilweise erheblich zwischen verschiedenen Spezies und bei einigen Organismen konnten auch ganz „private“ Mechanismen identifiziert werden, die deren Lebensspanne beeinflussen^[14].



www.smetek.de – illustrator, graphic designer, painter.

Es existieren jedoch auch Mechanismen des Alterns die sowohl beim Menschen als auch bei bestimmten Modellorganismen der Alternsforschung eine Rolle spielen, so dass anhand von Mäusen, Fliegen, Würmern oder Pilzen gewonnene Erkenntnisse durchaus auch Relevanz für die Alterung des Menschen haben können. Modellorganismen bieten zudem den Vorteil, dass sie, zumindest in den meisten Fällen, nicht nur genetisch manipuliert werden können sondern auch dürfen und außerdem zu jedem beliebigen Zeitpunkt innerhalb ihrer Lebensspanne das gewünschte Probenmaterial entnommen werden kann. Beim Menschen ist eine genetische Manipulation für gerontologische Untersuchungen verständlicherweise ausgeschlossen und die Entnahme von Gewebe extrem beschränkt. Während beispielsweise Blut-, Haut- oder auch Muskel-Proben unter bestimmten Bedingungen noch vom lebenden „Objekt“ Mensch zu verschiedenen Zeitpunkten seines Lebens zu erhalten sind, so ist dies für Gewebe wie das Gehirn oder das Herz quasi ausgeschlossen. Proben dieser menschlichen Organe lassen sich in aller Regel nur posthum analysieren. Der Einsatz von Modellorganismen für die Alternsforschung ist somit unzweifelhaft von großer Bedeutung und auch im Rahmen dieser Arbeit wird auf solche, namentlich den filamentösen Pilz *Podospora anserina*, den extrem kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärpfling *Nothobranchius furzeri* sowie die Schwarzbäuchige Taufliege *Drosophila melanogaster* und den Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, zurückgegriffen.

Theorien für die Ursache des Alternsprozesses gibt es viele, Medvedev (1990)^[117] listet gar über 300 verschiedene auf, die durch zusätzliche Erkenntnisse und Fortschritte in der Forschung auf diesem Gebiet jedoch glücklicherweise auf eine überschaubarere Zahl reduziert werden konnten. Dazu gehören beispielsweise die „somatische Mutationstheorie“, die auf dem Zusammenhang von DNA-Reparaturmechanismen und langer Lebensdauer beruht^[118] sowie die Telomer-Theorie, die eine Verkürzung der die Chromosomen-Enden schützenden Telomere bei der Zellteilung und somit mit fortschreitendem Alter postuliert^[119]. Innerhalb etwa der letzten zwei Jahrzehnte wurde jedoch vermehrt erkannt, dass der komplexe Prozess des Alterns mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf einem einzigen Prozess basiert, sondern eine Vernetzung unterschiedlicher Vorgänge darstellt, die miteinander wechselwirken und Synergien bilden können^[120]. So basiert auch das Thema der vorliegenden Arbeit sowohl auf der „mitochondrialen Theorie“ des Alterns, die die Akkumulation von Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) während des Alterns und ein damit verbundenes Energiedefizit postuliert^[121] sowie der „Theorie der Freien Radikale“, die die Anhäufung von durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, von engl. *reactive oxygen species*) verursachten Schäden an Makromolekülen für das Altern verantwortlich macht^[122]. Da die Komplexe I und III₂ der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten oxidativen Phosphorylierung die Hauptquelle für die endogene ROS-Produktion bilden^[30, 31, 123], sind Lipide und Proteine des Mitochondriums

sowie die mtDNA auch das nächstgelegene Ziel für diese und eine Verbindung der beiden Theorien ist hergestellt. Da Mitochondrien weiterhin im Vergleich mit der Kern-DNA nur über rudimentär ausgebildete DNA-Reparaturmechanismen verfügen^[124, 125], ist auch eine Überschneidung mit der somatischen Mutationstheorie gegeben. Außerdem muss somit von der Etablierung einer Art „Teufelskreis“ ausgegangen werden, da die mtDNA der vermehrten Schädigung durch die bei der oxidativen Phosphorylierung produzierten ROS ausgesetzt ist, es durch unzureichende Reparaturmechanismen zur Akkumulation von Mutationen in der mtDNA kommt und somit fehlerhafte Atmungskettenkomplexe exprimiert werden, die wiederum zu einer vermehrten ROS-Produktion führen. Mitochondrien und auch die in ihrer inneren Membran lokalisierten Komplexe der oxidativen Phosphorylierung scheinen also eine zentrale Rolle beim Prozess des Alterns und auch bei vielen mit dem Alter assoziierten Krankheiten wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit zu spielen.

Aus den oben genannten Gründen sollen im Rahmen dieser Arbeit neue Erkenntnisse über altersabhängige Veränderungen im Vorkommen und der Interaktion der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung bei verschiedenen Modellorganismen gewonnen werden. Da die Ausbildung stöchiometrischer Superkomplexe aus mehreren individuellen Komplexen der Atmungskette Vorteile wie beispielsweise Steigerung der katalytischen Aktivität, Stabilisierung der individuellen Komplexe und die Verhinderung der Generierung reaktiver Intermediate mittels Substratkanalisierung umfassen^[4], sind auch diese Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Da weiterhin die lebensverlängernde Wirkung einer verminderten Kalorienzufuhr ohne dadurch auftretende Mangelernährung bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt ist^[46, 126] und bei vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen werden konnte^[41-54], sind auch Auswirkungen dieser, im englischen Sprachraum als „*calorie restriction*“ (CR) bezeichneten, Ernährungsumstellung auf die Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Daneben existieren auch sogenannte Mimetika für CR, meist kleinere organische Moleküle, deren Verabreichung ebenfalls die positiven, lebensverlängernden Auswirkungen von CR hervorruft^[127]. Interessant ist in diesem Zusammenhang beispielsweise das unter anderem in Schale und Kernen der roten Weinbeere enthaltene Resveratrol^[128], das bei verschiedenen Organismen nachweislich zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt^[111, 114-116] und dessen Auswirkungen auf das mitochondriale Proteom – insbesondere die Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung – deswegen ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

3 Materialien

3.1 Chemikalien

α -Cyano-p-hydroxymethylsäure	Sigma C-2020
β -Mercaptoethanol	Sigma M-6250
β -NADH, reduziert, Dinatriumsalz-Hydrat	Sigma N-6005
4-Iodphenylboronsäure	Aldrich 471933
6-Amino-hexansäure	Fluka 07260
Acetonitril ROTISOLV®	Roth T195.2
Acrylamid (30 %-ige wässrige Lösung)	Roth 3037.1
Acrylamid / Bisacrylamid 29:1 (40 %-ige wässrige Lösung)	Roth A515.1
Adenosin-5'-triphosphat, Dinatriumsalz (Na-ATP), Grade II, min. 99 %	Sigma A3377
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth 8076.2
Ameisensäure p.a.	Merck 264
Ammoniaklösung, 25 % p.a.	Merck 5432
Ammoniumhydrogencarbonat	Fluka 09832
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka 09915
Ammoniumsulfid, 20 %-ige Lösung in Wasser	Sigma A1952
Bacteriorhodopsin (BR)/ Purpurmembran	Frau Christine Schröpfer, AG Dencher
Bisacrylamid (2 %-ige wässrige Lösung)	Roth 3039.1
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth 5239
Coomassie® Brilliant Blue R 250	Fluka 27816
D(+)-Saccharose	Roth 4621.2
Deferoxaminmesylat (Desferal)	Sigma D9533
Digitonin	Acros 407565000 (Charge A0280740)
Digitonin	Calbiochem 300410 (Charge D00033214)
Dimethylsulfoxid (DMSO) für die Molekularbiologie $\geq 99,5\%$	Roth A994.2
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Titrierkomplex III)	Roth 8043.3
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	Merck 1.03861
Essigsäure ROTIPURAN®	Roth 3738.5
Ethanol ROTIPURAN®	Roth 9065.3
Ethanol ROTISOLV®	Roth P076.2
Ethanol, techn.	Chemikalienausgabe des FB 7 Chemie
Ethanol, vergällt $\geq 99,8\%$, mit ca. 1 % MEK	Roth K928.3
Formaldehyd-Lösung, 37 % ROTIPURAN®	Roth 4979.1

Formaldehyd-Lösung, 37 Gew. % in H ₂ O	Sigma-Aldrich 25,254-9
Glycerin ROTIPURAN®	Roth 3783.2
Glycin	Roth 3908.2
HeavyPeptide™ HSLVIFDDL(KLYS(+8DA))	Thermo Scientific
HeavyPeptide™ NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQWEADFLSHLK-COOH	Thermo Scientific
HeavyPeptide™ NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQ-Trp(OH)-EADFLSHLK-COOH	Thermo Scientific
HeavyPeptide™ NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQ-Kyn-EADFLSHLK-COOH	Thermo Scientific
HEPES	AppliChem A1069
HMW Calibration Kit For Native Electrophoresis	GE Healthcare / Amersham 17-0445-01
Imidazol	Fluka 56750
Isopropanol, techn.	Chemikalienausgabe des FB 7 Chemie
Kaliumacetat	Fluka 60034
Kaliumchlorid	Roth 6781.3
Kaliumhexacyanoferrat(III)	Fluka 60300
Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat	Merck 1.02790
LMW Calibration Kit For SDS Electrophoresis	GE Healthcare / Amersham 17-0446-01
Luminol	Fluka 09253
MagicMark™ Western Protein Standard	Invitrogen LC5600
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth P027.2
Methanol ROTISOLV®	Roth X948.2
Methanol, techn.	Chemikalienausgabe des FB 7 Chemie
Milchpulver, Blotting Grade	Roth T145.3
Natriumcarbonat wasserfrei	Roth A135.2
Natriumchlorid	Roth 3957.1
Natriumsuccinat-Hexahydrat	Sigma-Aldrich S2378
Natriumthiosulfat-Pentahydrat	Merck 6516
Natriumthiosulfat wasserfrei	Fluka 72049
PeppermintStick™ Phosphoprotein Molecular Weight Standard	Molecular Probes P27167
Pro-Q® Diamond phosphoprotein gel stain	Invitrogen / Molecular Probes P33300
Protease Inhibitor Cocktail for use with mammalian call and tissue extracts	Sigma P8340
Protein-Free T20 (PBS) Blocking Buffer	ThermoScientific # 37573
Roti®-Block 10x-Konzentrat	Roth A151.2
Roti®-Blot 2A 10x-Konzentrat, Anodenpuffer	Roth P037.1
Roti®-Blot 2K 10x-Konzentrat, Kathodenpuffer	Roth P038.1
Roti®-Blue 5x-Konzentrat	Roth A152.1

Salzsäure Suprapur®	Merck 1.00318
SCAVEGR™	BrainBitsLLC / USA
SDS Pellets	Roth CN30.1
SDS ultra pure	Roth 2326.1
Sequazyme™ Peptide Mass Standard Kit	PE Biosystems P2-3143-00
Sequencing Grade Modified Trypsin	Promega V5111
Serva Blue G (Coomassie G 250)	Serva 35050
Silbernitrat	Roth 7908.2
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate	Thermo Scientific 34076
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain, 1x (1L)	Bio-Rad #170-3125
SYPRO® Ruby Protein Gel Stain, 1x (5L Kanister)	Bio-Rad #170-3138
TRICINE PUFFERAN®	Roth 6977.3
Trifluoressigsäure zur (Peptid)-Synthese	Roth P088.1
TRIS PUFFERAN®	Roth 4855.2
Trockeneis	Chemikalienausgabe des FB 7 Chemie
Wasserstoffperoxid 30% (Perhydrol®)	Merck 1.07209

3.2 Geräte

8-Kanal-Pipette Research 10, 100, 300 µL	Eppendorf
Bio-Imaging-System ViewPix 900	Biostep / Epson
Combitips plus 50, 25, 10, 5, 2,5, 0,5, 0,2 mL	Eppendorf
Densitometer GS-800	Bio-Rad
Digitalkamera EOS 300D	Canon
Drucker HP Color LaserJet 4700dn	HP
Dual Gel Caster SE 245	Hofer
Electronicrührer MULTIPOINT HP	Variomag
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Electrophoresis Power Supply EPS 600	Pharmacia
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Pharmacia Biotech
Electrophoresis Power Supply EPS 1001	Amersham Pharmacia Biotech
Folienschweißgerät	Severin
Folienschweißgerät	SilverCrest
Gelelektrophorese-Apparatur Mighty Small II SE 250	Hofer
Gelelektrophorese-Apparatur Mighty Small II SE 260	Hofer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 400 Ruby™	Hofer / Pharmacia Biotech
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Ruby™	Amersham Biosciences

Gelelektrophorese-Apparatur SE 600 Chroma™	Hoefer
Gradientenmischer	Werkstatt FB Chemie
Hebebühne Boy 115	Rudolf Grauer AG
Hebebühne DIN 12897	Bochem
Homogenisator-Gefäß, 2 mL	B. Braun
Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm
Kopierer iR1022A	Canon
Labor-pH-Meter CG 842	Schott
Laborrührwerk EUROSTAR digital	IKA
Lichtplatte	Hama
Lichttisch G-2004	GEPE
Magnetrührer CB161	Bibby Scientific
Magnetrührer Combimag RCT	IKA
Magnetrührer Combimag REO	IKA
Magnetrührer MAG-H	Gerhardt
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Magnetrührer RCTbasic	IKA
MALDI Probenplatte V 700666 REV.C	PerSeptive Biosystems
Massenspektrometer LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
Massenspektrometer Voyager-DE™ PRO BioSpectrometry™ Workstation	Applied Biosystems
Microplate Reader POLARstar Galaxy	BMG
Multipette® plus	Eppendorf
Peristaltikpumpe MINIPULS® 3	Gilson
Pipette LabMate 1000 µL	Abimed
Pipetten Pipetman 2, 10, 20, 100, 200, 1000, 5000 µL	Gilson
Pipette SL-Pette Autoclavable 100 µL	SLG
Schüttelapparat 3016	GFL
Schüttelapparat HS 260 basic	IKA
Sicherheitswerkbank LaminAir® HLB 2448	Heraeus
Spectrofluorophotometer RF-1501	Shimadzu
Tischzentrifuge micro CENTRIFUGETTE® 4214	ALC
Tischzentrifuge MICROV	FisherScientific
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad
TSQ Vantage Triple Stage Quadrupole Massenspektrometer	Thermo Scientific
Ultra-Low Temperature Freezer MDF-43086S	Sanyo
Ultraschallbad SONOREX TK 52 H	Bandelin

UV-VIS Spektrometer UV-2401PV	Shimadzu
Vakuumpumpe Unijet II	UniEquip
Vakuumpumpe Unijet II	UniEquip
Vortex Schüttler VF2	Janke & Kunkel / IKA
Waage H 54	Mettler
Waage R 200 D	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore
Wasserbad thermed electronic 5001	GFL
Wasserheizbad	GFL
Water Still Distinction D4000	Stuart
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge primoR	Heraeus
Zentrifugenrotor 7500 3325	Heraeus
Zentrifugenrotor F-34-6-38	Eppendorf
Zentrifugenrotor F-45-30-11	Eppendorf

3.3 Verbrauchsmaterialien

Einweg-Pasteurpipetten, graduiert, LDPE	Roth EA62.1
Einweg-Pasteurpipetten mit dünner Spitze, LDPE	Roth EA58.1
Kapillar-Pipettenspitzen, MicroTips XL, 10 µL	Biozym 729025
Kapillar-Pipettenspitzen 200 µL	Biozyme 729015
Kapillar-Pipettenspitzen, MultiFlex Round Tips, 200 µL	Sorenson 28480
Klebefolie	greiner bio-one 676070
MultiScreen™ Solvinert 96-well Filtration System	Millipore MSRLN0410
OMNITIP™ FASTRACK 10 µL Reload	ULPlast 81710
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott 163-6233381
Pipettenspitzen 10 µL	Biozyme 720015
Pipettenspitzen 200 µL	greiner bio-one 739290
Pipettenspitzen 1000 µL	greiner bio-one 686290
Pipettenspitzen Gilson®-Style1000 µL	greiner bio-one 740290
Pipettenspitzen Standard MAKRO 1,5 mL	Roth 5846.1
PLASTIBRAND® Einmal-Küvetten, 1,5 mL, halbmikro, PMMA	BRAND 7591 15
PP-Microplatte, 96 K	Greiner BIO-ONE 651201
PP-Röhrchen, steril, 15 mL	greiner bio-one 188 271
PP-Röhrchen, steril, 50 mL	greiner bio-one 210 270
Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark 05511

Reaktionsgefäße PP, 1,5 mL, mit Deckel	Glasgerätebau Ochs 10-00122
Rotilabo [®] -Blottingpapier 1,5 mm	Roth CL75.1
rotiprotect [®] -LATEX, puderfreie Latex-Einmalhandschuhe, Größe M	Roth L950.1
Safe-Lock Tubes 1,5 mL	Eppendorf 0030 120.086
Safe-Lock Tubes 2,0 mL	Eppendorf 0030 120.094
Schutzärmel, PE	Roth L090.1
Schutzärmel, PE	Roth KP24.1
Sequi-Blot [™] PVDF Membran	Bio-Rad 162-0182
Simpak [®] 2 für Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore SIMPAK0D2
ZipTip _{C4}	Millipore ZTC04S096
ZipTip _{C18}	Millipore ZTC18M960

3.4 Software

Delta2D 3.6	Decodon
BioworksBrowser 3.3.1	Thermo Fisher Scientific
ChemSketch 12.0 Rel. 2	ACD Labs
CorelDRAW 11	Corel
Corel PHOTO-PAINT 11	Corel
Excel 2007	Microsoft
Image Reader LAS-3000 2.1	Fuji
MASCOT	Matrix Science
Pinpoint	Thermo Scientific
Powerpoint 2007	Microsoft
Quantity One 4.4	Bio-Rad
SEQUEST	Thermo Finnigan
UVProbe 1.11	Shimadzu
Word 2007	Microsoft
Xcalibur 2.0.5	Thermo Electron Corporation

3.5 Organismen

3.5.1 *Podospora anserina*

Die isolierten Mitochondrien des filamentösen Pilzes *Podospora anserina* wurden von der Arbeitsgruppe „Molekulare Entwicklungsbiologie“ unter Leitung von Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz, Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt. Anzucht des Pilzes, Isolierung der Mitochondrien und Bestimmung der Proteinkonzentration wurden von Alexandra Werner durchgeführt, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz als Technische Assistentin tätig ist. Für die spätere Auswertung der erhaltenen Ergebnisse muss erwähnt werden, dass die Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sich von der der anderen drei Altersstufen maßgeblich unterscheidet. Während die 6, 9 und 13 Tage alten Proben durch Vorkultivierung auf festem Medium und anschließende Weiterkultivierung in Flüssigmedium bis zum gewünschten Alter gewonnen werden, wird für die seneszenten Proben bis zum Wachstumsstillstand auf festem Medium kultiviert, um anschließend 2 bis 3 cm hinter der Wachstumsfront Myzel zu entnehmen und mit diesem eine Flüssigkultur anzupfen, die noch weitere 5 bis 7 Tage kultiviert wird. Eine detaillierte Beschreibung der Anzucht findet sich in der Diplomarbeit von Saager (2010)^[129]. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte in Anlehnung an Gredilla *et al.* (2006)^[130], jedoch wurden die Mitochondrien nach der 20-minütigen Zentrifugation bei 15.000 g direkt in Isolierungs-Puffer ohne BSA resuspendiert ohne weitere Waschschrte durchzuführen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford^[131, 132].

Eine Besonderheit von *P. anserina* ist, dass im Gegensatz zu anderen Modellorganismen Proben unterschiedlicher Altersstufen vom selben Individuum (derselben Spore) stammen. Somit kann das individuelle Altern für jedes Individuum analysiert werden.

Für eine erste Analyse standen isolierte Mitochondrien von je einer juvenilen (juv, 9 d) und einer seneszenten (sen) Kultur zur Verfügung. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurden jeweils eine weitere juvenile (9 d) und seneszente Kultur von *Podospora anserina* untersucht. Die Kultivierung erfolgte hierbei nicht mit dem bei Saager (2010)^[129] beschriebenen Medium, so dass ein Alter von 9 Tagen hier einem juvenilen Stadium entspricht. Die seneszenten Proben wurden wiederum durch Anzucht auf einem anderen Medium gewonnen welches ein früheres Erreichen des Seneszenzstadiums bewirkt. Dadurch kann jedoch leider auch keine genaue Angabe über das Alter der seneszenten Proben in Tagen gemacht werden. In Tabelle 3.5.1 findet sich eine Übersicht der vier für eine erste Analyse verwendeten Proben von *P. anserina*.

Tabelle 3.5.1 Für eine erste Analyse verwendeten Proben von *Podospora anserina* unter Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer und Proteinkonzentration.

Individuum	Alter	Kulturnummer	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
s(-)F69190	9 d (juv)	#33	44,8
s(-)F89041		#46	29,0
s(-)F69190	sen	#40	30,9
s(-)F89041		#47	34,6

Für eine umfangreichere Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von *P. anserina* stand ein Set aus 12 Proben, bestehend aus 3 Individuen zu je 4 verschiedenen Zeitpunkten, zur Verfügung (siehe Tabelle 3.5.2). Die Gruppe mit den ältesten Individuen wird dabei als seneszent (sen) bezeichnet.

Tabelle 3.5.2 12-teiliges Probenet für eine umfangreiche Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von *Podospora anserina* unter Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer, zugeordneter Altersstufe und Proteinkonzentration.

Individuum	Alter [d]	Kulturnummer	Altersstufe	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
s(-)F89830	6	#52	6d	36,0
s(-)F89840	6	#53	6d	18,3
s(-)F89851	6	#55	6d	31,4
s(-)F89830	9	#64	9d	61,1
s(-)F89840	9	#65	9d	36,0
s(-)F89851	9	#66	9d	35,1
s(-)F89830	13	#54	13d	26,6
s(-)F89840	13	#56	13d	39,4
s(-)F89851	13	#57	13d	50,4
s(-)F89830	15	#61	sen	38,7
s(-)F89840	14	#62	sen	34,7
s(-)F89851	15	#60	sen	26,9

Zukünftige Analysen von *P. anserina* Mitochondrien sollen zu einem großen Teil oxidative Veränderungen des Proteoms durch den Alternsprozess berücksichtigen. Um verlässliche Daten zu erhalten muss eine artifizielle Oxidation durch die Probengewinnung und -bearbeitung bestmöglich ausgeschlossen werden. Dafür soll der Effekt der Zugabe des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien auf den Oxidationsgrad des mitochondrialen Proteoms von *P. anserina* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien derselben Kultur einmal mit und einmal ohne Zusatz von Desferal isoliert. Eine kurze Übersicht dieser Proben findet sich in Tabelle 3.5.3.

Tabelle 3.5.3 *Podospora anserina* Proben mit und ohne Zusatz des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien unter Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer und Proteinkonzentration.

Individuum	Alter [d]	Kulturnummer	Desferal	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
s(-)F111241	7	#81	-	12,1
s(-)F111241	7	#81	+	15,8

3.5.2 *Caenorhabditis elegans*

Die isolierten Mitochondrien des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacques R. Vanfleteren, Universität Gent, Belgien, zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich einerseits um Proben unterschiedlicher alter Tiere und andererseits um Proben des Wildtyps (N2) sowie einer langlebigen *daf-2*-Mutante (*daf-2(e1370)*). Das *daf-2*-Gen codiert in *C. elegans* einen Insulin-ähnlichen Rezeptor^[87]. Die Arbeitsgruppe von Cynthia Kenyon konnte zeigen, dass Mutationen des *daf-2*-Gens eine erhebliche Lebensverlängerung bei *C. elegans* bewirken^[89]. Der N2 Wildtyp stammt aus dem *Caenorhabditis* Genetics Center der Universität von Minnesota, detaillierte Informationen hierzu und über die *daf-2*-Mutante finden sich bei Brys *et al.* (2010)^[2] und Houthoofd *et al.* (2005)^[15]. Für eine vergleichende Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Wildtyp und langlebiger *daf-2*-Mutante (*daf-2(e1370)*) standen zwei Probensätze isolierter Mitochondrien von 2 und 8 Tage alten Nematoden zur Verfügung (siehe Tabelle 3.5.4). Dabei handelt es sich um einen „alten“ und einen „neuen“ Probensatz, bezogen auf den Zeitpunkt der Isolierung der Mitochondrien und die Dauer der Lagerung. Die „alten“ Proben werden für eine erste Analyse und die Optimierung der Solubilisierung und Gelelektrophorese verwendet.

Tabelle 3.5.4 *Caenorhabditis elegans* Proben für eine vergleichende Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms bei Wildtyp (N2) und langlebiger *daf-2*-Mutante (*daf-2(e1370)*) unter Angabe von Probenbezeichnung, Alter, Stamm und Proteinkonzentration. Bezogen auf den Zeitpunkt der Isolierung der Mitochondrien sind die Proben mit „alt“ bzw. „neu“ bezeichnet.

Probe	Alter [d]	Stamm	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
N2_2_neu	2	N2	12,13
N2_2_alt	2		19,12
N2_8_neu	8		17,91
N2_8_alt	8		16,51
daf-2_2_neu	2	<i>daf2(e1370)</i>	11,82
daf-2_2_alt	2		20,31
daf-2_8_neu	8		7,97
daf-2_8_alt	8		13,68

3.5.3 *Drosophila melanogaster*

Die isolierten Mitochondrien der Schwarzbäuchigen Taufliege *Drosophila melanogaster* wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Robert M. Tanguay, Université Laval, Québec City, Kanada, zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich einerseits um Proben unterschiedlich alter Tiere und andererseits um Proben des Wildtyps (WT) sowie einer Hsp22-Überexpressionsmutanten (Hsp22-OE). Die Überexpression des 22 kDa Hitzeschockproteins (Hsp22) hat bei *Drosophila* einen lebensverlängernden Effekt^[99] (siehe Abb. 3.5.1). Ein Vergleich altersabhängiger Veränderungen des (mitochondrialen) Proteoms von Wildtyp und Mutante könnte neue Hinweise auf die Mechanismen des Alterns hervorbringen. Eine Übersicht der von der Arbeitsgruppe von Prof. Tanguay zur Verfügung gestellten Proben findet sich in Tabelle 3.5.5.

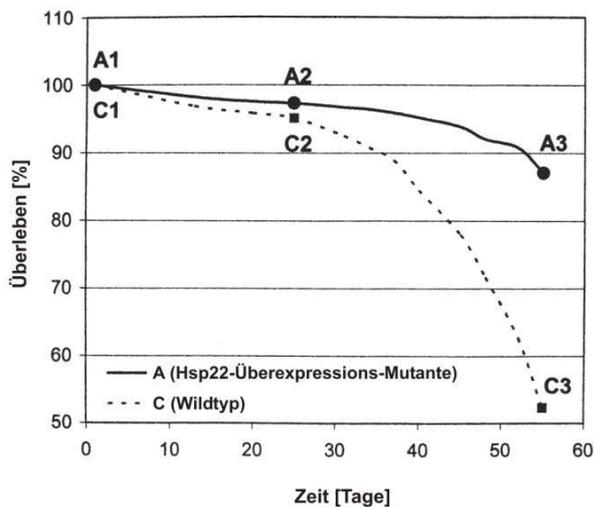


Abbildung 3.5.1 Überlebenskurve des *Drosophila* Wildtyps (gestrichelte Linie) sowie der Hsp22-Überexpressionsmutanten (durchgezogene Linie). Der lebensverlängernde Effekt der Hsp22-Überexpression ist deutlich zu erkennen. Die Markierungen A1 bis A3 sowie C1 bis C3 zeigen, zu welchen Zeitpunkten Mitochondrien isoliert wurden, nämlich nach 1, 25 und 55 Tagen.

Tabelle 3.5.5 *Drosophila melanogaster* Proben für eine vergleichende Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms bei Wildtyp (WT) und Hsp22-Überexpressionsmutante (Hsp22-OE) unter Angabe von Probenbezeichnung, Alter, Stamm und Proteinmenge. Die Proteinkonzentration der Proben ist nicht bekannt.

Probe	Alter [d]	Stamm	Proteinmenge [µg]
A1	1		824
A2	25	Hsp22-OE	1040
A3	55		1055
C1	1		914
C2	25	WT	1120
C3	55		1044

3.5.4 *Nothobranchius furzeri*

Die Proben des Türkisen Prachtgrundkärpflings *Nothobranchius furzeri* (GRZ-Stamm^[104]) wurden von Dr. Alessandro Cellerino vom Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich jeweils um das letzte Stück Muskel vor der Schwanzflosse, wobei Gräte und Haut noch vorhanden sind. In Abbildung 3.5.2 sind zur Verdeutlichung eine Probe eines männlichen und eine Probe eines weiblichen Individuums gezeigt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Proben von *N. furzeri* stammen nicht von unterschiedlich alten Individuen, sondern von Tieren mit unterschiedlichem Ernährungsstatus sowie von mit dem Antioxidans Resveratrol behandelten Fischen. Eine Untersuchung altersabhängiger Proteomveränderungen bei *N. furzeri* findet sich in der Diplomarbeit von Bloeck (2011)^[133].

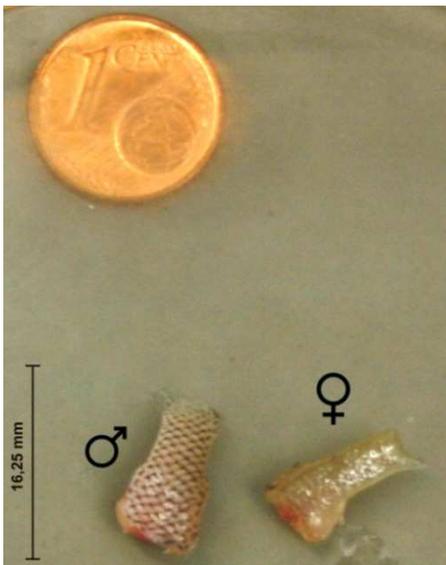


Abbildung 3.5.2 Gewebe eines männlichen (links, ♂) und eines weiblichen (rechts, ♀) Individuums von *Nothobranchius furzeri*, wie es von Dr. Alessandro Cellerino vom Leibniz-Institut für Altersforschung in Jena zur Verfügung gestellt wurde. Das Gewebe männlicher Fische ist dabei in der Regel leicht an seiner Farbenprächtigkeit im Vergleich zur zurückhaltenden Färbung der Weibchen zu erkennen. Weiterhin sind männliche Individuen stets größer als weibliche Tiere desselben Alters, so dass erstere auch mehr Probenmaterial liefern. Zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse ist eine 1 Cent Münze abgebildet.

Die zur Verfügung stehenden Proben werden in drei Gruppen analysiert. Die Proteinkonzentration wird stets mit der Methode nach Bradford^[131, 132] bestimmt (siehe auch Abschnitt 4.2.). Die erste Gruppe umfasst Individuen mit lebenslanger Kalorienrestriktion (CR, von engl. *calorie restriction*) sowie mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion für zwei Wochen (SCR, von engl. *short-term calorie restriction*). Alle Tiere waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 10 Wochen alt. Diese Proben dienen einer ersten Analyse und werden zur Isolierung der Mitochondrien (siehe 4.1.1) entweder komplett mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert, oder es werden vorher Haut und Gräte oder nur die Haut so gut wie möglich entfernt. Eine Übersicht der verwendeten Proben inklusive ermittelter Proteinkonzentration findet sich in Tabelle 3.5.6.

Tabelle 3.5.6 Für eine erste Analyse verwendeten Proben von *Nothobranchius furzeri* unter Angabe von Probennummer, Individuenanzahl, Geschlecht, Ernährungsstatus, Probenbehandlung für die Mitochondrienisolierung und ermittelter Proteinkonzentration.

Probe	Anzahl Individuen	Geschlecht	Ernährungsstatus	Probenbehandlung	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
1	1	vermutl. ♂	CR	- Haut, - Gräte	0,633
2	1	vermutl. ♂	CR		0,507
3	3	vermutl. alle ♀	CR	- Haut	0,631
4	4	vermutl. 2x ♂ + 2x ♀	SCR	- Haut	0,667

Eine zweite Gruppe, die ebenfalls CR- und SCR-Individuen sowie eine *ad libitum* ernährte Kontroll-Gruppe (Ctrl, von engl. *control*) von *N. furzeri* beinhaltet, wird verwendet um den Einfluss des Ernährungsstatus auf das mitochondriale Proteom zu untersuchen. Alle Tiere dieser Gruppe waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 10 Wochen alt. Bei der Mitochondrienisolierung wird nunmehr lediglich die Haut entfernt, auf eine Entfernung der Gräte wird verzichtet. In Tabelle 3.5.7 sind alle dieser Gruppe angehörigen Proben inklusive ermittelter Proteinkonzentration aufgelistet.

Tabelle 3.5.7 *Nothobranchius furzeri* Proben zur Analyse des Einflusses des Ernährungsstatus auf das mitochondriale Proteom unter Angabe von Probennummer, Individuenanzahl, Geschlecht, Ernährungsstatus und ermittelter Proteinkonzentration.

Probe	Anzahl Individuen	Geschlecht	Ernährungsstatus	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
1	1	♀	Ctrl	0,988
2	4	3x ♂ + 1x ♀	SCR	0,395
3	6	1x ♂ + 5x ♀	CR	0,523

Bei der dritten Gruppe von *N. furzeri*-Proben handelt es sich um Fische die ab einem Alter von 5 Wochen das Antioxidans Resveratrol verabreicht bekommen haben sowie eine Kontroll-Gruppe bei der dies nicht der Fall war. Der Einfluss des Resveratrols auf das mitochondriale Proteom soll analysiert werden. Alle Tiere dieser Gruppe waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 9 Wochen alt. Die Verabreichung des Resveratrols begann in der entsprechenden Gruppe in einem Alter von 5 Wochen. Eine Übersicht der genannten Proben inklusive ermittelter Proteinkonzentration findet sich in Tabelle 3.5.8.

Tabelle 3.5.8 *Nothobranchius furzeri* Proben zur Analyse des Einflusses des Antioxidans Resveratrol auf das mitochondriale Proteom unter Angabe von Probenbezeichnung, Individuenanzahl, Geschlecht und ermittelter Proteinkonzentration.

Probe	Anzahl Individuen	Geschlecht	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
Ctrl	2	1x $\sigma^{\text{♂}}$ + 1x ♀	0,806
Resveratrol	9	1x $\sigma^{\text{♂}}$ + 8x ♀	0,494

4 Methoden

4.1 Isolierung der Mitochondrien

Von den Modellorganismen *Podospira anserina*, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* stehen bereits isolierte Mitochondrien zur Verfügung (siehe 3.5); die Isolierung der Mitochondrien aus *Nothobranchius furzeri* erfolgt nach dem in 4.1.1 beschriebenen Protokoll.

4.1.1 *Nothobranchius furzeri*

Das bei -80 °C gelagerte Gewebe (letztes Stück Muskel vor der Schwanzflosse, siehe 3.5.4) von *Nothobranchius furzeri* wird bei Zimmertemperatur aufgetaut und anschließend gewogen. Für eine erste Analyse und zur Optimierung der Isolierung werden die Proben entweder komplett mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert oder es werden vorher Haut und Gräte oder nur die Haut so gut wie möglich entfernt.

Die Isolierung der Mitochondrien aus *N. furzeri* erfolgt in Anlehnung an die Isolierung aus Rattenskelettmuskel wie sie in der Dissertation von Reifschneider (2006)^[134] und bei Radák *et al.* (2000)^[135] beschrieben ist. Alle benötigten Lösungen sind in Tabelle 4.1.1 aufgelistet.

Die Gewebestücke werden mit der 10-fachen Menge (w/v) eisgekühltem Homogenisierungspuffer versetzt und in ein 2 mL Homogenisator-Gefäß (B. Braun) überführt. Anschließend werden zehn Hübe mit 1.500 U/min im *tight-fit* Homogenisator (Glas/Teflon) durchgeführt. Das Homogenisat wird in ein 15 mL Blue-Cap-Röhrchen überführt und für 10 min bei 4 °C in der Eppendorf-Zentrifuge 5804 R (Rotor F-34-6-38) mit 650 g (2.248 rpm) zentrifugiert. Das Sediment, welches Zelltrümmer, nicht zerkleinertes Gewebe sowie eventuell Gräten und/oder Hautstücke enthält, wird verworfen. Der Überstand wird in ein neues Blue-Cap-Röhrchen überführt und ein zweites Mal unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Sediment wird erneut verworfen und der Überstand in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend erfolgt die Abtrennung der Mitochondrien durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4 °C und 14.000 g (10.435 rpm, Eppendorf-Zentrifuge 5804 R, Rotor F-34-6-38). Der Überstand wird verworfen und das mit 2 mL Homogenisierungspuffer pro Gramm eingesetztem Gewebe resuspendierte Sediment ein weiteres Mal für 10 min bei 4 °C und 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Sediment in 1 bis 2 mL Lagerlösung pro Gramm eingesetztem Gewebe resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 4.1.1 Für die Isolierung der Mitochondrien aus *Nothobranchius furzeri* verwendete Lösungen. Beide Lösungen werden mit MilliQ-Wasser angesetzt, steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer		Lagerlösung	
100 mM	KCl	250 mM	Saccharose
50 mM	Tris	direkt vor Benutzung frisch hinzufügen	
1 mM	Na-ATP	0,5% (v/v)	PIC
5 mM	MgSO ₄	2% (v/v)	SCAVEGR™
1 mM	EDTA		
pH 7,4	mit HCl einstellen		
direkt vor Benutzung frisch hinzufügen			
0,5% (v/v)	Protease Inhibitor Cocktail (PIC)		
2% (v/v)	SCAVEGR™		

Tabelle 4.1.2 Zusammensetzung des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™^[136].

SCAVEGR™	
2,5 µg/mL	Superoxid-Dismutase
5,0 µg/mL	Katalase
1,0 µg/mL	Vitamin E
1,0 µg/mL	Vitamin E Acetat
1,0 µg/mL	Glutathion, reduziert
1,0 mg/mL	Albumin

4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration ist nur für die aus *Nothobranchius furzeri* isolierte Mitochondrienfraktion notwendig. Von *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* und *Podospira anserina* stehen bereits isolierte Mitochondrien zur Verfügung (siehe hierzu 3.5 und 4.1), deren Proteinkonzentration bereits in der jeweiligen Arbeitsgruppe ermittelt wurde.

Die Proteinkonzentration der *N. furzeri*-Proben wird, wie in meiner Diplomarbeit^[132] beschrieben, mittels Roti®-Nanoquant bestimmt.

4.3 Solubilisierung von Membranproteinen für BN- und CN-PAGE

Zur Solubilisierung von Membranproteinen wird im Rahmen dieser Arbeit fast ausschließlich das nichtionische Detergens Digitonin verwendet. Dieses solubilisiert Membranproteinkomplexe und -superkomplexe unter Aufrechterhaltung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in ihrer nativen Form^[4] und macht sie für die blau-native (BN) und farblos-native (CN; von engl. *clear-* oder *colorless-native*) Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) zugänglich. Neben Digitonin kommen in dieser Arbeit die ebenfalls nichtionischen Detergenzien *n*-Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) und Triton[®] X-100 zur Solubilisierung für BN- und CN-PAGE zum Einsatz.

Grundsätzlich werden alle Schritte der Solubilisierung auf Eis durchgeführt und sämtliche verwendeten Geräte und Lösungen auf 4 °C vorgekühlt. Die Detergenzkonzentration beträgt bei allen Solubilisierungsansätzen 1% (w/v), so dass die Proteinkonzentration vom Protein/Detergens-Verhältnis abhängig ist. Für die beiden am häufigsten eingesetzten Verhältnisse ergibt sich eine Proteinkonzentration von 1,25 mg/mL (1:8 (w/w)) bzw. 2,5 mg/mL (1:4 (w/w)). Es werden zwei verschiedene Solubilisierungspuffer verwendet (siehe Tabelle 4.3.1), wobei für alle Organismen mit Ausnahme von *Nothobranchius furzeri* mit dem 1,11-fachen Puffer gearbeitet wird.

Tabelle 4.3.1 Zusammensetzung der beiden verwendeten Solubilisierungspuffer.

Solubilisierungspuffer (1,11x)		Solubilisierungspuffer (2x)	
55,55 mM	NaCl	60 mM	HEPES
55,55 mM	Imidazol	300 mM	Kaliumacetat
11,11 % /w/v)	Glycerin	20 % /w/v)	Glycerin
5,55 mM	ϵ -Aminocapronsäure		
pH 7,0	mit HCl einstellen	pH 7,4	mit NaOH einstellen

Die zu solubilisierenden Mitochondrienmembranen werden bei 4 °C aufgetaut und zunächst mit ca. 1 μ L Solubilisierungspuffer pro μ g Protein versetzt und, wenn nötig, resuspendiert, um einen Wechsel von Lager- auf Solubilisierungspuffer zu gewährleisten. Anschließend werden die Proben 8 min bei 4 °C und 20.817 g (14.000 rpm) im F-45-30-11 Rotor der Eppendorf Zentrifuge 5804 R zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und für weitere Analysen bei -20 °C gelagert. Das Sediment enthält die zu solubilisierenden Membranen und wird zunächst in Solubilisierungspuffer resuspendiert. Das Detergens wird als 10%-ige wässrige Lösung (100 mg/mL) hinzugefügt. Im Einzelfall wird bei der Solubilisierung von *Podospora*

anserina-Proben außerdem der Eisenchelator Deferoxaminmesylat (Desferal) in einer Konzentration von 1 mM (ausgehend von einer 10 mM wässrigen Stammlösung) hinzugefügt.

Die Solubilisierungsansätze werden 30 min auf Eis inkubiert und dabei alle fünf bis zehn Minuten kurz geschüttelt (Vortex Schüttler VF2, Janke & Kunkel), anschließend wird 10 min bei 4 °C und 20.817 g (14.000 rpm) im F45-30-11 Rotor der Eppendorf Zentrifuge S804 R zentrifugiert. Der erhaltene Überstand entspricht dem Solubilisat, welches direkt auf ein vorbereitetes BN- oder CN-Gel aufgetragen wird. Das Sediment enthält Membrantrümmer und nicht solubilierte Proteine und wird für weitere Analysen bei -20 °C gelagert.

4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

4.4.1 BN- und CN-PAGE

In der vorliegenden Arbeit kommen in der Regel 16 x 18 cm² große Gele (Außenmaß, H x B) mit einer Dicke von 1,5 mm zum Einsatz. Steht nur eine geringe Proteinmenge zur Verfügung, werden kleine oder mittlere BN-Gele mit einem Außenmaß von 8,2 x 10 cm² bzw. 10,5 x 10 cm² verwendet. Alle BN- und CN-Gele sind diskontinuierliche Gradientengele mit einer Totalacrylamidkonzentration von T = 3 - 13% im Trenngel und T = 3% im Sammelgel. Der Vernetzungsgrad beträgt jeweils C = 3%. Für alle in dieser Arbeit untersuchten Organismen kommt das Imidazol-System zum Einsatz.

Alle weiteren Details zur Vorbereitung und Durchführung einer BN-PAGE finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132] sowie in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137], wo auch die CN-PAGE beschrieben ist.

4.4.2 2D-SDS-PAGE

Stammt der mittels 2D-SDS-PAGE zu analysierende Gelstreifen aus einem großen BN- oder CN-Gel (Außenmaß 16 x 18 cm², H x B), so wird auch die zweite Dimension mit einem solchen durchgeführt, während für die zweite Dimension kleiner oder mittlerer BN- und CN-Gelstreifen stets ein mittelgroßes Gel (Außenmaß 10,5 x 10 cm², H x B) verwendet wird. Jedes 2D-Gel setzt sich aus drei unterschiedlichen Gelen zusammen: einem Trenngel mit T = 13% sowie einem denaturierenden und einem nativen Sammelgel mit je T = 5%. Der Vernetzungsgrad beträgt bei allen drei Gelen C = 3%. Alle weiteren Details zur Vorbereitung und Durchführung einer 2D-BN/SDS-PAGE finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132] sowie in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137], wo auch die 2D-CN/SDS-PAGE beschrieben ist.

4.4.3 Glycin-SDS-PAGE

Für die denaturierende SDS-PAGE werden in der Regel kleine Gele (Außenmaß 8,2 x 10 cm², H x B) verwendet. Für anschließendes Western-Blotting kommen dabei 0,75 mm anstatt 1,5 mm dicke Gele zum Einsatz. Im Einzelfall werden auch große (Außenmaß 16 x 18 cm², H x B) SDS-Gele verwendet. Alle Glycin-SDS-Gele bestehen aus einem Trenngel mit T = 13% und C = 4% sowie einem Sammelgel mit T = 5% und C = 3,3%. Alle weiteren Details zur Vorbereitung und Durchführung finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132] sowie in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137].

4.4.4 Gelfärbemethoden

4.4.4.1 Roti[®]-Blue-Färbung

Sämtlich Details zur kolloidalen Coomassie-Färbung mittels Roti[®]-Blue finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132].

4.4.4.2 Coomassie-Färbung

Neben der Roti[®]-Blue-Färbung mit kolloidalem Coomassie wird auch eine Modifikation der Coomassie-Färbung nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] verwendet, bei der eine Mischung aus Coomassie G-250 und R-250 eingesetzt wird. Eine detaillierte Beschreibung dieser Färbemethode findet sich in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137].

4.4.4.3 Silber-Färbung

Die Silber-Färbung von 2D-Gelen erfolgt leicht abgewandelt nach Blum *et al.* (1987)^[139] und Rabilloud *et al.* (1988)^[140], wie sie in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137] beschrieben ist. Auf die Verwendung einer Lagerlösung wird dabei verzichtet und die Gele werden stattdessen nach beendetem Stoppschritt für mindestens 10 min in bidest. Wasser inkubiert und nach der densitometrischen Visualisierung in Folie eingeschweißt und bei 4 °C gelagert.

4.4.4.4 SYPRO[®] Ruby-Färbung

Sämtlich Details zur Fluoreszenzfärbung mit SYPRO[®] Ruby finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132].

4.4.4.5 Pro-Q[®] Diamond-Färbung

Die Fluoreszenzfärbung von Phosphoproteinen mit Pro-Q[®] Diamond wird bereits in meiner Diplomarbeit^[132] beschrieben.

4.4.5 In-Gel Enzymaktivitätstests

Eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen in-Gel Enzymaktivitätstests für alle fünf Komplexe der oxidativen Phosphorylierung findet sich in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit spielen vor allem die Aktivitätstests für Komplex I, II und IV sowie für die ATP-Synthase (Komplex V) eine Rolle.

4.5 Western-Blotting

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen wird in dieser Arbeit die Technik des Semi-Dry Western-Blottings eingesetzt, wobei elektrophoretisch aufgetrennte Proteine durch Anlegen eines senkrecht zum Gel gerichteten elektrischen Feldes auf eine Polyvinyliden-difluorid (PVDF) Membran übertragen und somit immobilisiert werden. Infolgedessen kann mit Hilfe eines gegen das gesuchte Protein gerichteten primären Antikörpers sowie eines an diesen bindenden, mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP von engl. *horse raddish peroxidase*) gekoppelten, sekundären Antikörpers, ein bestimmtes Protein detektiert werden.

Sämtliche Informationen zur Durchführung des Western-Blottings und zur anschließenden Chemilumineszenz-Detektion finden sich in der Dissertation von Heidrich (2011)^[137].

Eine Liste der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten primären Antikörper findet sich in Tabelle 4.5.1. Die sekundären Antikörper werden in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt und sind alle mit HRP gekoppelt. Dem primären Antikörper entsprechend sind sie gegen Kaninchen bzw. Maus gerichtet. Für die Chemilumineszenz-Detektion kann ein nach Haan & Behrmann (2007)^[141] selbst angesetztes ECL-Reagenz (siehe Tabelle 4.5.2; ECL von engl. *enhanced chemiluminescence*) oder das kommerziell erhältliche SuperSignal[®] West Dura-Kit von Thermo Scientific eingesetzt werden.

Tabelle 4.5.1 Verwendete Primärantikörper.

Antigen	Organismus	Verdünnung	AK-Ursprung
Porin	<i>Podospora anserina</i>	1:5000	Kaninchen
mt Aconitase	<i>Podospora anserina</i>	1:400	Kaninchen
Hsp22	<i>Drosophila melanogaster</i>	1:5000	Kaninchen
Hsp23	<i>Drosophila melanogaster</i>	1:100	Maus
Hsp27	<i>Drosophila melanogaster</i>	1:100	Maus
HSP60	<i>Homo sapiens</i> , verwendet für <i>Drosophila melanogaster</i>	1:5000	Kaninchen

Tabelle 4.5.2 Zusammensetzung des nach Haan & Behrmann (2007)^[141] selbst angesetzten ECL-Reagenz.

ECL-Reagenz	
100 mM	Tris-HCl pH 8,8
1,25 mM	Luminol
2 mM	4-Iodphenylboronsäure (in DMSO)
5,3 mM	H ₂ O ₂ (30 %)

4.6 Massenspektrometrische Methoden

Generell werden sämtliche Arbeitsschritte der Probenvorbereitung, des Verdauens und – im Falle der MALDI-Massenspektrometrie – des Probenauftrags in einer staubfreien Arbeitsbank (Flow Lamin Air) durchgeführt, um eine Verunreinigung der Probe, insbesondere durch Keratin des Experimentators, zu verhindern. Da schon geringe Mengen an Ionen wie beispielsweise Na⁺, K⁺ oder Ca²⁺ die Qualität der Analyse erheblich beeinträchtigen können, werden ausschließlich MilliQ-Wasser sowie Chemikalien hoher Reinheit (HPLC grade oder besser) verwendet.

4.6.1 Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Die Methode des Peptide Mass Fingerprintings (PMF) wird eingesetzt, um Proteine aus 2D-Gelen zu identifizieren. Dazu werden die entsprechenden Spots ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine mit Hilfe einer Protease, meist Trypsin, verdaut, d.h. in spezifische Peptide gespalten, die anschließend massenspektrometrisch analysiert werden. Man erhält für jedes Protein die Massen seiner (tryptischen) Peptide und kann diese anschließend mit Hilfe entsprechender Software mit einer Datenbank vergleichen, um das ursprüngliche Protein zu identifizieren. Der große Vorteil dieser Methode ist die relativ einfache und schnelle Identifizierung unbekannter Proteine im Vergleich zur sehr viel zeitaufwändigeren *de novo*-Sequenzierung mit Hilfe des Edman-Abbaus. Im Gegenzug muss das zu identifizierende Protein (also der entsprechende Organismus) in Form seiner Aminosäure- oder zumindest Basensequenz bekannt und in der entsprechenden Datenbank vorhanden sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird für die Analyse der erzeugten Peptide die Matrix-unterstützte Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF-MS) eingesetzt.

Sämtliche Details zu Probenvorbereitung, tryptischem Verdau, Peptidextraktion, Proben-auftrag, Durchführung der Messung und Identifikation der Proteine finden sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132]. In Tabelle 4.6.1 sind die für die analysierten Organismen eingestellten Taxa aufgelistet.

Tabelle 4.6.1 Zur Identifikation der Peptide mittels MASCOT verwendete Einstellungen für die Taxa der analysierten Organismen.

Organismus	Taxon
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Eukaryota - Metazoa - Caenorhabditis elegans</i>
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>Eukaryota - Metazoa - Drosophila</i>
<i>Nothobranchius furzeri</i>	<i>Eukaryota - Metazoa - Chordata - Actinopterygii - Other Actinopterygii</i>
<i>Podospora anserina</i>	<i>Eukaryota - Fungi - Other Fungi</i>

4.6.2 Flüssig-Chromatographie Elektrospray-Ionisierungs Tandem-Massenspektrometrie (LC-ESI-MS/MS)

4.6.2.1 LC-ESI-MS/MS einzelner Proteinbanden

Soll ein bestimmtes Protein bzw. ein bestimmter Proteinkomplex analysiert werden und ist dessen Position im BN-Gel bekannt, wird die entsprechende Gelbande in der staubfreien Arbeitsbank mit Hilfe eines Skalpell ausgeschnitten und zerkleinert. Die entsprechenden Gelstücke werden jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt. Dabei sollten ausschließlich mit der nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Methode Coomassie-gefärbte Gele verwendet werden (siehe 4.4.4.2), da mit kolloidalem Coomassie gefärbte Gele eine schlechtere Kompatibilität mit der massenspektrometrischen Analyse gezeigt haben.

Die zerkleinerten Gelstücke werden zunächst 20 min in 200 μ L einer 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung inkubiert, anschließend wird die Lösung entfernt und 2x je 20 min in 200 μ L einer 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung mit 50% (v/v) Acetonitril inkubiert, um die Gelstücke zu entfärben. Sind die Gelstücke nach der zweimaligen Inkubation noch nicht vollständig entfärbt, wird der Schritt wiederholt, bis keine Färbung mehr zu erkennen ist; dabei kann es sinnvoll sein, über Nacht bei Zimmertemperatur zu inkubieren. Nach vollständiger Entfärbung der Gelstücke erfolgt eine 5-minütige Inkubation in 200 μ L Acetonitril, wodurch dem Gel Wasser entzogen wird, die Stücke schrumpfen und eine milchig-weiße Färbung annehmen. Anschließend wird die Lösung entfernt und die Gelstücke werden in einem Vacuumkonzentrator getrocknet. Damit wird die vollständige Entfernung des Acetonitrils gewährleistet, welches den folgenden tryptischen Verdau stören würde.

Tabelle 4.6.2 Behandlung der zerkleinerten Gelstücke zur Vorbereitung auf die LC-ESI-MS/MS-Analyse. Alle Lösungen werden nach der entsprechenden Inkubationszeit wieder entfernt. Der Überstand nach dem Verdau wird entnommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, die durch die Peptidextraktion erhaltenen Überstände werden diesem hinzugefügt.

Schritt	Volumen	Lösung
	200 µL, 1x 20 min	50 mM NH ₄ HCO ₃
Entfärben/ Vorbereitung	200 µL, 2x 20min	50 mM NH ₄ HCO ₃ / 50 % (v/v) Acetonitril
	200 µL, 1x 5 min	100% Acetonitril
Acetonitril im Vacuumkonzentrator vollständig entfernen.		
Verdau	10 - 20 µL, 1x 20 min, 4 °C, anschließend min. 6 h, 37 °C	10 µg/mL Trypsin in 25 mM NH ₄ HCO ₃ mit 20 % (v/v) Methanol
Peptidextraktion	50 µL, 2x 15 min sonifizieren	50 % (v/v) Acetonitril/ 0,5 % (v/v) Ameisensäure
Vereinte Überstände im Vacuumkonzentrator vollständig eindampfen.		
Resuspendierung	20 µL, 1x 3 min sonifizieren	2 % (v/v) Acetonitril/ 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Das für den Verdau verwendete Trypsin wird als lyophilisiertes Pulver à 20 µg geliefert und sollte möglichst in diesem Zustand gelagert werden, da in wässriger Lösung Selbstverdau stattfindet. Um eine rasche Verfügbarkeit zu gewährleisten wird jedoch stets eine kleine Menge des Trypsins in Aliquots à 50 µL mit einer Konzentration von 20 µg/mL (entsprechend 1 µg Trypsin) in 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung vorgehalten und bei -20 °C gelagert. Dabei ist mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Aliquots nicht ratsam und es sollte immer nur die benötigte Menge aufgetaut und ein eventueller Rest verworfen werden.

Vor Benutzung werden pro Trypsin-Aliquot 30 µL 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung sowie 20 µL Methanol hinzugefügt. Durch die Zugabe von Methanol soll dabei eine leichtere Zugänglichkeit der hydrophoben Bereiche von Membranproteinen erreicht werden. In jedes Reaktionsgefäß werden 10 bis 20 µL der so erhaltenen Trypsin-Lösung gegeben, wobei darauf zu achten ist, dass die Gelstücke vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sind. Ist dies nicht der Fall wird weitere 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung zugegeben^[142]. Die durch die Behandlung mit Acetonitril geschrumpften Gelbanden absorbieren die Flüssigkeit und nehmen dadurch wieder ihre ursprüngliche Größe an. Um eine optimale Aufnahme der Trypsin-Lösung in das Gel zu gewährleisten, werden die Proben zunächst 20 min bei 4 °C inkubiert, so dass der Selbstverdau des Trypsins größtenteils unterdrückt ist und die Lösung das Gel möglichst vollständig durchdringen kann. Anschließend erfolgt der eigentliche Verdau für mindestens 6 h bei 37 °C.

Nach erfolgtem Verdau wird zunächst der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgt die Extraktion der Peptide aus dem Gel durch zweimalige Sonifizierung in 50% (v/v) Acetonitril/0,5% (v/v) Ameisensäure für je 15 min. Der erhaltene Überstand wird jeweils mit dem direkt nach dem Verdau erhaltenen vereint, so dass am Ende für jede Probe eine sich aus drei Überständen zusammensetzende Lösung erhalten wird. Die Peptidlösung wird anschließend in einem Vacuumkonzentrator bis zur vollkommenen Trockenheit lyophilisiert. In diesem Zustand können die Peptide problemlos mehrere Wochen und auch Monate bei -20 °C gelagert werden. Transport oder Versand sind auch ohne Kühlung möglich.

Direkt vor der massenspektrometrischen Analyse werden die Peptide durch 3-minütiges Sonifizieren in 20 µL 2% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) Ameisensäure resuspendiert. Die Messungen werden an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer von Thermo Scientific in der Arbeitsgruppe von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum von Dr. Ansgar Poetsch und Dr. Sascha Rexroth durchgeführt.

4.6.2.2 LC-ESI-MS/MS komplexer Mitochondrienproben

Ist noch nicht bekannt, welche Proteine oder Proteinkomplexe eine Rolle beim Alternsprozess spielen, kann mittels LC-ESI-MS/MS nach Veränderungen in der Proteinmenge sowie nach posttranslationalen Modifikationen gesucht werden.

Dafür werden die isolierten Mitochondrien mit SDS solubilisiert und anschließend 10 µg Protein (vor Solubilisierung) pro Probe in jeweils eine Spur eines kleinen SDS-Gels (siehe Abschnitt 4.4.3) aufgetragen. Da alle enthaltenen Proteine analysiert werden sollen, wird die Elektrophorese gestoppt, nachdem die Lauffront etwa 1 cm weit ins Trenngel eingelaufen ist. So erhält man für jede Probe nur eine Bande, die durch den Bromphenolblau-haltigen SDS-Auftragspuffer blau gefärbt ist, wodurch eine nachträgliche Färbung des Gels nicht notwendig ist. Beim Durchlaufen des Sammelgels können auf diese Weise Verunreinigungen abgetrennt werden.

Die Bande wird nach Beendigung der Elektrophorese in der staubfreien Arbeitsbank mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten und zerkleinert. Die Gelstücke werden in ein Reaktionsgefäß überführt. Da das Gel nicht zusätzlich gefärbt und die Proteine somit auch nicht fixiert wurden, muss dies direkt nach der Elektrophorese geschehen. Das Gel darf keines Falls über Nacht gelagert werden, da sich die Banden durch Diffusion stark verbreitern und somit ineinanderlaufen, was eine Vermischung mit den Proteinen benachbarter Spuren zur Folge hat. Die Vorbereitung für die LC-ESI-MS/MS-Analyse erfolgt wie in Abschnitt 4.6.2.1 beschrieben (siehe auch Tabelle 4.6.2).

4.6.2.3 Multidimensionale Proteinidentifikations-Technik (MudPIT)

Als Ergänzung zur Analyse von Proteinen aus Polyacrylamidgelen ist die von Yates *et al.* (2001)^[143, 144] entwickelte multidimensionalen Proteinidentifikations-Technik (MudPIT, von engl. *multidimensional protein identification technology*) geeignet. Da die Proteine dabei zuerst denaturiert und anschließend chemisch oder enzymatisch verdaut werden, erfolgt die Trennung erst auf Peptidebene. Dort spielen Löslichkeitsprobleme eine sehr viel geringere Rolle, so dass diese Technik vor allem auch für die Analyse von Membranproteinen sehr gut geeignet ist^[145]. Nach dem Verdau werden die Peptide in selbst-gepackten Quarzglas-Säulen durch zwei orthogonale Phasen getrennt und ins Massenspektrometer eluiert. Für die Trennung eignet sich beispielweise die Kombination von *reversed phase*- und starker Kationenaustausch-Chromatographie (SCX, von engl. *strong cation exchange*)^[146].

Im Rahmen dieser Arbeit wird die MudPIT verwendet, um oxidativ modifizierte Proteine aus isolierten Mitochondrien von *Podospora anserina* zu identifizieren. Da die Theorie der Freien Radikale davon ausgeht, dass oxidative Schäden während des Alternsprozesses akkumuliert werden^[122], erfolgt die Analyse anhand von Mitochondrien seneszenter *P. anserina* mit einem Alter von 14 bzw. 15 Tagen (Kulturnummern #60, #61 und #62, siehe Tabelle 3.5.2). Die drei Proben werden dabei im Verhältnis 1:1:1 gemischt. Die Probenvorbereitung erfolgt ausgehend von den sedimentierten Mitochondrien. Es werden 300 µg Protein (100 µg je Kultur) eingesetzt. Das im Folgenden beschriebene Vorgehen bezieht sich auf die Probenvorbereitung von 100 µg Protein.

Die sedimentierte Probe wird mit 60 µL Methanol versetzt und durch 10-minütiges Sonifizieren resuspendiert. Anschließend werden 40 µL 25 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung (pH 8,6; eingestellt mit 25 %-iger NH₃-Lösung) zugegeben. Diese sollte maximal eine Woche bei 4 °C gelagert werden. Nach Zugabe von 1 µg Trypsin, entsprechend 2 µL einer Stammlösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/mL, erfolgt der Verdau über Nacht bei 37 °C. Anschließend werden die Membranüberreste durch Zentrifugation bei 4 °C (15.000 rpm ≡ 21.885 g, 137 min, Heraeus Biofuge primo R, Winkelrotor 75007593) abgetrennt. Der die Peptide enthaltende Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µL 2% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) Ameisensäure versetzt. Anschließend wird die Peptidlösung in einem Vacuumkonzentrator bis zur vollkommenen Trockenheit lyophilisiert. Die massenspektrometrische Analyse erfolgt an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer von Thermo Scientific in der Arbeitsgruppe von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum und wird von Dr. Ansgar Poetsch und Dr. Sascha Rexroth durchgeführt.

4.6.3 Multiple Reaction Monitoring (MRM)

Das “*Multiple Reaction Monitoring*” (MRM) ist eine Variante des “*Selected Reaction Monitoring*” (SRM). Während MRM eine vergleichsweise neue Technik in der Massenspektrometrie darstellt, wird SRM schon seit einigen Dekaden in der Toxikologie und Pharmakokinetik eingesetzt^[147]. Beide Methoden sind hochspezifisch und ermöglichen die gezielte Detektion eines einzelnen (bekannten) Analyten aus einer komplexen Mischung. Gemessen werden dabei sogenannte Übergänge, nämlich die Fragmentierung eines spezifischen Vorläufer-Ions in ein (SRM) oder mehrere (MRM) Fragment-Ionen. Hier wird auch der Unterschied zwischen SRM und MRM deutlich: Während beim *Selected Reaction Monitoring* nur ein einzelner Übergang gemessen wird, können dies beim *Multiple Reaction Monitoring* mehrere pro Vorläufer-Ion sein oder auch mehrere Analyten (= Vorläufer-Ionen) mit ebenfalls mehreren Übergängen zu spezifischen Fragment-Ionen gleichzeitig gemessen werden^[147]. Dabei kommen in der Regel Triple-Quadrupol-Instrumente zum Einsatz^[147]: Der erste (Q1) und dritte (Q3) Quadrupol werden als Massenfilter eingesetzt. In Q1 wird die Masse des Vorläufer-Ions selektiert und nur diese Ionen gelangen in den zweiten Quadrupol (Q2), wo sie fragmentiert werden. Dafür wird die sogenannte Kollisions-vermittelte Dissoziation (CID, von engl. *collision-induced dissociation*) verwendet^[147], bei der die Ionen durch Kollision mit einem inerten Stoßgas (He, N₂, Ar) fragmentiert werden^[148]. In Q3 wird schließlich die Masse des gewünschten Fragment-Ions selektiert und nur diese zum Detektor durchgelassen (siehe Abbildung 4.6.1). Somit sind für einen Übergang stets zwei Ionen (Vorläufer- und zugehöriges Fragment-Ion) notwendig, um ein Signal zu erzeugen, so dass es sich bei SRM und MRM um extrem spezifische Methoden mit sehr geringem Hintergrund und entsprechend großer Sensitivität handelt^[147].

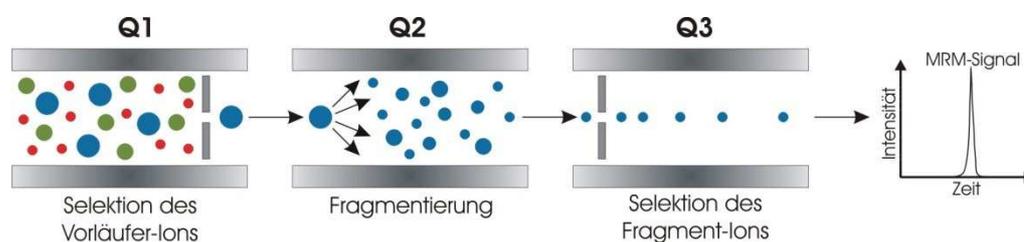


Abbildung 4.6.1 Schematische Darstellung des *Selected* bzw. *Multiple Reaction Monitoring*. Verwendet wird ein Triple-Quadrupol Massenspektrometer, bei dem der erste (Q1) und dritte (Q3) Quadrupol als Massenfilter und der zweite Quadrupol (Q2) als Kollisionszelle dienen. In Q1 wird die Masse des gewünschten Vorläufer-Ions selektiert und ausschließlich Ionen der selektierten Masse gelangen in Q2, wo sie mittels *collision-induced dissociation* (CID) fragmentiert werden. In Q3 wird schließlich die Masse des gewünschten Fragment-Ions selektiert; nur Ionen entsprechender Masse werden zum Detektor weitergeleitet. Die Selektion und Analyse eines bestimmten Vorläufer-Ions mit dazugehörigem Fragment-Ion bezeichnet man als Übergang (engl. *transition*). Um ein MRM-Signal zu erzeugen sind somit stets zwei Ionen (Vorläufer- und zugehöriges Fragment-Ion) notwendig, was diese Methode extrem spezifisch macht sowie zu einem sehr geringen Hintergrund und einer entsprechend hohen Sensitivität führt.

Wie viele Übergänge gleichzeitig gemessen werden können hängt von verschiedenen Faktoren ab, von denen die sogenannte „*cycle-time*“ (deutsch: Zyklusdauer, Durchlaufzeit) des Massenspektrometers die wichtigste ist.^[147] Die *cycle-time* ist die Zeitspanne, die das Instrument für Separation und Detektion jedes einzelnen Übergangs braucht und ist direkt proportional zur sogenannten „*dwell-time*“ (deutsch: Verweilzeit). Letztere ist die Zeit, die für die Analyse jedes einzelnen Übergangs notwendig ist, also die Zeit während der ein Massenanalysator lediglich ein Ion misst und detektiert^[147]. *Cycle-* und *dwell-time* beeinflussen sowohl die Anzahl möglicher Übergänge als auch die Sensitivität. Eine Erhöhung der *dwell-time* erhöht auch die Sensitivität führt jedoch gleichzeitig zu einer längeren *cycle-time*, so dass weniger Übergänge gleichzeitig gemessen werden können^[147]. Die *dwell-time* sollte somit für jedes Experiment optimiert werden. Um die Vorteile des MRM möglichst vollständig ausschöpfen zu können, müssen außerdem sinnvolle Übergänge ausgewählt werden. Sowohl Vorläufer- als auch Fragment-Ionen sollten mit der gewählten Methode gut und in ausreichendem Maße ionisierbar sein und es ist zwingend erforderlich, dass nur solche Fragment-Ionen gewählt werden, die eine für das Vorläufer-Ion spezifische Masse aufweisen.

In Kombination mit AQUA (für engl. *absolute quantification*, siehe Abschnitt 4.8.2.3) kann die MRM-Technik für die spezifische Identifizierung und entsprechend genaue, absolute Quantifizierung verwendet werden. Dies soll bei zukünftigen Analysen von *Podospora anserina* als Methode der Wahl eingesetzt werden sobald eine interessante altersabhängige Modifikation identifiziert wurde. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die Übergänge für die Quantifizierung der oxidativen Modifizierung eines spezifischen Tryptophan-Rests der ATP-Synthase von *Podospora anserina* optimiert (Abschnitt 5.1.2.1). Eine relative Quantifizierung ist durch den Vergleich der Peakflächen (siehe Abschnitt 4.8.2.2) der erhaltenen MRM-Signale möglich. Die MRM-Analysen erfolgen – sofern nicht anders angegeben – mit einem TSQ Vantage Triple-Quadrupol Massenspektrometer von Thermo Scientific und werden in der Arbeitsgruppe von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum von Dr. Ansgar Poetsch und Dr. Sascha Rexroth durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgt wie in Kapitel 4.6.2.1 für die Analyse einzelner Banden mittels LC-ESI-MS/MS beschrieben.

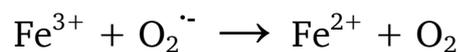
4.7 *In vitro* Oxidation

Um bei der Analyse oxidativer Proteinmodifikationen sicherzustellen, dass diese physiologischen Ursprungs sind, ist eine Positivkontrolle notwendig. Dazu wird eine *in vitro* Oxidation basierend auf der Fenton-Reaktion durchgeführt.

Bei der Fenton-Reaktion handelt es sich um den Eisensalz-abhängigen Zerfall von Wasserstoffperoxid, wobei Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert wird und ein hochreaktives Hydroxylradikal entsteht^[149].



Die Fe^{2+} -Ionen stammen dabei in der Regel aus der bereits 1932 von Haber & Weiss^[150] beschriebenen Reaktion von Fe^{3+} -Ionen und Superoxidradikal-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Letztere entstehen wiederum hauptsächlich an den Komplexen I und III₂ der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran^[29-31].



Manzanares *et al.* (2007)^[151] beschreiben die *in vitro* Oxidation von *bovine lipid extract surfactant* (BLES), einer durch eine Lungenspülung aus Rind gewonnenen Mischung aus Proteinen und Phospholipiden, die beim Menschen zur Behandlung von ANS (Atemnotsyndrom des Neugeborenen) eingesetzt wird^[152]. Mittels Fluoreszenzspektroskopie konnten Manzanares *et al.* (2007)^[151] die Oxidation von Tryptophan zu *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) nach Behandlung mit Fenton-Reagenz nachweisen, da beide Oxidationsprodukte unterschiedliche Excitations- und Emissionsmaxima aufweisen^[151]. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit das altersabhängige Auftreten eben dieser Modifikationen untersucht werden soll, wird die von Manzanares *et al.* (2007)^[151] eingesetzte Methode zur Herstellung einer Positivkontrolle getestet. Dafür werden zunächst BSA und Bacteriorhodopsin (BR) eingesetzt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 4.7.1 beschrieben.

Tabelle 4.7.1 Für die *in vitro* Oxidation nach Manzanares *et al.* (2007)^[151] verwendete Lösungen. Beide Lösungen werden mit MilliQ-Wasser angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Arbeitslösung (100x)		FeCl ₂ /EDTA-Stammlösung (10x)	
2 M	Tris	6,5 mM	FeCl ₂
150 mM	CaCl ₂	6,5 mM	EDTA
15 mM	NaCl		
pH 7,4	mit HCl einstellen		

Die Oxidation erfolgt jeweils mit 5 mg BSA bzw. BR für 24 h bei 37 °C im Wasserbad. Als Referenz werden jeweils 5 mg/mL BSA bzw. BR in 1x Arbeitslösung angesetzt und zusammen mit dem Oxidations-Ansatz 24 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zusammensetzungen von Oxidations-Ansatz und Referenz sind in Tabelle 4.7.2 beschrieben. Für die Oxidation von BSA wird eine 50 mg/mL Stammlösung verwendet.

Tabelle 4.7.2 Zusammensetzung von *in vitro* Oxidations-Ansatz und Referenz nach Manzanares *et al.* (2007)^[151].

<i>In vitro</i> Oxidations-Ansatz		Referenz	
5 mg	BSA oder BR	5 mg	BSA oder BR
10 µL	Arbeitslösung (100x)	10 µL	Arbeitslösung (100x)
100 µL	FeCl ₂ /EDTA-Stammlösung (10x)	mit MilliQ-Wasser auf 1 mL auffüllen	
3 µL	H ₂ O ₂ (30%)		
mit MilliQ-Wasser auf 1 mL auffüllen			

Nach 24-stündiger Inkubation werden die Proben im Fluoreszenzspektrometer vermessen, um die Präsenz von NFKyn und Kyn zu überprüfen. Dabei werden die in Tabelle 4.7.3 angegebenen Wellenlängen für Excitation und Emission verwendet.

Tabelle 4.7.3 Für den fluoreszenzspektroskopischen Nachweis von NFKyn und Kyn verwendete Excitations- und Emissionswellenlängen.

Trp-Derivat	Excitation [nm]	Emission [nm]
NFKyn	325	425
Kyn	365	449

Die *in vitro* Oxidation von *Podospora anserina* Proben findet während der 30-minütigen Inkubation für die Solubilisierung statt. Für diese wird der in Tabelle 4.7.4 aufgeführte, mit Fenton-Reagenz versetzte Solubilisierungspuffer verwendet.

Tabelle 4.7.4 Mit Fenton-Reagenz versetzter Solubilisierungspuffer für die *in vitro* Oxidation von *Podospora anserina* Proben.

Solubilisierungspuffer für die <i>in vitro</i> Oxidation	
1% (w/v)	Digitonin
1% (v/v)	Arbeitslösung (100x)
10% (v/v)	FeCl ₂ /EDTA-Stammlösung (10x)
0,3% (v/v)	H ₂ O ₂ (30%)
in Solubilisierungspuffer (1,11x) aus Tabelle 4.3.1	

4.8 Quantifizierung

4.8.1 Gelelektrophoretische Methoden

4.8.1.1 Quantifizierung aus der ersten Dimension mit Quantity One

Gelbanden aus Coomassie-gefärbten BN-Gelen oder SDS-Gelen der ersten Dimension können mit Hilfe der Software Quantity One quantifiziert werden. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise findet sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132]. Dabei kann die Färbung sowohl mit kolloidalem Coomassie (siehe Abschnitt 4.4.4.1) als auch mit dem nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Färbeprotokoll erfolgen (siehe Abschnitt 4.4.4.2). Im Gegensatz zur Quantifizierung aus der zweiten Dimension wird in der ersten Dimension kein Standard zum Ausgleich von Färbeunterschieden eingesetzt und es findet keine entsprechende Normierung der Daten statt. Diese Art der Quantifizierung sollte somit nur für den Vergleich von Proben angewandt werden, die sich auf demselben Gel befinden. Desweiteren ist die Zuordnung von Banden sowie die exakte Trennung und Unterscheidung im Gegensatz zu 2D-Gelen erschwert, so dass insbesondere im hohen Massenbereich des Gels, wo sich Oligomere der ATP-Synthase und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung befinden, die Quantifizierung weniger genau ausfallen kann.

4.8.1.2 Quantifizierung aus der zweiten Dimension mit Delta2D

Für die Quantifizierung aus der zweiten Dimension (2D-BN/SDS-PAGE) werden mit den Fluoreszenzfarbstoffen SYPRO[®] Ruby bzw. Pro-Q[®] Diamond gefärbte Gele verwendet, wobei Pro-Q[®] Diamond spezifisch phosphorylierte Proteine anfärbt. Für die Quantifizierung der Gesamtmenge an Protein werden stets SYPRO[®] Ruby-gefärbte Gele eingesetzt. Eine ausführliche Beschreibung der Vorgehensweise und nötigen Einstellungen bei der Quantifizierung mit der Software Delta2D findet sich bereits in meiner Diplomarbeit^[132] sowie bei Frenzel (2006)^[153]. Im Gegensatz zur ersten Dimension, bei der mehrere Proben auf dasselbe Gel aufgetragen werden können, gibt es für jede Probe ein eigenes 2D-BN/SDS-Gel, so dass ein Vergleich zwischen verschiedenen Gelen zwingend notwendig ist. Um diesen Vergleich zu ermöglichen ist es notwendig, die von Gel zu Gel existierenden Unterschiede in der Färbeintensität auszugleichen. Dazu wird, wie schon in meiner Diplomarbeit^[132] und bei Frenzel (2006)^[153] beschrieben, auf jedes Gel die gleiche Menge des LMW-Massenstandards aufgetragen, um so einen Normierungsfaktor für jedes einzelne Gel zu berechnen. Dieser spiegelt die Abweichung der Färbeintensität eines Gels von der durchschnittlichen Färbeintensität aller betrachteten Gele wider.

Um den Normierungsfaktor F für ein Gel zu erhalten, muss zunächst ein Faktor F_k für jede Bande des Markers berechnet werden. Hierfür wird zuerst das durchschnittliche Volumen V_\emptyset über alle n betrachteten Gele gebildet. Die notwendigen Werte für die Volumina V_k in GU (Grauwerteinheiten, von engl. *gray-units*) stammen aus der Auswertung mit Delta2D.

$$V_\emptyset = \frac{\sum_{k=1}^n V_k}{n}$$

Der Faktor F_k für eine Markerbande eines Gels ergibt sich als Quotient ihres durchschnittlichen Volumens V_\emptyset auf allen n Gelen und ihres Volumens V_k auf dem betrachteten Gel.

$$F_k = \frac{V_\emptyset}{V_k}$$

Abhängig von einem gleichmäßigen und reproduzierbaren Laufverhalten werden m Markerbanden zur Berechnung des Normierungsfaktors F herangezogen. Dieser stellt das geometrische Mittel aller zur Normierung herangezogenen Markerbanden dar.

$$F = \sqrt[m]{\prod_{k=1}^m F_k}$$

Schließlich werden die Volumina aller Proteinspots eines Gels mit dem entsprechenden Normierungsfaktor F multipliziert.

4.8.2 Massenspektrometrische Methoden

4.8.2.1 *Spectral Counting*

Die Methode des „*Spectral Counting*“, also des einfachen Zählens der Anzahl an Spektren, die für ein bestimmtes Protein erhalten wurden, gehört zu den so genannten „*label-free*“ Methoden und basiert auf der 2001 von Washburn *et al.*^[144] formulierten Annahme, dass in größerer Menge vorhandene Proteine bei MS/MS-Analysen auch häufiger selektiert und fragmentiert werden und somit eine größere Anzahl von Spektren erzeugen als in der untersuchten Probe weniger häufig vorhandene Proteine. Auch Pang *et al.* (2002)^[154] sowie Gao *et al.* (2003)^[155] sahen einen Zusammenhang zwischen Anzahl der Spektren und Häufigkeit des entsprechenden Proteins. 2004 konnten Liu *et al.*^[156] dies schließlich validieren. Durch LC-MS/MS-Analyse verschiedener Mischungen der sechs Proteine eines SDS-Gel Massenstandards in einem Hefezell-Lysat konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Häufigkeit des Proteins in der Mischung und Anzahl der erhaltenen MS/MS-Spektren über zwei Größenordnungen und mit guter Reproduzierbarkeit festgestellt werden. Somit kann die Methode des *Spectral Counting* als einfache und kostengünstige Methode zur relativen Quanti-

fizierung von Proteinen in komplexen Mischungen verwendet werden. Dabei ist jedoch unbedingt darauf zu achten, die sogenannte „dynamic exclusion“ Funktion abzuschalten, die Ionen, die schon einmal fragmentiert wurden, für eine erneute Fragmentierung ausschließt^[157].

4.8.2.2 Peakfläche

Die Verwendung der Peakfläche eines Peptids zur Quantifizierung von Proteinen anhand von MS/MS-Daten gehört wie das *Spectral Counting* zu den *label-free*-Methoden und basiert auf der Annahme, dass die Peakfläche eines Peptids mit seiner Konzentration und damit auch mit der Konzentration des entsprechenden Proteins korreliert. Chelius & Bondarenko^[158] konnten 2002 am Beispiel von Myoglobin einen linearen Zusammenhang zwischen Peakfläche und Konzentration in einem Bereich von 10 fmol bis 100 pmol nachweisen. Auch in komplexen Mischungen konnten sie ihre Ergebnisse validieren. Die Methode der Quantifizierung anhand der Peakfläche kann für LC-basierte massenspektrometrische Methoden verwendet werden, da die Fläche unter dem Chromatogramm für das gewünschte Peptid integriert wird. Wie beim *Spectral Counting* handelt es sich auch hierbei um eine Methode zur relativen Quantifizierung, die jedoch ebenfalls breite Anwendung findet^[159-162]. Wenn mit dieser Methode quantifiziert werden soll, ist es sinnvoll ein möglichst hochauflösendes Massenspektrometer zu verwenden, um Interferenzen durch Peptide ähnlicher Masse zu minimieren^[157].

4.8.2.3 Absolute Quantifizierung mittels interner Standards (AQUA)

Während die Methoden des *Spectral Counting* und der Bestimmung der chromatographischen Peakfläche des gewünschten Peptids lediglich eine relative Quantifizierung ermöglichen, kann durch den Einsatz isotope-markierter Standards eine absolute Quantifizierung erreicht werden. Bereits 1983 von Disiderio & Kai^[163] beschrieben, hat sich der Zusatz isotope-markierter Standardpeptide zur absoluten Quantifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie unter dem Namen AQUA^[164] (für absolute Quantifizierung) in der Wissenschaft etabliert. Dabei werden ein oder mehrere Peptide des zu analysierenden Proteins ausgewählt und von diesen isotope-markierte Standardpeptide synthetisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden mit ¹³C und ¹⁵N an der N-terminalen Aminosäure markierte Standardpeptide von Thermo Scientific (HeavyPeptide™) verwendet. Diese Standardpeptide werden in einer definierten Menge – in der Regel im Bereich von 10 bis 100 fmol^[165] – zur Probe zugegeben und zusammen mit dieser massenspektrometrisch analysiert. Dadurch, dass die Standardpeptide die gleiche Aminosäuresequenz besitzen, verhalten sie sich hinsichtlich Ionisierbarkeit und Fragmentierung nahezu identisch zu ihren natürlichen Pendanten. Aufgrund ihrer

Isotopenmarkierung weisen sie im Chromatogramm jedoch eine höhere Masse und somit eine leichte Verschiebung auf und können eindeutig identifiziert werden. Für die absolute Quantifizierung werden nun Peakfläche des isotopenmarkierten Standardpeptids und Peakfläche des dazugehörigen Peptids der Probe ermittelt, so dass die Stoffmenge an Peptid in der Probe über einfachen Dreisatz bestimmt werden kann. Für diese Art der Quantifizierung eignet sich im Besonderen die in Abschnitt 4.6.3 beschriebene Methode des *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird AQUA für die Quantifizierung der oxidativen Modifizierung eines spezifischen Tryptophan-Rests der ATP-Synthase von *P. anserina* (siehe Abschnitt 5.1.2.1) eingesetzt. Dafür stehen die in Tabelle 4.8.1 aufgeführten Standardpeptide zur Verfügung. Die Synthese des entsprechenden isotopenmarkierten Peptids mit einem zu *N*-Formylkynurenin oxidierten Tryptophan-Rest war nicht erfolgreich.

Tabelle 4.8.1 Standardpeptide für die absolute Quantifizierung der oxidativen Modifizierung eines spezifischen Tryptophan-Rests der ATP-Synthase von *Podospira anserina*.

Tryptophan-Derivat	Peptidsequenz	Molekulargewicht		Reinheit (HPLC)
		berechnet	experimentell (MS)	
unmodifiziert	NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQWEADFLSHLK-COOH	1606,9	1607,6	> 95%
Hydroxy-Trp	NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQ-Trp(OH)-EADFLSHLK-COOH	1621,9	1620,6	> 95%
Kynurenin	NH ₂ -Ile(13C6, 15N)-LQ-Kyn-EADFLSHLK-COOH	1610,8	1610,7	> 95%
-	HSLVIFDDL(KLYS(+8DA))	1281,5	1282,5	> 90%

Die Standardpeptide werden in Form eines lyophilisierten Pulvers geliefert und müssen gelöst und aliquotiert werden. Das Lyophilisat der in Tabelle 4.8.1 aufgeführten Standardpeptide wird zunächst in 100 μ L einer 50%-igen (v/v) wässrigen Acetonitril-Lösung gelöst; anschließend wird das Volumen mit MilliQ-Wasser auf 1 mL aufgefüllt. Somit liegen die Peptide in wässriger Lösung mit 5% (v/v) Acetonitril vor. Die erhaltenen Lösungen werden jeweils à 20 μ L aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. In Tabelle 4.8.2 sind die von Thermo Scientific gelieferten Massen und Stoffmengen sowie die durch das Lösen resultierenden Konzentrationen und Stoffmengen pro Aliquot für die vier verwendeten isotopenmarkierten Standardpeptide aufgeführt.

Tabelle 4.8.2 Masse und Stoffmenge der für die absolute Quantifizierung verwendeten Standardpeptide von Thermo Scientific (siehe auch Tabelle 4.8.1), sowie Angabe der Konzentration nach dem Lösen in 5%-iger (v/v) Acetonitril-Lösung und der Stoffmenge pro Aliquot.

Standardpeptid	Masse [mg]	Stoffmenge [nmol]	Konzentration [μM]	Stoffmenge pro Aliquot [nmol]
unmodifiziert	0,28	173,8	173,8	3,476
Hydroxy-Trp	0,34	207,0	207,0	4,140
Kynurenin	0,19	119,7	119,7	2,394
Referenz	0,70	546,3	546,3	10,926

4.9 Statistische Methoden

4.9.1 Standardabweichung des Mittelwerts

Da insbesondere die aus den 2D-BN/SDS-Gelen gewonnenen quantitativen Daten oft das arithmetische Mittel mehrerer Werte – meist aus verschiedenen Gelen – wiedergeben, ist die Angabe der Standardabweichung als ein sowohl mathematisches als auch visuelles Maß für die mittlere Abweichung vom Mittelwert^[166] unerlässlich. Die Standardabweichung s berechnet sich aus der Wurzel der Varianz s^2 . „Die Varianz ist ein Maß für die Streuung, welches die quadratische Abweichung der Stichprobenwerte vom Mittelwert quantifiziert.“^[166] Die quadratische Abweichung ergibt sich dabei aus dem Quadrat der Differenz $(\bar{x} - x_i)^2$ für alle n Daten, wobei \bar{x} für den arithmetischen Mittelwert steht, der folgendermaßen definiert ist

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Varianz ergibt sich somit zu

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2$$

wobei zu beachten ist, dass die Summe der Abweichungsquadrate durch $n-1$ und nicht durch n geteilt wird. Dies hängt mit der sogenannten Parameterschätzung zusammen^[166]. Diese spielt immer dann eine Rolle, wenn Aussagen über ein bestimmtes Merkmal einer Grundgesamtheit, die stets eine Verteilungsfunktion aufweist, gemacht werden sollen. „Häufig kennt man zwar die Art der Verteilungsfunktion, aber Parameter wie Mittelwert μ oder Varianz σ sind unbekannt. Mit Hilfe der Parameterschätzung bestimmt man auf der Basis einer Stichprobe Schätz- oder Näherungswerte für diese unbekannt Parameter und versucht dabei auch möglichst noch eine Aussage über die Qualität der Schätzung zu erhalten.“^[166] Die Schätzfunktion für die Varianz ist nur dann erwartungstreu, wenn die Summe der Abweichungsquadrate durch $n-1$ geteilt wird. Teilt man hingegen durch n , wird die Varianz σ^2 immer zu gering geschätzt und somit die Schätzung verzerrt^[166]. Für eine detailliertere Erklärung

von Parameterschätzen und Schätzfunktionen siehe Oestreich & Romberg (2009) „Keine Panik vor Statistik!“, Kapitel 10^[166].

Da die Varianz sich aus der Summe der Abweichungsquadrate ergibt, wird auch die Dimension der Ursprungsdaten quadriert, wodurch sie nur schwer zu interpretieren und wenig anschaulich ist. Aus diesem Grund wird die Standardabweichung, die sich aus der Wurzel der Varianz ergibt und somit dieselbe Dimension wie die Ursprungsdaten besitzt, verwendet, um einen Überblick über die Verteilung der Daten zu erhalten.

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}$$

„Die Standardabweichung ist das wichtigste Maß für die Streuung der Werte in einer Stichprobe. [...] Sie ist, aufgrund der Addition von Quadraten, nie negativ (wird ja auch als Entfernung interpretiert) und nur im Falle, dass alle Werte identisch sind, gleich 0. Wie schon beim Mittelwert, der ja in die Berechnung der Standardabweichung eingeht, besteht allerdings auch hier die Gefahr einer Beeinflussung durch Ausreißer. Extrem große oder kleine Werte im Verhältnis zum Rest können die Standardabweichung stark verändern.“^[166]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Standardabweichung s stets in Excel 2007 mit der Funktion STABW berechnet, die die oben angegebene Formel verwendet. Die Funktion „schätzt die Standardabweichung ausgehend von einer Stichprobe“^[167] und „geht davon aus, dass die ihr übergebenen Argumente eine Stichprobe, gezogen aus einer Grundgesamtheit, darstellen.“^[167]

4.9.2 Wilcoxon-Rangsummentest

Der Wilcoxon-Rangsummentest, auch Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, Mann-Whitney-U-Test oder nur U-Test genannt, ist ein nicht-parametrischer statistischer Homogenitätstest. Er wird verwendet, um die Signifikanz des Unterschieds zwischen zwei Mittelwerten zu berechnen. Dabei wird jedem Messwert ein, seinem numerischen Wert entsprechender, Rang 1, 2, 3, ... n zugewiesen, was einen schnellen Überblick über die Signifikanz der in einem Experiment gemessenen Unterschiede ermöglicht.^[168] Der Test wurde 1945 von Frank Wilcoxon entwickelt^[168] und zwei Jahre später von Henry Mann und Donald Whitney ergänzt^[169].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Wilcoxon-Rangsummentest anhand einer ausführlichen Anleitung aus „*The Excel Guide to accompany Practical Business Statistics*“ von Andrew F. Siegel^[170] in Microsoft Excel 2007 ausgeführt. Dazu werden zunächst die Mess-

werte beider zu vergleichender Gruppen – beispielsweise „alt“ und „jung“ – in einer gemeinsamen Spalte aufgelistet und in der angrenzenden Spalte mit der jeweiligen Gruppenbezeichnung (hier: „alt“ bzw. „jung“) versehen (siehe Abbildung 4.9.1 A). Anschließend wird nach ansteigendem Wert sortiert. Dafür wird in Microsoft Excel 2007 unter dem Menüpunkt „Daten“ die Funktion „Sortieren“ verwendet. Für das in Abbildung 4.9.1 dargestellte Beispiel muss Spalte B nach aufsteigender Größe sortiert werden. Es resultiert eine Tabelle, in der die Messwerte der Gruppen „alt“ und „jung“ nicht mehr getrennt, sondern – aufsteigend nach ihrer Größe sortiert – vermischt vorliegen (siehe Abbildung 4.9.1 B). Jetzt wird jedem Wert sein Rang zugeteilt. Dabei ist zu beachten dass für identische Werte der gemittelte Rang eingesetzt werden muss. Um hierbei keinen Fehler zu machen ist es sinnvoll, zunächst eine neue Spalte C zu generieren, in der jedem Wert eine fortlaufende Nummer, beginnend bei 1, zugeteilt wird. Anschließend kann der Rang jedes Wertes mit der Formel $\text{SUMMEWENN}(\text{Wertebereich};\text{Wert};123\text{Bereich})/\text{ZÄHLENWENN}(\text{Wertebereich};\text{Wert})$ berechnet werden. Für das in Abbildung 4.9.1 B gezeigte Beispiel ergibt sich der Rang in Zelle D2 somit

A			B				
	A	B		A	B	C	D
1	Gruppe	Wert	1	Gruppe	Wert	1, 2, 3, ...	Rang
2	alt	37,5	2	jung	21,5	1	1
3	alt	25,0	3	jung	22,5	2	2
4	alt	57,0	4	alt	25,0	3	3
5	alt	57,0	5	jung	34,0	4	4
6	alt	41,0	6	jung	36,5	5	6
7	alt	86,5	7	jung	36,5	6	6
8	jung	34,0	8	jung	36,5	7	6
9	jung	36,5	9	alt	37,5	8	8
10	jung	36,5	10	alt	41,0	9	9
11	jung	22,5	11	alt	57,0	10	10,5
12	jung	36,5	12	alt	57,0	11	10,5
13	jung	21,5	13	alt	86,5	12	12

Abbildung 4.9.1 (A) Beispiel-Datensatz eines Experiments mit Messwerten für die beiden Gruppen „jung“ und „alt“. Um den Wilcoxon-Rangsummentest mit Hilfe von Microsoft Excel durchführen zu können, müssen zunächst alle Messwerte der beiden Gruppen in einer gemeinsamen Spalte (hier Spalte B) aufgelistet und in der angrenzenden Spalte (hier Spalte A) mit der jeweiligen Gruppenbezeichnung „jung“ bzw. „alt“ versehen werden. **(B)** Anschließend werden die Daten aufsteigend nach ihrem Wert sortiert, so dass eine Tabelle resultiert, in der die Messwerte der beiden Gruppen nicht mehr getrennt, sondern vermischt vorliegen. In Spalte C wird nun jedem Wert eine fortlaufende Nummer zugewiesen, um anschließend in Spalte D den Rang jedes Wertes zu berechnen. Dabei muss für identische Werte der gemittelte Rang eingesetzt werden, was durch Verwendung der Formel $\text{SUMMEWENN}(\text{Wertebereich};\text{Wert};123\text{Bereich})/\text{ZÄHLENWENN}(\text{Wertebereich};\text{Wert})$ gewährleistet wird.

aus der Formel $\text{SUMMEWENN}(\$B\$2:\$B\$13;B2;\$C\$2:\$C\$13)/\text{ZÄHLENWENN}(\$B\$2:\$B\$13;B2)$. Die Benutzung von Formeln bietet hier den Vorteil, dass auch sehr große Datensätze problemlos bearbeitet werden können und außerdem die zu vergleichenden Gruppen auch – anders als im Beispiel gezeigt – unterschiedlich viele Messwerte enthalten können. Um eine Aussage über die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Datensätzen „jung“ und „alt“ zu erhalten, werden als nächstes die mittleren Ränge für beide Gruppen berechnet, wobei $\text{SUMMEWENN}(\text{BereichGruppe};\text{„jung“};\text{BereichRang})/\text{ZÄHLENWENN}(\text{BereichGruppe};\text{„jung“})$ als Formel verwendet wird. Für die Beispieldaten aus Abbildung 4.9.2 kommt somit die Formel $\text{SUMMEWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A2;\$D\$2:\$D\$13)/\text{ZÄHLENWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A2)$ zur Berechnung des durchschnittlichen Rangs der Gruppe „jung“ zur Anwendung. Für die Gruppe „alt“ gilt entsprechend $\text{SUMMEWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A4;\$D\$2:\$D\$13)/\text{ZÄHLENWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A4)$. Die entsprechenden Ergebnisse finden sich in Abbildung 4.9.2. Anschließend wird mit Hilfe der Formel $\text{ABS}(\text{mittlererRang}\text{„jung“}-\text{mittlererRang}\text{„alt“})$ die mittlere Differenz der Ränge bestimmt. Die Funktion ABS gewährleistet dabei, dass stets ein positives Ergebnis erhalten wird. Für das in Abbildung 4.9.2 dargestellt Beispiel ergibt sich die mittlere Differenz der Ränge aus $\text{ABS}(E3-E5)$. Der Standardfehler dieser mittleren Differenz wiederum kann mittels der Formel $(a+b)*\text{WURZEL}((a+b+1)/(12*a*b))$ berechnet werden, wobei a und b den Probenumfang der beiden betrachteten Gruppen darstellen (hier gilt also $a = b = 6$). Durch Division der mittleren Differenz der Ränge durch den Standardfehler ergibt sich die Prüfgröße aus welcher sich mittels der Formel $2*(1-\text{STANDNORMVERT}(\text{ABS}(\text{Prüfgröße})))$ der p-Wert berechnen lässt. Der p-Wert, englisch *p-value*, auch Überschreitungswahrscheinlichkeit oder Signifikanzwert genannt, kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und „ist die Wahrscheinlichkeit unter H_0 , den beobachteten Prüfgrößenwert oder einen in Richtung der Alternative extremeren Wert zu erhalten.“^[171] Je kleiner der erhaltene p-Wert ist, desto mehr spricht das erhaltene Ergebnis gegen die Nullhypothese H_0 . Um mit Hilfe des p-Wertes Rückschlüsse auf die Signifikanz eines gemessenen Unterschieds ziehen zu können, wird vorher eine Grenze – meist 5%, also $p < 0,05$ – festgelegt, unter welcher die Nullhypothese abgelehnt wird. Für das Beispiel in Abbildung 4.9.2 wären die Unterschiede zwischen den Gruppen „jung“ und „alt“ mit einem p-Wert von 0,025 somit als signifikant anzunehmen.

	A	B	C	D	E
1	Gruppe	Wert	1, 2, 3, ...	Rang	
2	jung	21,5	1	1	mittlerer Rang „jung“
3	jung	22,5	2	2	4,17
4	alt	25,0	3	3	mittlerer Rang „alt“
5	jung	34,0	4	4	8,83
6	jung	36,5	5	6	mittlere Differenz der Ränge
7	jung	36,5	6	6	4,67 =ABS(E3-E5)
8	jung	36,5	7	6	Standardfehler der mittleren Differenz der Ränge
9	alt	37,5	8	8	2,08 =(6+6)*WURZEL((6+6+1)/(12*6*6))
10	alt	41,0	9	9	Prüfgröße
11	alt	57,0	10	10,5	2,24 =E7/E9
12	alt	57,0	11	10,5	p-Wert
13	alt	86,5	12	12	0,025 =2*(1-STANDNORMVERT(ABS(E11)))

Abbildung 4.9.2 Nachdem allen Werten ein Rang zugewiesen wurde (siehe Abbildung 4.9.1) wird für beide Gruppen der mittlere Rang berechnet. Dieser ergibt sich für die Gruppe „jung“ aus der Formel $\text{SUMMEWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A2;\$D\$2:\$D\$13)/\text{ZÄHLENWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A2)$ und für die Gruppe „alt“ aus der Formel $\text{SUMMEWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A4;\$D\$2:\$D\$13)/\text{ZÄHLENWENN}(\$A\$2:\$A\$13;A4)$. Mittels der Formel $\text{ABS}(E3-E5)$ kann anschließend die mittlere Differenz der Ränge berechnet werden. Deren Standardfehler wiederum berechnet sich mittels $(a+b)*\text{WURZEL}((a+b+1)/(12*a*b))$, wobei a und b den Probenumfang der beiden betrachteten Gruppen darstellen (hier gilt also $a = b = 6$). Aus der Division der mittleren Differenz der Ränge durch den Standardfehler ($E7/E9$) erhält man die Prüfgröße und aus dieser mittels der Formel $2*(1-\text{STANDNORMVERT}(\text{ABS}(\text{Prüfgröße})))$ schließlich den p-Wert. Im hier dargestellten Beispiel gilt $0,025 = p < 0,05$, so dass die gemessenen Unterschiede zwischen den Gruppen „jung“ und „alt“ als signifikant angesehen werden können.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 *Podospora anserina*

5.1.1 Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe von *P. anserina*

Um eine Aussage über die Veränderung der Mengen von Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter treffen zu können, wird im Rahmen dieser Arbeit die Kombination aus blau-nativer und denaturierender Gelelektrophorese (2D-BN/SDS-PAGE) mit anschließender Färbung durch den Fluoreszenzfarbstoff SYPRO[®] Ruby und Quantifizierung mit der Software Delta2D eingesetzt. Diese Vorgehensweise konnte bereits von Frenzel (2006, 2010)^[153, 172] und Söhn (2010)^[173] für Rattenhirn sowie von Thilmany (2008)^[174] für Rattenleber und in der Diplomarbeit von Bloeck (2011)^[133] für den extrem kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärpfling *Nothobranchius furzeri* erfolgreich angewandt werden. Ähnliche Ansätze finden sich auch bei Lombardi *et al.* (2009)^[175], die altersabhängige Veränderungen des Proteoms aus Rattenmuskel mittels 2D-IEF/SDS-PAGE und 1D-BN-PAGE analysierten, bei Gómez *et al.* (2009)^[176], die mittels 1D-BN-PAGE eine Abnahme der Menge an Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung im alternden Rattenherz feststellen konnten sowie bei Dani *et al.* (2010)^[177], wo mittels der DIGE-Technik (engl. *difference gel electrophoresis*) altersabhängige Veränderungen der Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe aus Rattenleber analysiert wurden.

Tabelle 5.1.1 12-teiliges Probenstet von *P. anserina* Mitochondrien für die quantitative Analyse der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung. Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer und zugeordneter Altersstufe sowie Vergleich der Proteinkonzentrationen "alt" und "neu". Alle Proteinkonzentrationen wurden mittels der Bradford-Methode in der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt am Main) ermittelt. Dabei erfolgte die Bestimmung der "alten" Proteinkonzentrationen für jede Altersstufe an einem anderen Tag und unter Verwendung einer anderen Standardgeraden während die "neuen" Proteinkonzentrationen alle am selben Tag und unter Verwendung derselben Standardgeraden ermittelt wurden.

Individuum	Alter [d]	Kulturnummer	Altersstufe	Proteinkonzentration [µg/µL]	
				alt	neu
s(-)F89830	6	#52	6d	36,0	21,0
s(-)F89840	6	#53	6d	18,3	24,0
s(-)F89851	6	#55	6d	31,4	27,0
s(-)F89830	9	#64	9d	61,1	30,0
s(-)F89840	9	#65	9d	36,0	25,0
s(-)F89851	9	#66	9d	35,1	40,0
s(-)F89830	13	#54	13d	26,6	28,0
s(-)F89840	13	#56	13d	39,4	27,5
s(-)F89851	13	#57	13d	50,4	16,5
s(-)F89830	15	#61	sen	38,7	21,0
s(-)F89840	14	#62	sen	34,7	13,2
s(-)F89851	15	#60	sen	26,9	23,0

Um verlässliche quantitative Ergebnisse zu erhalten, sind bei Probenhandhabung und Datenauswertung einige wichtige Punkte zu berücksichtigen. Die für die Quantifizierung verwendeten 2D-BN/SDS-Gele basieren auf isolierten Mitochondrien, deren Proteine solubilisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Bei allen dabei notwendigen Schritten können Fehler auftreten, die eine quantitative Analyse beeinträchtigen, so dass möglichst sorgfältig und ohne Materialverlust gearbeitet werden muss. Somit ist die Anfertigung mehrerer Replikate pro Probe empfehlenswert, um Fehler aus der Probenhandhabung möglichst zu minimieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden für jede Probe von *Podospora anserina* drei 2D-BN/SDS-Gele angefertigt. Um Proben verschiedener Individuen vergleichen zu können, ist weiterhin eine entsprechende Vergleichsgröße unabdingbar. Hierfür bietet sich natürlich zunächst die pro Gel verwendete Proteinmenge an, so dass für jedes 2D-BN/SDS-Gel dieselbe Proteinmenge, basierend auf den in Tabelle 3.5.2 angegebenen Proteinkonzentrationen, solubilisiert wird. Zu vergleichende Proben sind dabei zwingend mit demselben Protein/Detergens-Verhältnis zu solubilisieren. Des Weiteren wird das für die Solubilisierung verwendete Detergens Digitonin durch Extraktion aus dem Roten Fingerhut (*Digitalis purpurea*) gewonnen, was starke Schwankungen der Qualität zur Folge haben kann. Diese beschränken sich nicht nur auf von unterschiedlichen Firmen angebotenes Digitonin; bereits zwischen zwei Chargen ein und desselben Anbieters können enorme Qualitätsunterschiede auftreten. Aus diesem Grund ist die Verwendung von Digitonin aus nur einer einzigen Charge essentiell, um verlässliche quantitative Daten zu erhalten. Sämtliche in diesem Kapitel vorgestellte Daten wurden basierend auf Solubilisaten mit Digitonin der Charge D00033214 von Calbiochem (Katalognummer 300410) gewonnen. Die Verwendung der eingesetzten Proteinmenge als Vergleichsgröße ist jedoch aus verschiedenen Gründen nicht ganz unproblematisch. Für alle in dieser Arbeit verwendeten Proben wurde die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford (1976)^[131] in der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt am Main) ermittelt, aus der auch die für die vorliegende Arbeit verwendeten Proben von *P. anserina* stammen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dabei für jede Altersstufe an einem anderen Tag und unter Verwendung einer anderen Standardgeraden („alte“ Proteinkonzentration in Tabelle 5.1.1). Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit auch zwischen den Altersstufen zu gewährleisten, ist eine Bestimmung der Proteinkonzentrationen aller Proben am selben Tag und unter Verwendung derselben Standardgeraden wünschenswert. Dies sollte in Zukunft wann immer möglich bevorzugt werden, wenn quantitative Analysen durchgeführt werden. Die Methode nach Bradford ist im Hinblick auf quantitative Analysen jedoch noch mit weiteren Unzulänglichkeiten verbunden. Da es sich bei den in der

vorliegenden Arbeit verwendeten Proben um Mitochondriensuspensionen handelt, sind nicht alle in einer Probe enthaltenen Proteine auch für den bei der Bradford-Methode eingesetzten Farbstoff zugänglich. Grundsätzlich tragen nur Proteine außerhalb der Mitochondrien zur Proteinkonzentration bei. Sind jedoch defekte Mitochondrien anwesend, deren Membranen zerstört sind, so steuern diese Proteine von Matrix und Intermembranraum zur Proteinkonzentration bei. Somit ergibt sich für eine Probe mit einem größeren Anteil solcher defekten Mitochondrien im Vergleich zu einer Probe gleicher Gesamtproteinkonzentration aber mit ausschließlich intakten Mitochondrien, ein höherer Wert für die Proteinkonzentration. Da es sich beim Bradford-Test um eine absorptionsspektroskopische Methode handelt, wirkt sich zusätzlich das große Streuvermögen der Mitochondriensuspension negativ auf die Reproduzierbarkeit aus.

Um für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten zwölf Proben zumindest den durch die Verwendung unterschiedlicher Standardgeraden entstandenen Fehler zu eliminieren, wurde von Dr. Andrea Hamann aus der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz nachträglich eine erneute Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford durchgeführt, wobei alle zwölf Proben am selben Tag und unter Verwendung derselben Standardgeraden vermessen wurden. Eine Gegenüberstellung dieser „neuen“ und der „alten“ Proteinkonzentration findet sich in Tabelle 5.1.1. Dabei wäre zu erwarten gewesen, dass sich zwar die Absolutwerte verändern, die Verhältnisse der Proteinkonzentrationen zwischen den einzelnen Proben, vor allem bei Proben derselben Altersstufe, jedoch gleich bleiben. Dies ist aber leider nicht der Fall. Betrachtet man beispielsweise die Individuen der Altersstufe 9d so fällt auf, dass beim Individuum s(-)F89830 die „neue“ Proteinkonzentration nur noch ca. 50% der „alten“ beträgt, während beim Individuum s(-)F89840 immerhin noch etwa 70% des alten Wertes erreicht werden und die Proteinkonzentration beim dritten Individuum dieser Altersstufe sogar um ca. 14% höher liegt. Dieses Bild von recht willkürlich anmutenden Zu- und Abnahmen der Proteinkonzentration zwischen „alter“ und „neuer“ Messung findet sich auch bei den anderen drei Altersstufen und verdeutlicht nochmals die Problematik der Bradford-Methode. Vor allem muss daraus jedoch der Schluss gezogen werden, dass keine der beiden Bestimmungen der Proteinkonzentration ausreichend sichere und reproduzierbare Ergebnisse liefert, um als Vergleichsgröße für quantitative Analysen herangezogen werden zu können. Ein zusätzliches Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit diskutierten Gele von *Podospora anserina* und damit auch die für die quantitative Analyse herangezogenen 2D-BN/SDS-Gele auf einem auf Basis der „alten“ Proteinkonzentration berechneten Protein/Detergens-Verhältnis beruhen, da zum Zeitpunkt der Probenbearbeitung nur diese zur Verfügung stand und die weitreichenden Konsequenzen dieser Entscheidung noch nicht

vollends abzusehen waren. Das für die Solubilisierung tatsächlich verwendete Protein/Detergens-Verhältnis entspricht somit nicht dem erwünschten und variiert zudem zwischen den einzelnen Proben. Diese Tatsache muss bei Betrachtung der erhaltenen Ergebnisse berücksichtigt werden.

Um trotzdem eine Vergleichsgröße für die quantitative Analyse der Daten zur Verfügung zu haben werden im Rahmen dieser Arbeit zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen. Zum einen ist die Normierung der Daten bezogen auf ein sogenanntes *housekeeping* Protein möglich, welches altersunabhängig in stets derselben Menge vorliegt. Um ein solches zu identifizieren, wurde eine LC-ESI-MS/MS-Analyse der Mitochondrien der drei 6 Tage alten und der drei seneszenten Individuen von *Podospora anserina* durchgeführt, wie sie in Kapitel 4.6.2.2 beschrieben ist. Die massenspektrometrische Analyse und die Datenauswertung erfolgte durch Dr. Sascha Rexroth aus dem Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum. Dabei wurden für jede Probe drei unabhängige Messungen durchgeführt, so dass für die beiden Zustände juvenil (drei 6 Tage alte Individuen) und seneszent jeweils neun LC-ESI-MS/MS-Analysen vorliegen. Im Rahmen dieser Analyse konnten 680 Proteine identifiziert werden, von denen für lediglich 60 eine altersabhängige Regulation der Proteinmenge belegt werden kann (Daten nicht gezeigt), so dass eine umfangreiche Liste potentieller *housekeeping* Proteine vorhanden ist, die keine altersabhängige Veränderung zeigen und somit als Vergleichsgröße für quantitative Analysen eingesetzt werden könnten. Um aus diesen Kandidaten eine Wahl zu treffen, ist es sinnvoll den NPAF (engl. *normalized protein abundance factor*) heranzuziehen. Dieser beruht auf dem von Powell *et al.* (2004)^[178] und McAfee *et al.* (2006)^[179] etablierten PAF (engl. *protein abundance factor*), welcher wiederum auf der Methode des *Spectral Countings* (siehe Kapitel 4.8.2.1) basiert und semi-quantitative Aussagen über die Proteinmenge ermöglicht. Dabei werden die *Spectral Counts* auf das Molekulargewicht des betrachteten Proteins normiert, so dass ein Vergleich von Proteinmengen sowohl innerhalb einer Probe als auch probenübergreifend möglich ist. Der PAF stellt somit eine schnelle und einfache Methode zur Identifizierung signifikanter Unterschiede in der Proteinmenge dar.^[179] Der NPAF wird für Proteinkomplexe verwendet die aus mehreren Untereinheiten bestehen. Dabei wird der PAF jeder Untereinheit auf die Gesamtzahl nicht redundanter Spektren normiert, die zum betrachteten Proteinkomplex gehören^[178]. Der NPAF kann außerdem – wie in diesem Fall – verwendet werden, um den Anteil eines Proteins in Prozent (mol/mol) an der Gesamtproteinmenge abzuschätzen. Diese Information ist sehr wertvoll, da ein als Vergleichsgröße für quantitative Daten verwendetes *housekeeping* Protein nicht nur altersunabhängig in unveränderter, sondern auch in ausreichender Menge vorliegen sollte, um eine genaue Detektion und Quantifizierung zu ermöglichen. Dieses Kriterium

erfüllen gleich mehrere der potentiellen Kandidaten aus *Podospora anserina*, wobei jedoch das Porin der äußeren mitochondrialen Membran besonders hervorzuheben ist. Es zeigt keine statistisch signifikante Veränderung der Proteinmenge mit dem Alter und ist bei der massenspektrometrischen Analyse auf Platz 6 der am häufigsten identifizierten Proteine (Daten nicht gezeigt). Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf den altersabhängigen Veränderungen der Proteinkomplexe und –superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung liegt, die sich in der inneren Mitochondrienmembran befinden, ist es außerdem sinnvoll, als *housekeeping* Protein ebenfalls ein Membranprotein heranzuziehen. Das Porin erfüllt auch dieses Kriterium und bietet darüber hinaus noch den Vorteil, dass es sich sogar um ein mitochondriales Protein – wenn auch der äußeren und nicht der inneren Membran – handelt. Porine kommen sowohl in der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien als auch in der äußeren Mitochondrienmembran vor und sind für Aufnahme und Austausch von Metaboliten wie beispielsweise Nucleosiden oder Zuckern im Bereich bis etwa 800 Da verantwortlich^[180]. Mitochondriale Porine werden auch als spannungsabhängige Anionenkanäle (VDAC, von engl. *voltage-dependent anion channel*) bezeichnet^[181]. Die Position des Porins im 1D-BN-Gel sowie im 2D-BN/SDS-Gel ist nicht bekannt, eine Quantifizierung ist aber recht schnell und einfach durch den Einsatz eines spezifischen Antikörpers und mittels Western-Blotting (siehe Abschnitt 4.5) möglich. Der entsprechende Blot für die zwölf in Tabelle 5.1.1 aufgeführten Proben von *Podospora anserina* ist in Abbildung 5.1.1 gezeigt. Der verwendete Primärantikörper wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz (Institut für Molekulare Biowissenschaften, Fachbereich Biowissenschaften, Goethe-Universität Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt und speziell für die Detektion des Porins der äußeren Mitochondrienmembran von *P. anserina* hergestellt. Wie Abbildung 5.1.1 erkennen lässt, ist der Antikörper sehr spezifisch, da für jede Probe nur eine Bande zu erkennen ist und so gut wie keine Hintergrundfärbung vorliegt. Die Position der Bande auf dem Blot lässt auf eine Masse von etwa 30 kDa schließen, was mit dem Literaturwert übereinstimmt, der für das Monomer mit 30,007 kDa^[182] angegeben ist. Damit bietet dieser Blot ideale Voraussetzungen zur Quantifizierung der Banden mittels der Software Quantity One, wodurch man für jede der zwölf Proben einen Wert für die optische Dichte (OD) der Porin-Bande erhält. Um daraus die Normierungsfaktoren für die quantitative Auswertung der 2D-BN/SDS-Gele zu erhalten, dient eine Probe als Referenz und ihr Faktor wird auf den Wert 1 festgelegt. Die Faktoren für alle weiteren Proben ergeben sich dann durch Division der OD der jeweiligen Probe durch die OD der Referenzprobe. Die auf diese Weise ermittelten Normierungsfaktoren finden sich im Anhang.

Eine weitere Möglichkeit eine Vergleichsgröße für die quantitative Analyse zu erhalten ist die Normierung auf die Gesamtproteinmenge einer Probe, ermittelt anhand der Gesamtfärbe-

intensität auf einem Glycin-SDS-Gel, wie sie auch von Dr. Sascha Rexroth für massenspektrometrische Daten verwendet wird. Basierend auf der "alten" Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1 wird für jedes der zwölf Individuen die „gleiche“ Proteinmenge mit SDS solubiliert und auf ein kleines Glycin-SDS-Gel (siehe Abschnitt 4.4.3) aufgetragen. Nach beendeter Elektrophorese wird das Gel mit Coomassie gefärbt (siehe Abbildung 5.1.2) und anschließend mit der Software Quantity One ausgewertet. Dafür wird, wie schon in der Diplomarbeit von Söhn (2010)^[173] beschrieben, jeweils die gesamte Spur markiert und eine markante, gut abgegrenzte Bande ausgewählt. Mit Hilfe der Software erhält man nicht nur den Wert für die optische Dichte (OD) dieser Bande sondern auch einen Wert für deren prozentualen Anteil an der Gesamt-OD der Spur, so dass die Gesamt-OD jeder einzelnen Spur und somit jeder einzelnen Probe berechnet werden kann. Indem eine der zwölf Proben auf den Wert 1 festgelegt wird können nun durch Division der Gesamt-OD jeder Probe durch die Gesamt-OD der als Referenz dienenden Probe Normierungsfaktoren berechnet werden (siehe Anhang).

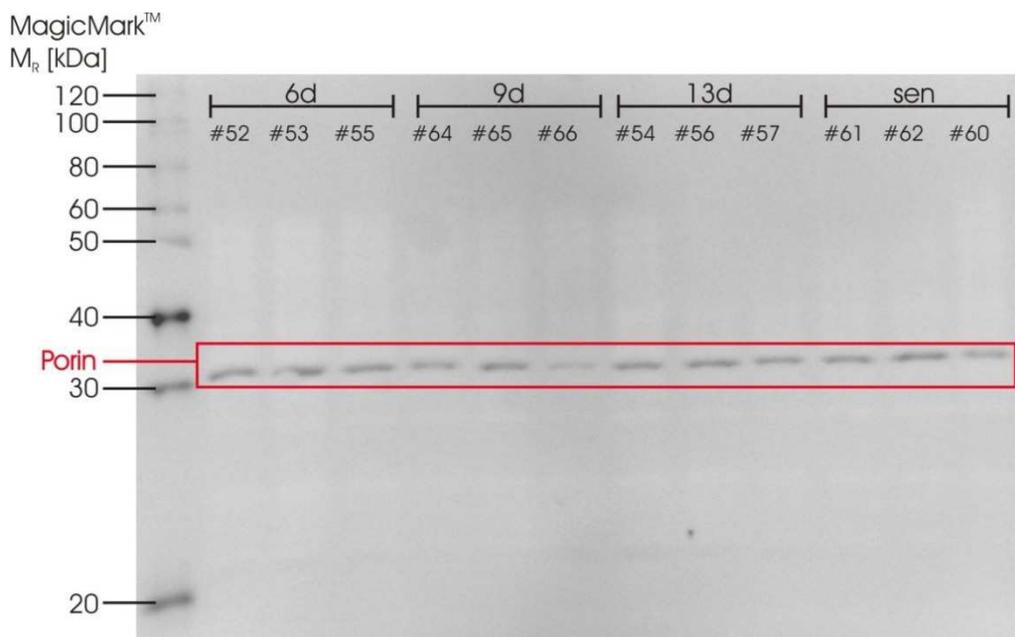


Abbildung 5.1.1 Western-Blot eines Glycin-SDS-Gels der zwölf in Tabelle 5.1.1 beschriebenen Proben von *Podospora anserina*. Der gegen das Porin der äußeren Mitochondrienmembran von *P. anserina* gerichtete Primärantikörper wird in einer 1:5000-Verdünnung eingesetzt. Das Signal des HRP-gekoppelten sekundären Antikörpers wird mittels des SuperSignal® West Dura-Kits von Thermo Scientific und dem Image Analyzer LAS-3000 von Fujifilm detektiert. Von jeder Probe wurden 5 µg Protein, basierend auf der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1 aufgetragen. Die Spuren sind mit dem Alter der Proben (6d = 6 Tage, 9d = 9 Tage, 13d = 13 Tage, sen = seneszent = 14 oder 15 Tage) und ihrer Kulturnummer gekennzeichnet. Die linke Spur enthält 4 µL MagicMark™ als Massenstandard. Die Banden des Porins der äußeren Mitochondrienmembran sind durch einen roten Kasten gekennzeichnet. Der verwendete primäre Antikörper ist sehr spezifisch, da für jede Probe nur eine Bande zu erkennen ist und so gut wie keine Hintergrundfärbung vorliegt. Die Position der Bande auf dem Blot lässt auf eine Masse von etwa 30 kDa schließen, was mit dem Literaturwert übereinstimmt, der für das Monomer des Porins mit 30,007 kDa^[182] angegeben ist. Somit kann von einer zweifelsfreien Identifizierung des Porins ausgegangen werden und der Blot kann mittels der Software Quantity One quantifiziert und zur Berechnung von Normierungsfaktoren für die quantitative Analyse von 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina* herangezogen werden.

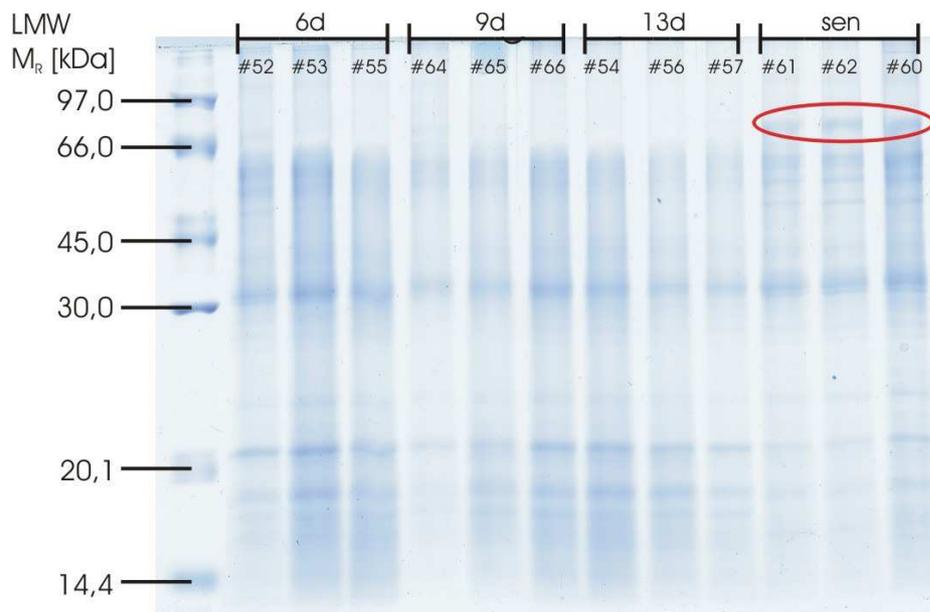


Abbildung 5.1.2 Mit der nach Rexroth et al. (2003)^[138] modifizierten Methode Coomassie-gefärbtes Glycin-SDS-Gel der zwölf in Tabelle 5.1.1 beschriebenen Proben von *Podospira anserina*. Um eine Vergleichsgröße für die quantitative Analyse von 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* zur Verfügung zu haben, wurden anhand der Auswertung mit der Software Quantity One Normierungsfaktoren für die Gesamtproteinmenge pro Spur berechnet. Von jeder Probe wurden 10 µg Protein, basierend auf der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1 aufgetragen. Die Spuren sind mit dem Alter der Proben (6d = 6 Tage, 9d = 9 Tage, 13d = 13 Tage, sen = seneszent = 14 oder 15 Tage) und ihrer Kulturnummer gekennzeichnet. Die linke Spur enthält 1 µL Low Molecular Weight (LMW) Massenstandard. Obwohl für jede Spur die „gleiche“ Menge Protein aufgetragen wurde, lassen die unterschiedlichen Färbeintensitäten der einzelnen Spuren auf unterschiedliche Gesamtproteinmengen schließen und eine Normierung auf die Gesamt-OD sinnvoll erscheinen. Auffällig ist weiterhin ein verändertes Bandenmuster der seneszenten Proben, die im oberen Massenbereich einige zusätzliche Banden zeigen (rote Markierung).

Somit stehen nun vier Vergleichsgrößen für die Analyse der aus den 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospira anserina* gewonnenen quantitativen Daten zur Verfügung: „alte“ und „neue“ Proteinkonzentration der Proben (Tabelle 5.1.1), das Porin der äußeren Mitochondrienmembran sowie die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel. Die Verwendung einer der beiden in Tabelle 5.1.1 aufgeführten Proteinkonzentrationen ist, wie bereits ausführlich dargelegt, nicht sinnvoll, da die Methode nach Bradford vor allem in Kombination mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Mitochondriensuspensionen keine ausreichend sicheren und reproduzierbaren Ergebnisse liefert. Die Entscheidung, ob eine Normierung der quantitativen Daten auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran oder die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel sinnvoller ist, ist nicht trivial. Zwar lässt sich durch Vergleich der Gesamtfärbeintensitäten aller Proben auf einem Glycin-SDS-Gel und Berechnung der entsprechenden Normierungsfaktoren die Proteinmenge auf ein zwar unbekanntes aber gleiches Maß umrechnen, jedoch gilt dies nur für die Proteinmenge vor Solubilisierung für die 2D-BN/SDS-Gele. Es ist jedoch schon seit langem bekannt, dass sich die Eigenschaften biologischer Membranen mit dem Alter verändern^[183]. Der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren nimmt ab, während der Cholesterolgehalt steigt, so dass Membranen älterer Organismen

eine geringere Fluidität aufweisen^[183]. Dieser Umstand beeinflusst natürlich auch die Solubilisierungseffizienz von Membranproteinen, die bei alten Membranen schlechter ist als bei jüngeren. Frenzel *et al.* (2010)^[172] konnten dies durch eine vergleichende Solubilisierung von Mitochondrien aus Rattencortex mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) bzw. 8:1 (w/w) belegen. Eine Normierung auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel lässt diesen Punkt völlig außer Acht, da hierbei lediglich die Proteinmenge vor Solubilisierung berücksichtigt wird. Für die quantitative Bestimmung der Porin-Menge mittels Western-Blotting wurde jedoch bereits solubiliertes Material verwendet, so dass den unterschiedlichen Membraneigenschaften der verschiedenen alten Proben Rechnung getragen wird und man Werte für die tatsächlich solubilierte anstatt für die Gesamtmenge an Porin erhält. Ein weiterer Vorteil des Porins ist, dass es das am häufigsten vorkommende Protein der äußeren Mitochondrienmembran ist^[184] und somit auch als Marker für diese Verwendung findet^[185]. Zwar befinden sich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrachteten Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran, jedoch ist die Verwendung eines Membranproteins, dessen Menge auf einem 2D-BN/SDS-Gel ebenso von der Solubilisierung abhängig ist, wie die der analysierten Proteine, als Referenz durchaus von großem Wert und der Verwendung eines nicht membranständigen Proteins in jedem Fall vorzuziehen. Trotzdem sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass äußere und innere Mitochondrienmembran stark unterschiedliche Protein/Lipid-Verhältnisse besitzen. Während Proteine in der äußeren Membran von Mitochondrien ca. 50 Gew.-% ausmachen, liegt in der inneren ein Verhältnis von über 3:1 (w/w) vor^[186]. Die Verwendung der Porin-Menge als Vergleichsgröße ist noch aus einem weiteren Grund nicht unproblematisch, denn obwohl die massenspektrometrische Analyse der *Podospora anserina* Proben keine Veränderung der Porinmenge mit dem Alter zeigt, finden sich in der Literatur dennoch einige Hinweise, dass diese doch einer (altersabhängigen) Regulation unterliegt. Beispielsweise konnten Chorna *et al.* (2010)^[187] sowohl ein erhöhtes mRNA Expressionslevel als auch eine vermehrte Proteinexpression von Porin im Herzen alten Ratten im Vergleich zu jungen, erwachsenen Tieren feststellen und in *Escherichia coli* wird die Porin-Expression durch Umweltbedingungen, wie beispielsweise pH-Wert, Hunger oder veränderte Nährstoffbedingungen beeinflusst^[188]. Auch im Gewebe des menschlichen Darmschleimhautepithels konnte eine signifikante Hochregulation der Porin-Expression im Alter festgestellt werden^[189]. Es finden sich jedoch auch Ergebnisse, die mit den bei *P. anserina* gewonnenen übereinstimmen. So konnten Hofer *et al.* (2009)^[190] keine Abhängigkeit der Porin-Menge von Alter oder Ernährungsstatus in subsarkolemmalen und interfibrillären Mitochondrien des Rattenherzens finden und auch im Herzen des Nacktmulls konnte keine signifikante Veränderung der Expression

mit dem Alter festgestellt werden^[191]. Da die zu analysierenden Daten der 2D-BN/SDS-Gele auf der vorherigen Solubilisierung der Membranproteine beruhen und die anhand der verwendeten Proben gewonnen massenspektrometrischen Daten auf ein altersunabhängiges Vorkommen bei *Podospora anserina* schließen lassen, wird die Menge an Porin der äußeren Mitochondrienmembran als Vergleichsgröße gewählt. Alle im Weiteren in diesem Kapitel dargestellten Daten beziehen sich – soweit nicht anders angegeben – auf diese Normierung. Die mittels der drei anderen Möglichkeiten analysierten quantitativen Daten der 2D-BN/SDS-Gele finden sich im Anhang. Am Beispiel der ATP-Synthase Gesamtmenge werden die Auswirkungen der vier verschiedenen Normierungsmethoden vergleichend diskutiert (siehe Abbildung 5.1.11 und 5.1.12).

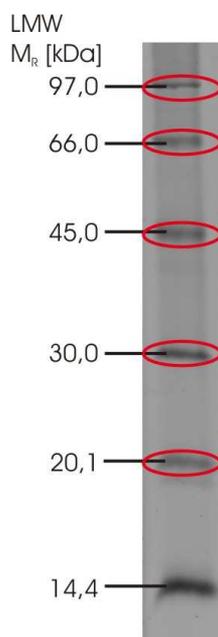


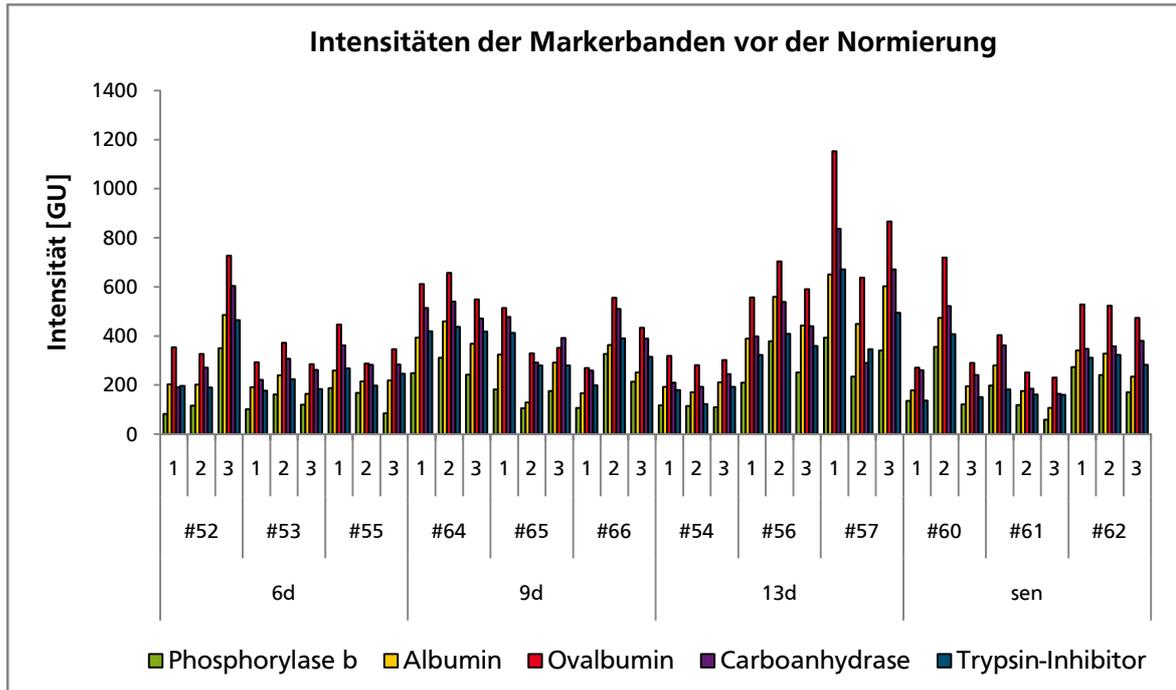
Abbildung 5.1.3 Ausschnitt aus einem SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #64). Gezeigt ist lediglich der als Massenstandard und zum Vergleich von Färbeunterschieden aufgetragene LMW-Massenstandard. Die zur Berechnung der Normierungsfaktoren verwendeten fünf Markerbanden sind rot markiert. Die Berechnung erfolgte wie in Kapitel 4.8.1.2 beschrieben. Eine Tabelle mit allen Normierungsfaktoren findet sich im Anhang.

Da bei der quantitativen Analyse der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mittels 2D-BN/SDS-Gelelektrophorese für jede Probe ein eigenes Gel angefertigt werden muss, kommt es natürlich – bedingt durch geringfügig unterschiedliche Färbedauern oder Färbung bei verschiedenen Umgebungstemperaturen – zu Unterschieden in der Färbeintensität. Um trotzdem die Intensitäten verschiedener Gele vergleichen zu können, ist es notwendig, diese Unterschiede auszugleichen. Dazu wird, wie in Kapitel 4.8.1.2 beschrieben und erstmals von Frenzel (2006)^[153] angewandt, auf jedes Gel die gleiche Menge des LMW-Massenstandards aufgetragen und ein Normierungsfaktor für jedes einzelne Gel berechnet, welcher die Abweichung der Färbeintensität eines Gels von der durchschnittlichen Färbeintensität aller betrachteten Gele widerspiegelt. Im Rahmen dieser Arbeit werden für die Normierung die fünf in Abbildung 5.1.3 markierten Markerbanden von Phosphorylase b

(97,0 kDa), Albumin (66,0 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Carboanhydrase (30,0 kDa) sowie Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) herangezogen. Die mit 14,4 kDa kleinste Markerbande des α -Lactalbumins ist durch ihre Position am unteren Rand des Gels sehr oft in ihrer Laufform beeinträchtigt und bildet keine distinkte Bande. Somit kann sie nicht mit ausreichender Genauigkeit und Reproduzierbarkeit quantifiziert werden und wird deswegen nicht für die Berechnung der Normierungsfaktoren zum Ausgleich der Färbeunterschiede verwendet.

Der Effekt der Normierung zum Ausgleich der unterschiedlichen Färbeintensitäten kann leicht anhand der Intensitäten der Markerbanden in GU (Grauwerteinheiten, von engl. *gray-units*) nachvollzogen werden. In Abbildung 5.1.4 sind die Intensitäten der zur Normierung verwendeten Markerbanden vor und nach Multiplikation mit dem jeweiligen Normierungsfaktor dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Zusammensetzung des Markers aus seinen verschiedenen Bestandteilen jeweils nahezu identisch ist. Die dennoch vorhandenen, geringfügigen Abweichungen sind höchstwahrscheinlich auf Unterschiede bei der Detektion der Banden zurückzuführen. Vergleicht man die Intensitäten aller Markerbanden auf allen Gelen vor und nach durchgeführter Normierung, so zeigt sich, dass die Schwankungsbreite der einzelnen Markerbanden nach der Normierung deutlich abgenommen hat. Dies lässt sich zusätzlich an der Darstellung des Mittelwerts jeder Bande vor und nach Normierung mit Angabe der entsprechenden Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens veranschaulichen (Abbildung 5.1.5). Zwar bleibt der Mittelwert jeder Bande natürlich derselbe, doch ist die Standardabweichung nach der Normierung signifikant verringert, da die Schwankungsbreite der Einzelwerte ebenfalls abgenommen hat. Diese Visualisierung des Effekts der Normierung zeigt, dass die Verwendung mehrerer Banden des LMW-Massenstandards zur Berechnung von Normierungsfaktoren für den Ausgleich von Unterschieden in der Färbeintensität sinnvoll und praktikabel ist. Sämtliche in diesem Kapitel präsentierten quantitativen Ergebnisse basierend auf 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina* beruhen auf der vorherigen Normierung mittels des LMW-Massenstandards. Die verwendeten Normierungsfaktoren finden sich im Anhang.

A



B

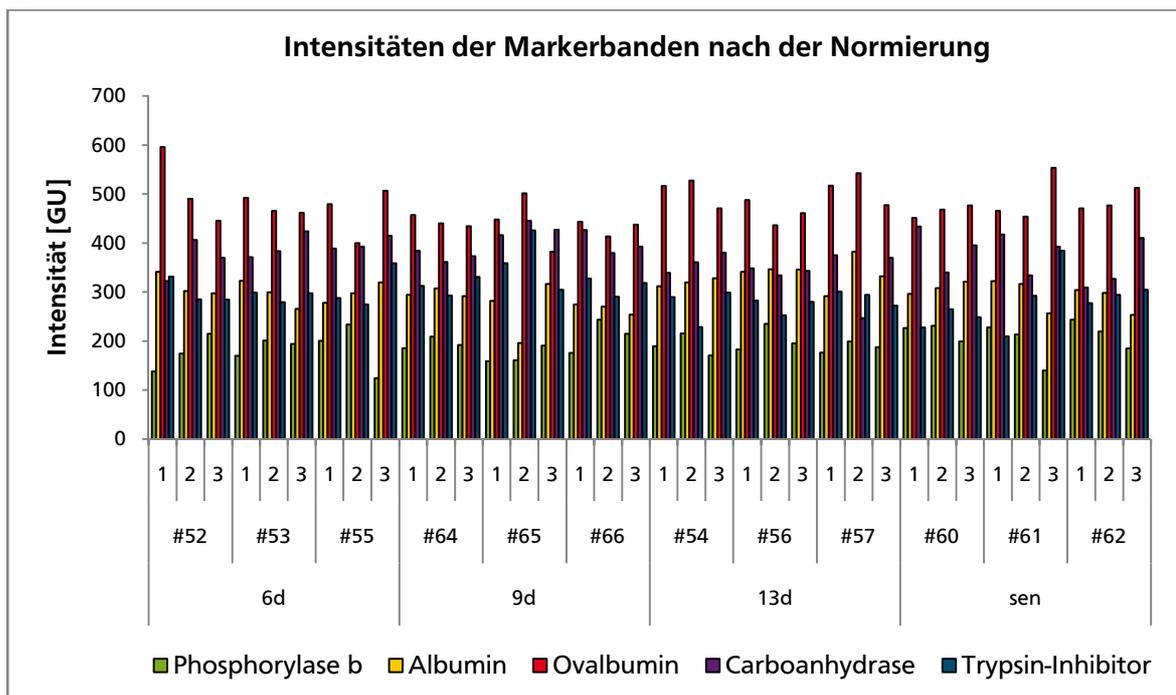


Abbildung 5.1.4 Intensitäten der für die Normierung herangezogenen Markerbanden des LMW-Massenstandards in GU vor (A) und nach (B) Multiplikation mit dem jeweiligen Normierungsfaktor. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums sowie die Nummer des Gelreplikats an. Die Zusammensetzung des Markers auf den verschiedenen Gelen ist jeweils nahezu identisch. Kleinere Schwankungen kommen höchstwahrscheinlich durch Unterschiede bei der Detektion der Banden zustande. Beim Vergleich der Intensitäten aller Markerbanden auf allen Gelen vor und nach der Normierung lässt sich eine deutliche Abnahme der Schwankungsbreite bei den normierten Daten erkennen.

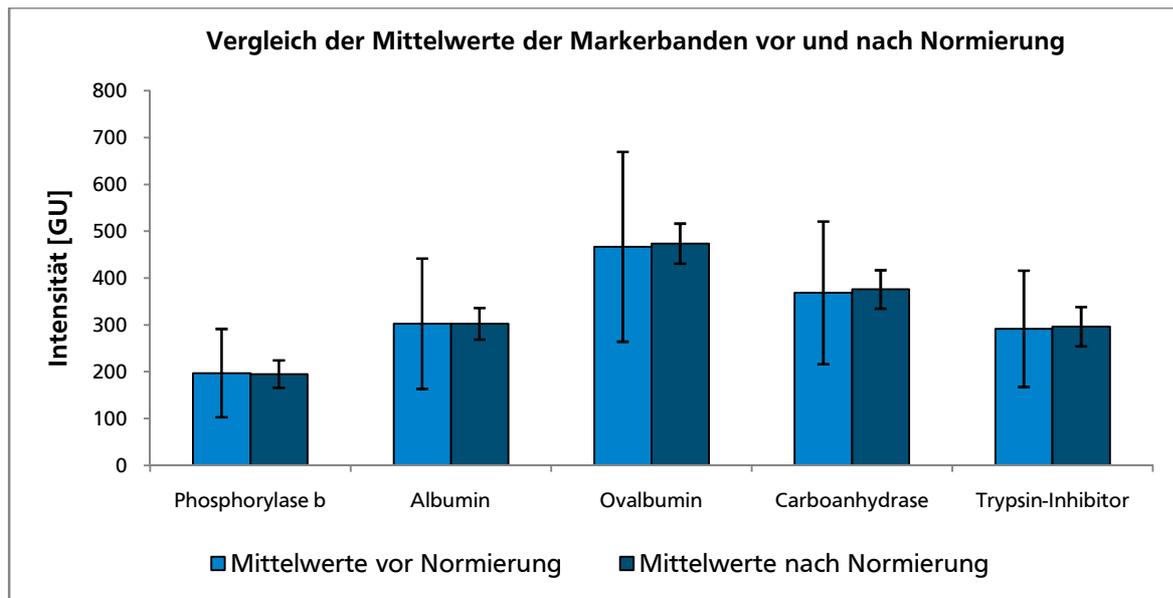


Abbildung 5.1.5 Mittelwerte der für die Normierung herangezogenen Markerbanden des LMW-Massenstandards in GU vor und nach der Normierung mit Angabe der jeweiligen Standardabweichung in Form eines Fehlerbalkens. Auf der x-Achse sind die fünf verwendeten Markerbanden dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich der Mittelwert jeder Bande durch die Normierung zwar nicht verändert, die Standardabweichung aber signifikant verringert wird. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch die Normierung auch die Schwankungsbreite der Einzelwerte reduziert wird.

5.1.1.1 ATP-Synthase (Komplex V)

Die F_0F_1 -ATP-Synthase (Komplex V der oxidativen Phosphorylierung) spielt in allen lebenden Organismen eine zentrale Rolle bei der ATP-Synthese. Sie kommt sowohl in der Plasmamembran von Bakterien und der Thylakoidmembran von Chloroplasten als auch in der inneren Mitochondrienmembran vor^[192]. Bereits 1998 konnten Arnold *et al.*^[192] mittels BN-PAGE und milden Solubilisierungsbedingungen zeigen, dass in Hefe neben der monomeren Form auch Homodimere der ATP-Synthase existieren. Dies wurde seitdem für viele weitere Organismen^[4, 5, 193-197] – darunter auch *Podospora anserina*^[198] – belegt. 2002 zeigten Giraud *et al.*^[199] – ebenfalls in Hefe und mittels BN-PAGE – dass die ATP-Synthase nicht nur als Dimer sondern auch in größeren Stöchiometrien als Oligomer existieren kann. Somit wird im Rahmen dieser Arbeit nicht nur die Gesamtmenge an mitochondrialer F_0F_1 -ATP-Synthase aus *Podospora anserina* betrachtet, sondern auch deren Verteilung auf ihre oligomeren Formen. Oft kann neben Monomer, Dimer und etwaigen Oligomeren der ATP-Synthase zusätzlich freier F_1 -Teil auf dem 2D-BN/SDS-Gel detektiert werden^[132, 153, 173, 174]. Frenzel *et al.*^[172] zeigten 2010, dass dieser unabhängig von den Solubilisierungsbedingungen auftritt, so dass sein Vorkommen vermutlich auf bereits in der Zelle dissoziierter oder nicht assemblierter ATP-Synthase beruht. Wittig *et al.* (2006)^[200] konnten außerdem einen Zusammenhang zwischen freier F_1 -Kopfgruppe und dem Auftreten mitochondrialer Funktionsstörungen feststellen.

Für die Quantifizierung der ATP-Synthase aus den 2D-BN/SDS-Gelen werden die α - sowie die β -Untereinheit herangezogen. Beide gehören zum Matrix-ständigen F_1 -Teil der ATP-Synthase und sind in der Kern-DNA codiert^[192]. Weitere Untereinheiten werden nicht herangezogen, da sie nicht mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF, Abschnitt 4.6.1) identifiziert werden konnten und auch ein Vergleich mit Daten von *Neurospora crassa*^[6] keine eindeutige Zuordnung ermöglichte. Abbildung 5.1.6 zeigt auf einem Ausschnitt aus einem 2D-BN/SDS-Gel jeweils α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (V_1), Dimers (V_2) und des freien F_1 -Teils (F_1). Höhere Oligomere der ATP-Synthase konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bei *Podospora anserina* nicht gefunden werden. α - und β -Untereinheit der freien F_1 -Kopfgruppe zeigen nur sehr geringe Intensitäten. Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten sind – soweit nicht anders angegeben – auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normiert.

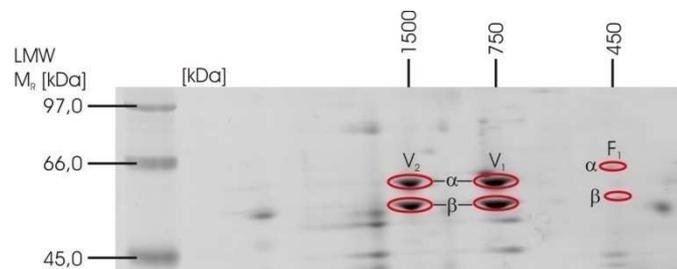


Abbildung 5.1.6 Ausschnitt aus einem SYPRO[®] Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52). α - und β -Untereinheit von Monomer (V_1) und Dimer (V_2) sowie freiem F_1 -Teil (F_1) der ATP-Synthase sind rot markiert. Die mit Hilfe der Software Delta2D erhaltenen Intensitäten dieser beiden Untereinheiten werden für die nachfolgende quantitative Analyse der ATP-Synthase in *P. anserina* verwendet. Neben dem Dimer lassen sich keine weiteren Oligomere der ATP-Synthase erkennen. α - und β -Untereinheit der freien F_1 -Kopfgruppe zeigen nur sehr geringe Intensitäten.

Monomer und Dimer der ATP-Synthase

Abbildung 5.1.7 zeigt die Menge der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers und Dimers für alle zwölf Proben von *Podospora anserina* (siehe Tabelle 5.1.1). Das Verhältnis von α - und β -Untereinheit ist bei allen Proben nahezu 1, was mit dem Aufbau der ATP-Synthase vereinbar ist, deren F_1 -Teil hauptsächlich aus einem $\alpha\beta$ -Hexamer, $(\alpha\beta)_3$ mit alternierender Anordnung der beiden Untereinheiten besteht, das auch den katalytisch aktiven Teil des Enzyms darstellt^[201]. Vergleicht man die Intensitäten von Monomer und Dimer, lässt sich erkennen, dass stets mehr Monomer vorliegt, das Verhältnis von Monomer zu Dimer jedoch nahezu gleichbleibend ist. Die in Form von Fehlerbalken visualisierten Standardabweichungen repräsentieren die Unterschiede der drei pro Probe angefertigten Gele. Interessanterweise sind die Fehler bei höheren Intensitäten größer als bei kleineren. Für dasselbe Individuum ist die Standardabweichung bei Monomer und Dimer etwa gleich groß. Dies lässt darauf schließen, dass die tatsächlichen Unterschiede zwischen den Gelreplikaten dargestellt sind und keine zusätzlichen Fehler bei der quantitativen Analyse der Spots mit Delta2D entstehen.

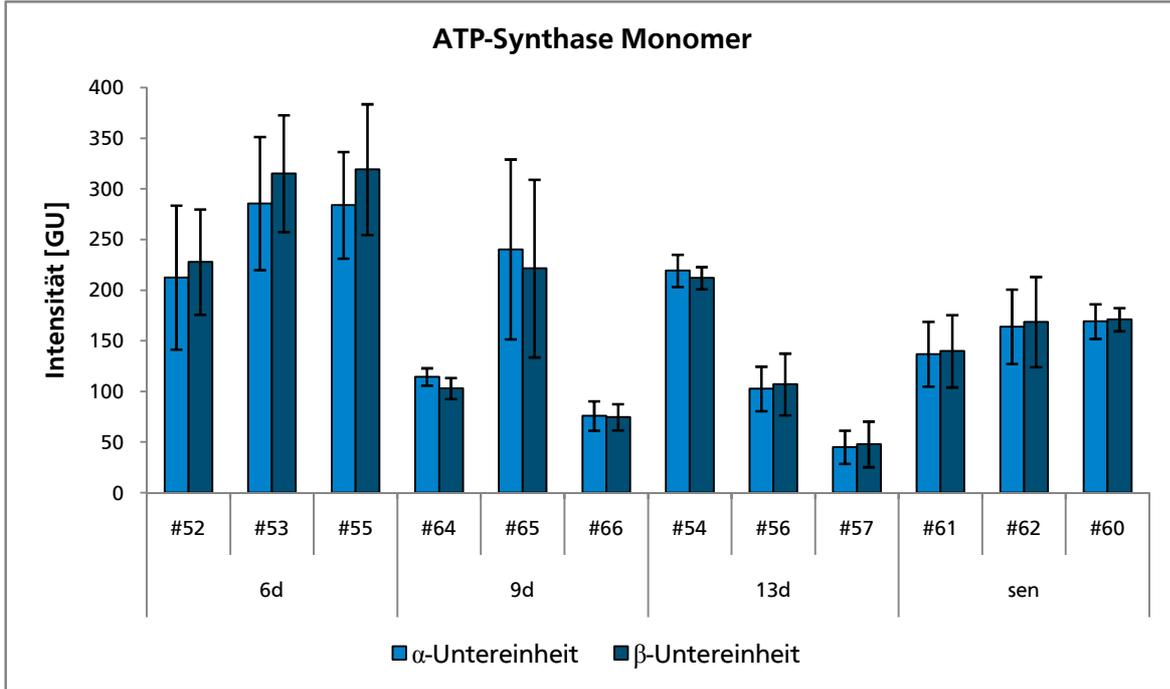
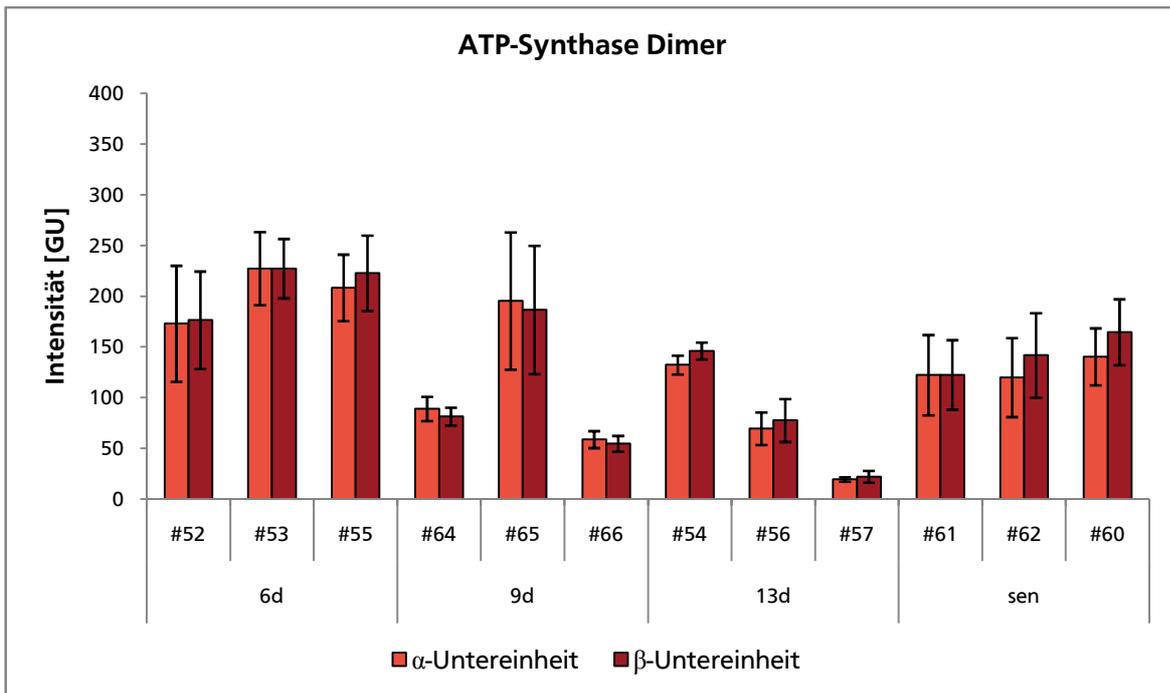
A**B**

Abbildung 5.1.7 Altersabhängigkeit der Intensitäten der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (**A**) und Dimers (**B**). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Das Verhältnis von α - und β -Untereinheit ist bei allen Proben nahezu 1, was den Aufbau des F_1 -Teils der ATP-Synthase aus einem $\alpha\beta$ -Hexamer mit alternierender Anordnung der beiden Untereinheiten widerspiegelt. Ein Vergleich der Intensitäten von Monomer und Dimer zeigt, dass der größere Teil der ATP-Synthase in monomerer Form vorliegt; das Verhältnis von Monomer zu Dimer bleibt dabei nahezu identisch. Die Standardabweichung zwischen den drei pro Probe angefertigten Gelreplikaten ist in Form von Fehlerbalken visualisiert. Interessanterweise zeigen Proben mit höheren Intensitäten auch eine größere Standardabweichung. Die Quantifizierung mittels der Software Delta2D scheint gut reproduzierbare Ergebnisse zu liefern, da die Standardabweichungen derselben Probe bei Monomer und Dimer etwa gleich groß sind.

Um die Verteilung der ATP-Synthase auf Monomer und Dimer zu analysieren, ist es sinnvoll, die drei Individuen jeder Altersstufe zusammenzufassen sowie das Monomer-Dimer-Verhältnis der verschieden alten Kulturen von *P. anserina* graphisch darzustellen. Dies ist in Abbildung 5.1.8 geschehen, wobei für 5.1.8 A auch α - und β -Untereinheit zusammengefasst wurden, da sie unabhängig vom Vorliegen der ATP-Synthase als Monomer oder Dimer im Verhältnis 1:1 vorliegen (siehe Abbildung 5.1.7). Die Standardabweichung repräsentiert nun die Unterschiede zwischen den drei Individuen pro Altersstufe. Konnte man anhand von Abbildung 5.1.7 noch annehmen, dass sich das Verhältnis von Monomer und Dimer der ATP-Synthase nicht verändert, so lässt sich nun eine signifikante Erhöhung desselben bei der Altersstufe 13d erkennen (6d:13d $p = 0,0113$; 9d:13d $p = 0,0031$; 13d:sen $p = 0,0017$). Während das Monomer-Dimer-Verhältnis bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten *Podospora*-Kulturen im Mittel 1,26 beträgt, liegt es bei den 13 Tage alten Proben um 38% höher bei 1,74. Lässt man zunächst einmal die seneszenten Proben außer Acht und berücksichtigt, dass die 13 Tage alten Kulturen von *P. anserina* bereits zwischen 87% und 93% ihrer Lebenserwartung erreicht haben, kann man einen signifikanten Anstieg des Monomer-Dimer-Verhältnisses zum Ende der Lebensspanne hin feststellen. Dies könnte die These von Arnold *et al.* (1998)^[192] bestätigen, die eine identische Aktivität von Monomer und Dimer in Hefe feststellen konnten, wobei das Dimer jedoch die stabilere Form des Enzyms darzustellen scheint. Im Fall der für *P. anserina* erhaltenen Daten wäre also eine Destabilisierung der ATP-Synthase mit dem Alter zu erkennen, da hier vermehrt die monomere Form vorliegt. Dies könnte weitreichende Folgen für den Energiehaushalt der Zelle nach sich ziehen, da das instabilere Monomer vermutlich stärker zu Dissoziation und/oder Entfaltung neigt als das stabilere Homodimer. Somit wird weniger Energie produziert und es muss mehr Aufwand in Reparatur, Neufaltung und Neusynthese der ATP-Synthase investiert werden. Andererseits zeigten Tomasetig *et al.* (2002)^[202] an Rinderherzmitochondrien, dass das ATP-Synthase-Dimer zwar stabil, im Gegensatz zum Monomer aber inaktiv ist. Für die bei *P. anserina* beobachtete altersabhängige Veränderung des Verhältnisses von Monomer und Dimer würde dies eine Zunahme an aktivem Monomer im Alter aufgrund von erhöhtem Energiebedarf bedeuten. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Widerspruch zu Krause *et al.* (2005)^[5] und sind nur schwer mit der Erkenntnis vereinbar, dass ATP-Synthase-Dimere maßgeblich an der Ausbildung der mitochondrialen Cristae beteiligt sind^[203] und Gewebe mit erhöhtem Energiebedarf – beispielsweise das Herz – wesentlich stärker gefaltete innere Mitochondrienmembranen besitzen als solche mit geringerem Energieverbrauch^[204]. Diese stärkere Faltung führt einerseits zu einer größeren Membranoberfläche, die mehr Platz für die Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bietet, logischerweise aber auch zu einem erhöhten Vorkommen

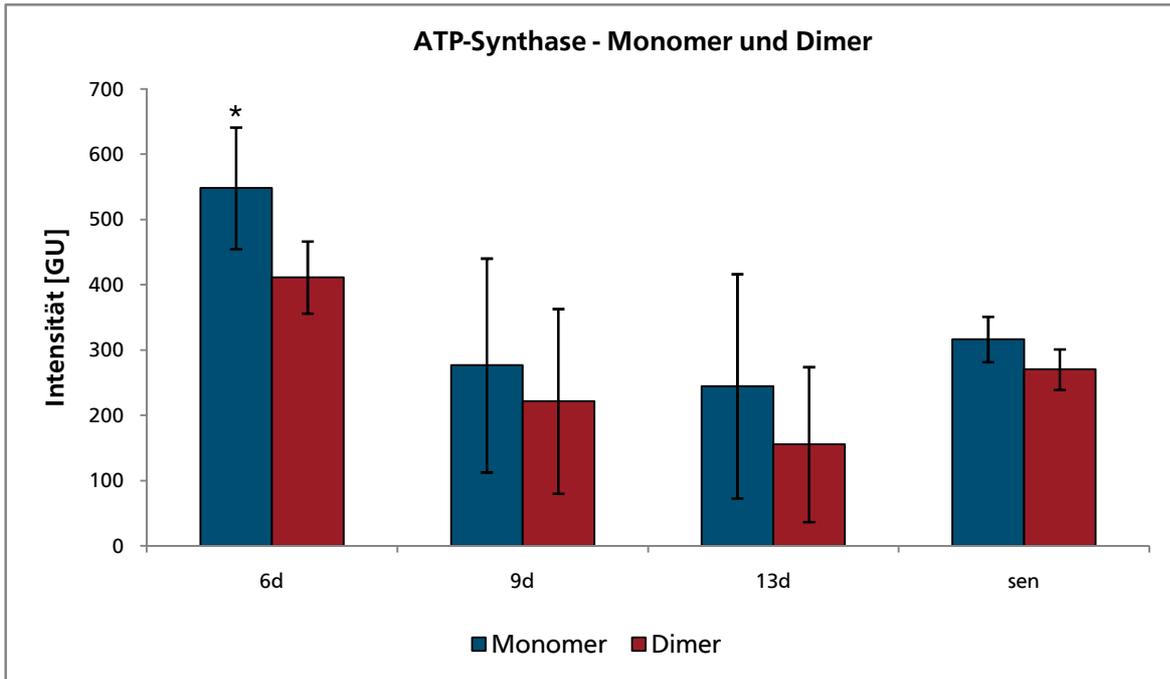
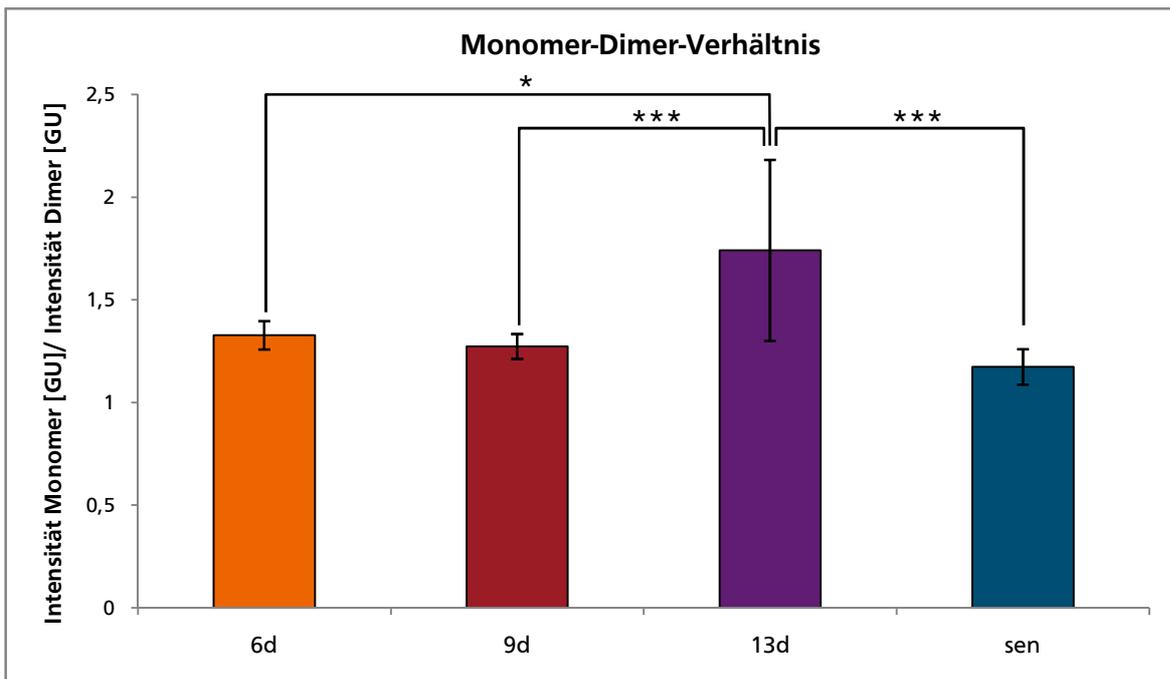
A**B**

Abbildung 5.1.8 Altersabhängiger Vergleich von Monomer und Dimer der ATP-Synthase (A) und altersabhängige Veränderung des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Die in Abbildung 5.1.7 dargestellten Werte für die drei Individuen pro Altersstufe wurden gemittelt, die Intensitäten für α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase wurden addiert. Lediglich bei den 6 Tage alten Proben ist der Intensitätsunterschied zwischen Monomer und Dimer statistisch signifikant (*, $p = 0,0118$). (B) Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase bei den vier Altersstufen. Gezeigt ist ebenfalls der Mittelwert für die drei Individuen pro Altersstufe, die Werte basieren auf der Summe von α - und β -Untereinheit. Sowohl von 6d nach 13d ($p = 0,0113$) als auch von 9d nach 13d ($p = 0,0031$) zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Monomer-Dimer-Verhältnisses, anschließend erfolgt eine – ebenfalls statistisch signifikante – Abnahme ($p = 0,0017$). Im Mittel ist das Monomer-Dimer-Verhältnis bei den 13 Tage alten Kulturen um 38% höher als bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Proben. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

von ATP-Synthase-Dimeren. Eine solch große Anzahl inaktiven Enzyms bei Zellen mit hohem Energiebedarf ist eher unwahrscheinlich, so dass die Inaktivität des ATP-Synthase-Dimers ebenso unwahrscheinlich erscheint. Jedoch fanden Buzhynskyy *et al.* (2007)^[205] in Hefemitochondrien Dimere mit zwei unterschiedlich großen Abständen zueinander und schlussfolgerten, dass jene mit dem geringeren Abstand – die über α - und β -Untereinheit miteinander verbunden sind – eine inaktive Form darstellen, während die Dimere mit dem größeren Abstand die aktive Form repräsentieren. Die Beteiligung von ATP-Synthase Dimeren an der Ausbildung der Cristae scheint außerdem insofern schlüssig, dass Brust *et al.* (2010)^[206] starke Unterschiede in der Morphologie der inneren Mitochondrienmembran juveniler, 6 Tage alter und seneszenten, 20 Tage alter Kulturen von *P. anserina* feststellen konnten. Während der Großteil der Mitochondrien aus juvenilen Kulturen lamellenartige Cristae aufweist und nur 25% retikuläre Cristae zeigen, ist bei seneszenten Kulturen ein umgekehrtes Bild zu beobachten; bei diesen weisen 86% der Mitochondrien retikuläre Cristae auf und nur 14% zeigen die reguläre, lamellenartige Morphologie. Brust *et al.* (2010)^[206] schlussfolgerten, dass es sich bei dieser altersabhängigen morphologischen Veränderung der inneren Mitochondrienmembran um einen Seneszenz-Marker für *Podospora anserina* handelt. Diese Ergebnisse können sehr gut mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit festgestellten altersabhängigen Zunahme des Monomer-Dimer-Verhältnisses sowie der generellen Abnahme der ATP-Synthase Menge (vgl. Abbildung 5.1.8) in Einklang gebracht werden. Das verringerte Vorkommen von ATP-Synthase Dimeren bei alten *P. anserina* Kulturen scheint einen erheblichen Einfluss auf die Morphologie der inneren Mitochondrienmembran zu haben. Da Brust *et al.* (2010)^[206] bei einer die mitochondriale Prolyl-*cis,trans*-Isomerase Cyclophilin D überexprimierenden Mutante von *P. anserina* (*PaCypD_OEx*), die eine verkürzte Lebensspanne besitzt, ein fast vollständiges Vorliegen veränderter, retikulärer Cristae feststellen konnten, wäre eine Analyse des Monomer-Dimer-Verhältnisses sowie der ATP-Synthase Gesamtmenge für diese Mutante wichtig. Sollte *PaCypD_OEx* ein gegenüber des Wildtyps erheblich höheres Monomer-Dimer-Verhältnis und/oder eine signifikant geringere ATP-Synthase Gesamtmenge aufweisen, wäre dies ein deutlicher Hinweis für die Beteiligung der ATP-Synthase Dimere an der Ausbildung der Morphologie der inneren Mitochondrienmembran.

Die Interpretation der Zunahme des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase gegen Ende der Lebensspanne von *P. anserina* ist nicht trivial. Die genaue Rolle der Dimere ist noch nicht geklärt, außerdem können diese in unterschiedlichen Formen auftreten^[205], die mit der im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten Methodik nicht unterscheidbar sind. Weiterhin lassen sich in anderen Organismen auch noch höhere Oligomere der ATP-Synthase finden^[5, 199], die hier nicht vorhanden sind. Unter der Annahme, dass es sich bei der dimeren

Form der ATP-Synthase nicht oder – unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Buzhynskyy *et al.* (2007)^[205] – zumindest nicht ausschließlich um eine inaktive Form handelt, könnte ein Anstieg des Monomer-Dimer-Verhältnisses im Alter ein Defizit bei der Energieversorgung der Zelle nach sich ziehen. Durch eine geringere Anzahl an Dimeren kommt es zu weniger Cristae, einer kleineren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran und somit ebenfalls zu weniger Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung und einer Abnahme der Gesamtmenge an ATP-Synthase. Sollte sich letzteres im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Quantifizierung der Komplexe und Superkomplexe der Atmungskette bestätigen lassen, wäre dies ein weiterer Beleg für die soeben aufgestellte Theorie.

Bei der bisherigen Diskussion der in Abbildung 5.1.8 A dargestellten altersabhängigen Veränderung des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase aus *P. anserina* wurde das für die seneszenten Proben erhaltene Ergebnis zunächst außer Acht gelassen. Nachdem das Verhältnis von Monomer zu Dimer zunächst von im Mittel 1,30 bei den 6 und 9 Tage alten Proben auf 1,74 bei den 13 Tage alten ansteigt, sinkt es danach statistisch signifikant (13d:sen $p = 0,0017$) auf einen Wert von 1,17 ab. Eine auf den Erkenntnissen über die Rolle von Monomer und Dimer der ATP-Synthase bei der Energieversorgung der Zelle und der Morphologie der inneren Mitochondrienmembran beruhende Erklärung für diese Beobachtung ist leider nicht möglich. Allerdings muss bei der Diskussion dieser Daten berücksichtigt werden, dass die Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sich von der der anderen drei Altersstufen maßgeblich unterscheidet (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1), so dass eine direkte Vergleichbarkeit zwischen den Mitochondrien seneszenter und jüngerer Kulturen nicht gegeben ist. Dies könnte eine mögliche Erklärung für den erneuten Rückgang des Monomer-Dimer-Verhältnisses von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen sein.

Gesamtmenge der ATP-Synthase

Neben der Verteilung auf die monomere und dimere Form ist vor allem die Gesamtmenge an ATP-Synthase von Interesse. Dazu werden die aus der Summe der Intensitäten von α - und β -Untereinheit gewonnenen Intensitäten des Monomers und Dimers addiert. Abbildung 5.1.9 zeigt die Intensitäten der Gesamtmenge an ATP-Synthase für alle zwölf Proben (siehe Tabelle 5.1.1) sowie die entsprechenden Mittelwerte der drei Individuen pro Altersgruppe. Betrachtet man alle Proben getrennt (Abbildung 5.1.9 A) sind bei den Altersstufen 9d und 13d teilweise sehr große Unterschiede der ATP-Synthase Gesamtmenge zu erkennen, während bei den 6 Tage alten und besonders bei den seneszenten Proben eine wesentlich geringere Variation der drei Individuen pro Altersstufe vorhanden ist. Dies schlägt sich auch entsprechend in den Standardabweichungen der Mittelwerte pro Altersgruppe (Abbildung 5.1.9 B) nieder. Anhand der in Abbildung 5.1.8 dargestellten Daten wurde die These aufgestellt, dass im Alter mit einer Abnahme der ATP-Synthase Gesamtmenge zu rechnen ist, da es zu einer Erhöhung des Monomer-Dimer-Verhältnisses kommt. Die entsprechenden Daten (Abbildung 5.1.9 B) untermauern dies, denn die 6 Tage alten Individuen besitzen im Mittel 94% mehr ATP-Synthase als die 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben. Dieser dramatische Rückgang auf – im Mittel – nur noch 52% der Menge der 6 Tage alten Individuen ist dabei stets statistisch signifikant (6d:9d $p = 0,0054$; 6d:13d $p = 0,0009$; 6d:sen $p = 0,0031$), während zwischen 9 und 13 Tage alten, 13 Tage alten und seneszenten sowie 9 Tage alten und seneszenten Proben kein signifikanter Unterschied besteht. Die Abnahme der Gesamtmenge an ATP-Synthase zusammen mit der Zunahme des Monomer-Dimer-Verhältnisses (vgl. Abbildung 5.1.8) spricht für ein Defizit im Energiehaushalt alternder Organismen hervorgerufen durch verringerte Faltung der inneren Mitochondrienmembran aufgrund von zu wenig dimerer ATP-Synthase^[203]. Die größere ATP-Synthase Gesamtmenge bei den juvenilen, 6 Tage alten *Podospora*-Kulturen, die erst zwischen 40% bis 43% ihrer Lebenserwartung erreicht haben, könnte außerdem auf einen erhöhten Energiebedarf in der frühen Lebensphase hinweisen, während der der Organismus noch eine stärkere Entwicklung durchläuft. Eine größere ATP-Synthase Gesamtmenge bei jungen Individuen konnte auch schon für Rattenmitochondrien aus Cortex^[172], Gesamthirn^[173] und Leber^[174] festgestellt werden. Im Muskelgewebe des kurzlebigen Türkisen Prachtgrundkärpflings *Nothobranchius furzeri* nimmt die ATP-Synthase Gesamtmenge ebenfalls zunächst ab, steigt aber zum Ende des Lebens hin wieder sehr stark an^[133].

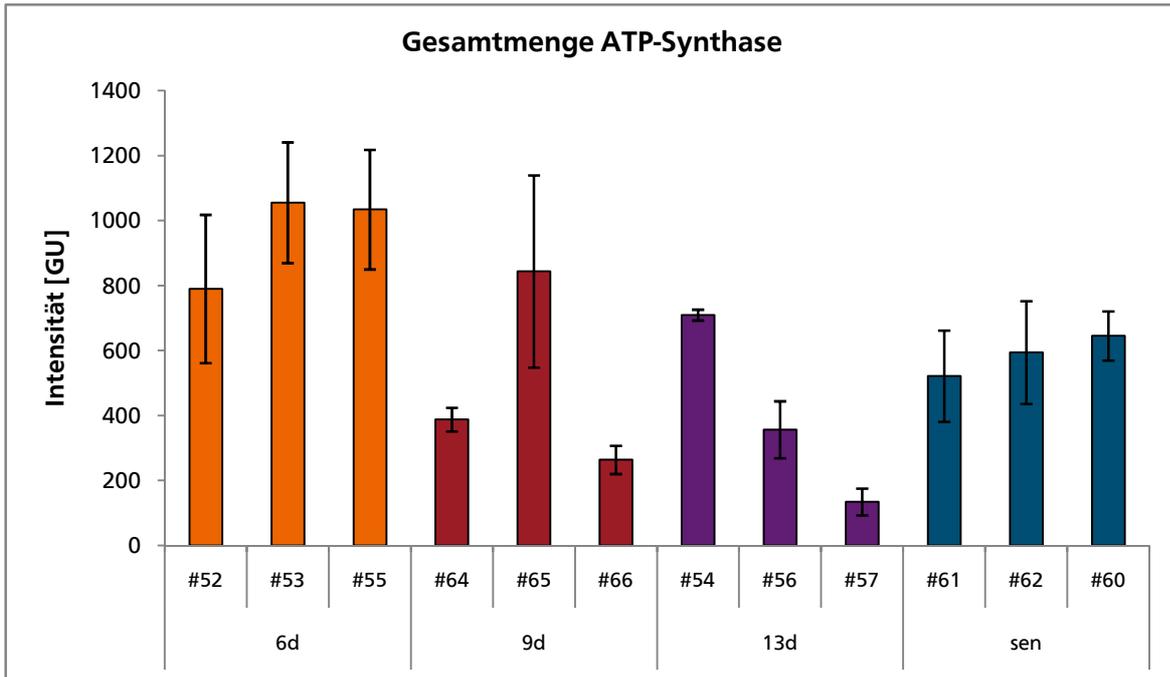
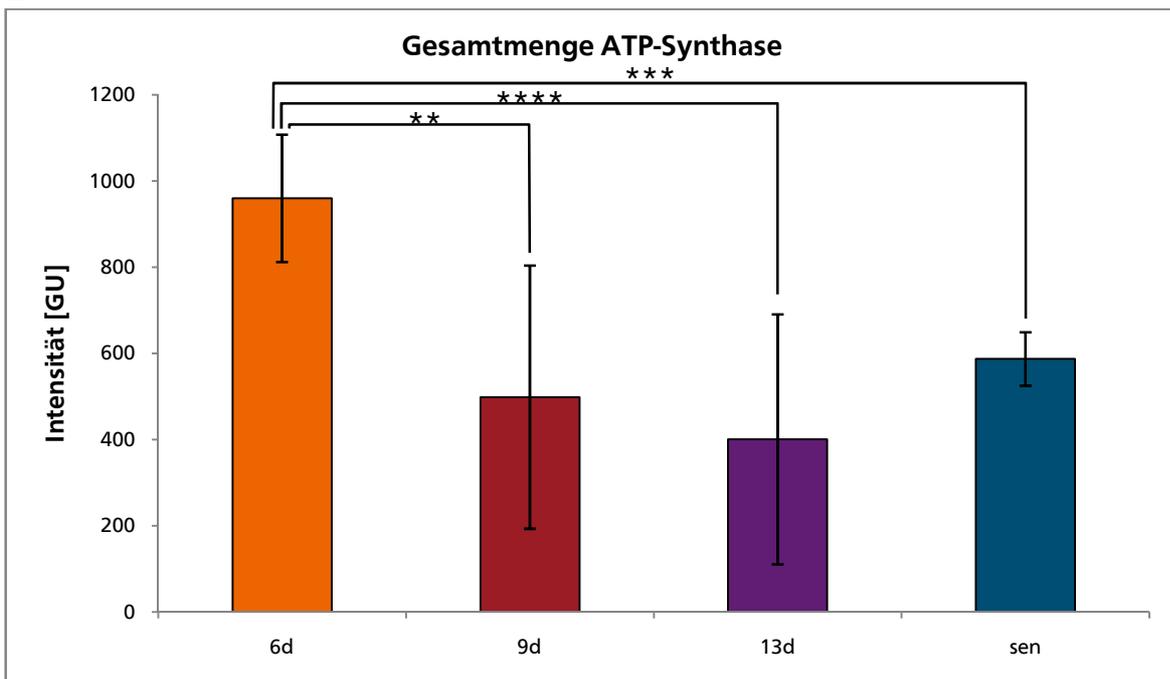
A**B**

Abbildung 5.1.9 Altersabhängigkeit der ATP-Synthase Gesamtmenge. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten von Monomer und Dimer in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt das Alter und (bei **A**) die Kulturnummer des *Podospira anserina* Individuums an. (**A**) Gesamtmenge der ATP-Synthase für alle zwölf Proben (siehe Tabelle 5.1.1). Bei den Altersstufen 9d und 13d sind teilweise sehr große Unterschiede der ATP-Synthase Gesamtmenge zu erkennen, während bei den 6 Tage alten und besonders bei den seneszenten Proben eine wesentlich geringere Variation der drei Individuen pro Altersstufe vorhanden ist. (**B**) Mittelwerte der ATP-Synthase Gesamtmenge pro Altersstufe. Ausgehend von den 6 Tage alten Individuen findet eine statistisch signifikante Abnahme (6d:9d $p = 0,0054$; 6d:13d $p = 0,0009$; 6d:sen $p = 0,0031$) um im Mittel 48% statt, so dass bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 52% der bei den 6 Tage alten Individuen vorliegenden Menge an ATP-Synthase vorhanden sind. Zwischen den 9 und 13 Tage alten, 13 Tage alten und seneszenten sowie 9 Tage alten und seneszenten Proben besteht kein statistisch signifikanter Unterschied. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Freie F₁-Kopfgruppe

Wie bereits zu Anfang erwähnt, kann zusätzlich zur monomeren und dimeren Form und etwaigen Oligomeren der ATP-Synthase oft auch freier F₁-Teil auf dem 2D-BN/SDS-Gel detektiert werden^[132, 153, 173, 174]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit für *Podospora anserina* erhaltenen Daten sind in Abbildung 5.1.10 dargestellt. Die Menge an freier F₁-Kopfgruppe nimmt mit dem Alter ab. Bei den 9 Tage alten Individuen kann im Mittel nur noch 60% so viel F₁-Teil detektiert werden wie bei den 6 Tage alten Proben ($p = 0,0243$); bei den 13 Tage alten Kulturen sind es nur noch 28% ($p = 0,0007$) und bei den seneszenten Individuen 35% ($p = 0,0005$). Während die 53%-ige Abnahme von den 9 Tage zu den 13 Tage alten Proben ebenfalls statistisch signifikant ist ($p = 0,0469$), gilt dies für den leichten Anstieg von den 13 Tage alten zu den seneszenten Proben nicht. Da Frenzel *et al.* (2010)^[172] zeigen konnten, dass die Menge an freier F₁-Kopfgruppe vom Digitonin/Protein-Verhältnis unabhängig ist, ist deren Vorkommen vermutlich auf bereits in der Zelle dissoziierte oder nicht assemblierte ATP-Synthase zurückzuführen. Eine Abnahme der Menge an freiem F₁-Teil mit dem Alter könnte einerseits auf eine erhöhte Stabilisierung im Alter hinweisen, sehr viel wahrscheinlicher ist jedoch ein einfacher Zusammenhang mit der Gesamtmenge an ATP-Synthase, so dass unabhängig vom Alter in etwa die gleiche Menge an freiem F₁-Teil vorliegt. Tatsächlich beträgt der Anteil des F₁-Teils an der ATP-Synthase Gesamtmenge nur zwischen 2,3% (sen) und 4,6% (9d) während in Rattenmitochondrien aus verschiedenen Gehirnbereichen bei den alten Tieren 4% bis 9% freie F₁-Kopfgruppe detektiert werden konnten^[207]. Aufgrund dieser sehr geringen Menge wird auf eine Darstellung der ATP-Synthase Gesamtmenge inklusive der F₁-Kopfgruppe verzichtet. Die geringen Intensitäten für den F₁-Teil führen außerdem zu teilweise sehr großen Standardabweichungen. Im Fall der 13 Tage alten Kulturen ist diese zusätzlich durch die Tatsache zu erklären, dass auf einem Gel des Individuums mit der Kulturnummer #57 gar keine freie F₁-Kopfgruppe detektiert werden konnte. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen konnte in Rattenmitochondrien aus Gesamthirn^[132, 173], Cortex^[172] und Leber^[174] ein deutlicher Anstieg der Menge an freiem F₁-Teil mit dem Alter beobachtet werden. Im Fall von Rattenmitochondrien aus dem Cortex zeigen 30 Monate alte Tiere im Vergleich mit 5 Monate alten eine um den Faktor 2,8 größere Menge an freier F₁-Kopfgruppe, was mit einer altersbedingten Instabilität der ATP-Synthase oder einer geringeren Menge an assembliertem Enzym zusammenhängen könnte^[172]. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten für den freien F₁-Teil der ATP-Synthase (Abbildung 5.1.10) weisen hingegen auf keinen derartigen Zusammenhang hin.

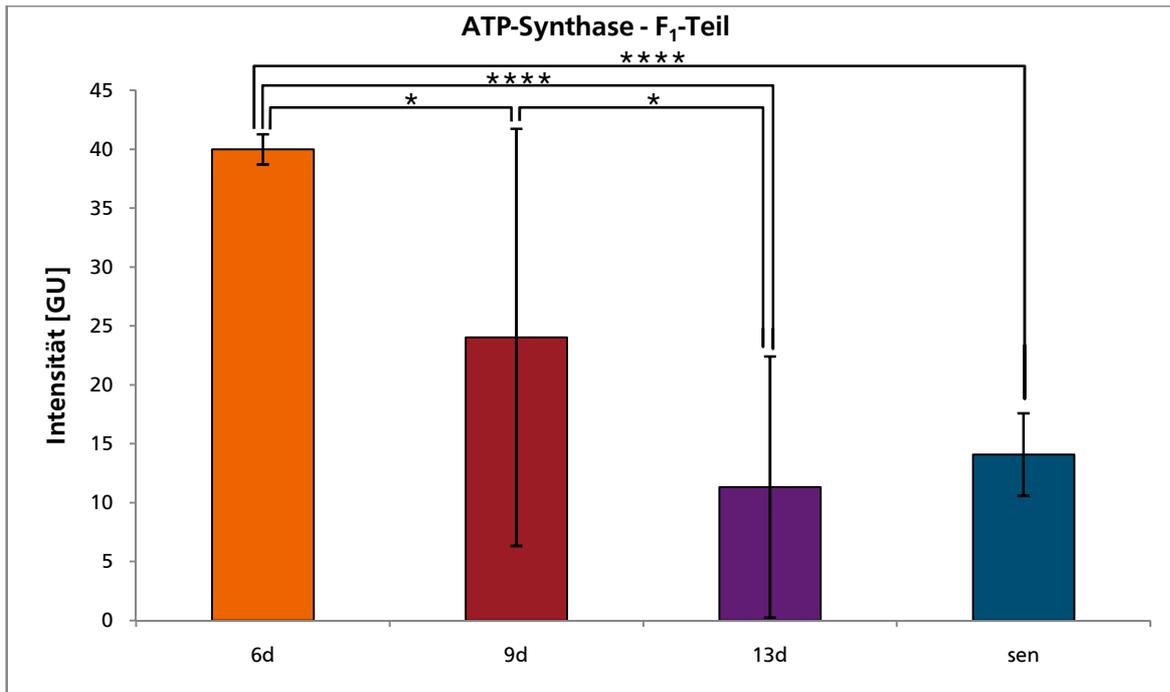


Abbildung 5.1.10 Altersabhängiges Auftreten von freier F₁-Kopfgruppe der ATP-Synthase. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten der α - und β -Untereinheit in GU. Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Menge an freiem F₁-Teil um 40% von den 6 Tage zu den 9 Tage alten Proben ($p = 0,0243$); um 72% von den 6 Tage zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0007$) und um 65% von den 6 Tage alten zu den seneszenten Individuen ($p = 0,0005$). Die 53-%ige Abnahme von den 9 Tage zu den 13 Tage alten Proben ist ebenfalls statistisch signifikant ($p = 0,0469$), während dies für den leichten Anstieg von den 13 Tage alten zu den seneszenten Proben nicht gilt. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen konnte in Rattenmitochondrien aus Gesamthirn^[132, 173], Cortex^[172] und Leber^[174] ein deutlicher Anstieg der Menge an freiem F₁-Teil mit dem Alter beobachtet werden. Als mögliche Ursache für die Abnahme an freiem F₁-Kopfteil mit dem Alter bei *Podospora anserina* kann ein einfacher Zusammenhang mit der Gesamtmenge an ATP-Synthase angenommen werden, so dass unabhängig vom Alter in etwa die gleiche Menge an freiem F₁-Teil vorliegt. Insgesamt beträgt der Anteil des F₁-Teils an der ATP-Synthase Gesamtmenge nur zwischen 2,3% (sen) und 4,6% (9d), während bei der Analyse von Rattenmitochondrien aus verschiedenen Gehirnanaren bei den alten Tieren 4% bis 9% freie F₁-Kopfgruppe detektiert werden konnten^[207]. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Vergleich der vier Normierungsmethoden anhand der ATP-Synthase Gesamtmenge

Alle bis hierher gezeigten Daten für die ATP-Synthase aus *Podospora anserina* beruhen auf der Normierung auf die Menge des Porins der äußeren Mitochondrienmembran. Abschließend sollen am Beispiel der ATP-Synthase Gesamtmenge die Auswirkungen der vier verschiedenen Normierungsmethoden vergleichend diskutiert werden (Normierungsfaktoren im Anhang). Die entsprechenden Diagramme finden sich in den Abbildungen 5.1.11 und 5.1.12. Als Gesamtmenge wird die Summe aus Monomer und Dimer angegeben. Auf eine Einbeziehung der freien F₁-Kopfgruppe wird verzichtet, da diese bei allen Normierungsmethoden lediglich 2,3% bis 4,6% ausmacht. Die entsprechenden Diagramme der ATP-Synthase Gesamtmenge inklusive des freien F₁-Teils finden sich im Anhang.

Die mittels Normierung auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran erhaltenen Ergebnisse aus den 2D-BN/SDS-Gelen für die Gesamtmenge der ATP-Synthase wurden bereits diskutiert (vgl. Abbildung 5.1.9), wobei sich ein drastischer Rückgang von den 6 Tage alten zu den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben zeigt, so dass bei letzteren im Mittel nur noch 52% der ATP-Synthase-Menge der 6 Tage alten Individuen vorliegen. Zwischen den 9 und 13 Tage alten, 13 Tage alten und seneszenten sowie 9 Tage alten und seneszenten Proben konnte dabei kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Vergleicht man dieses Ergebnis nun mit den auf die "alte" (Abbildung 5.1.11 B) bzw. "neue" Proteinkonzentration (Abbildung 5.1.12 A) oder die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel (Abbildung 5.1.12 B) normierten Daten, so besteht eine wesentlich größere Gemeinsamkeit mit den auf die „alte“ Proteinkonzentration und den auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel normierten Daten als mit den auf die „neue“ Proteinkonzentration normierten. Außerdem gleichen sich die durch Normierung auf die „alte“ Proteinkonzentration (Abbildung 5.1.11 B) und das Glycin-SDS-Gel (Abbildung 5.1.12 B) normierten Daten durch die graduelle Abnahme der ATP-Synthase Gesamtmenge von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen. Bei den auf Porin normierten Daten kommt es zu einer schlagartigeren Abnahme der ATP-Synthase Menge (Abbildung 5.1.11 A). Bei Normierung auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel zeigt sich wie bei der Normierung auf Porin ein drastischer Rückgang von den 6 Tage alten zu den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben, wobei bei letzteren im Mittel nur noch 53% der ATP-Synthase-Menge der 6 Tage alten Individuen vorliegen. Sowohl bei Normierung auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran als auch auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel ist die ATP-Synthase-Menge bei den 13 Tage alten Individuen am geringsten. Es findet eine statistisch signifikante Abnahme um 58% (Porin, $p = 0,0009$) bzw. 61% (SDS-Gel, $p = 0,0041$) bezogen auf die Altersstufe 6d statt. Die für statistisch signifikante Änderungen ermittelten Werte für die Abnahme der ATP-Synthase Gesamtmenge unterscheiden sich

zwischen der Normierung auf Porin und der auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel nur um maximal 10 Prozentpunkte. Verwendet man hingegen die „alte“ (Abbildung 5.1.11 B) oder „neue“ Proteinkonzentration (Abbildung 5.1.12 A) als Vergleichsgröße, ergibt sich ein ganz anderes Bild. Zwar zeigt sich auch hier eine Abnahme der Gesamtmenge an ATP-Synthase bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben im Vergleich zu den 6 Tage alten Individuen, jedoch fällt diese im Vergleich mit den auf Porin (Abbildung 5.1.11 A) bzw. die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel (Abbildung 5.1.12 B) normierten Daten deutlich geringer aus. Während die 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben bei letzteren nur noch 52% bzw. 53% der ATP-Synthase-Menge der 6 Tage alten Individuen besaßen, sind es bei Normierung auf die „alte“ Proteinkonzentration noch 66%, bei Verwendung der „neuen“ Proteinkonzentration sogar noch 88%. Normiert man auf die „neue“ Proteinkonzentration, erhält man außerdem die größte ATP-Synthase-Menge bei den seneszenten Proben, anstatt – wie bei allen anderen Normierungsmethoden – bei den 6 Tage alten Kulturen. Betrachtet man die statistisch signifikanten Unterschiede so sind dies bei Normierung auf die „alte“ Proteinkonzentration die 25%-ige Abnahme von 6d zu 9d, die 56%-ige Abnahme von 6d zu 13d, die 41%-ige Abnahme von 9d zu 13d sowie die 77%-ige Zunahme von 13d zu den seneszenten Proben, während bei Verwendung der „neuen“ Proteinkonzentration die 48%-ige Abnahme von 6d nach 13d, die 42%-ige Abnahme von 9d nach 13d sowie die 134%-ige Zunahme von 13d zu den seneszenten Proben statistisch signifikant sind.

Während die auf die „alte“ Proteinkonzentration (Abbildung 5.1.11 B) und die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel normierten Daten (Abbildung 5.1.12 B) denen der Normierung auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (Abbildung 5.1.11 A) noch mehr oder weniger ähnlich sind, unterscheiden sich die auf die „neue“ Proteinkonzentration“ (Abbildung 5.1.12 A) normierten Daten deutlich von allen drei anderen Normierungsmethoden, inklusive der „alten“ Proteinkonzentration. Dieses Ergebnis demonstriert anschaulich, dass die Verwendung der Proteinkonzentration als Vergleichsgröße für auf 2D-BN/SDS-Gelen beruhende quantitative Daten nicht sinnvoll ist und bestätigt somit einmal mehr die Unzulänglichkeiten der Methode nach Bradford^[131] in Verbindung mit Mitochondriensuspensionen. Auch für zukünftige Projekte ist daher eine Normierung auf Porin oder die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel empfehlenswert.

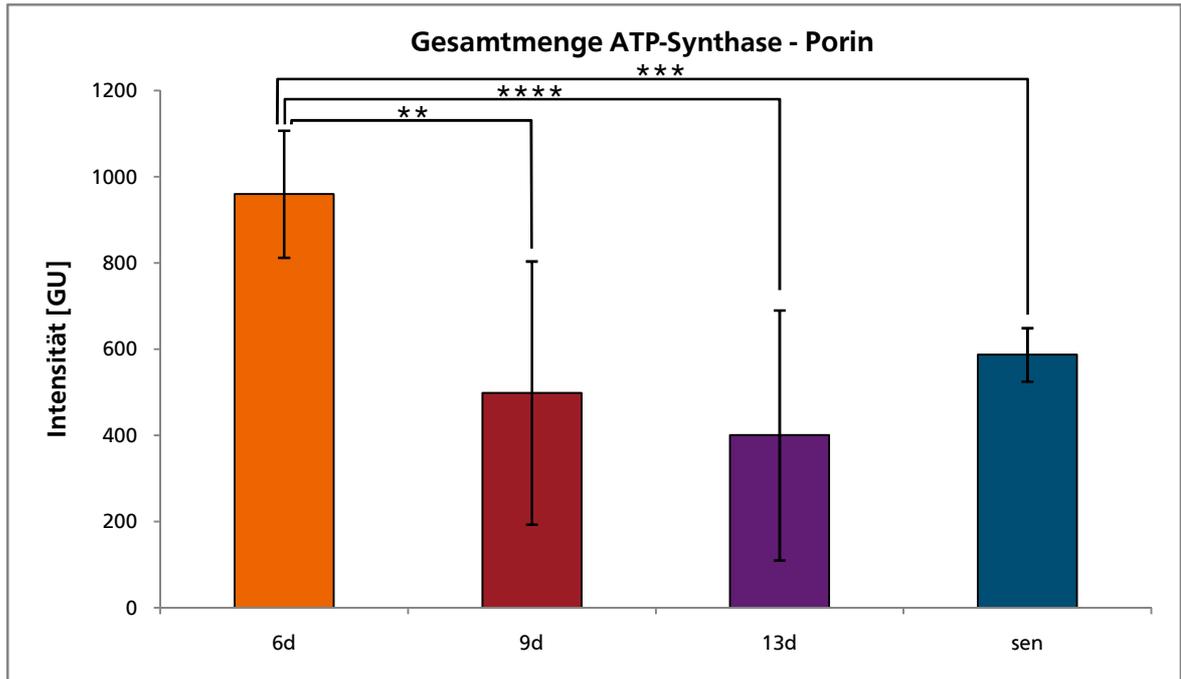
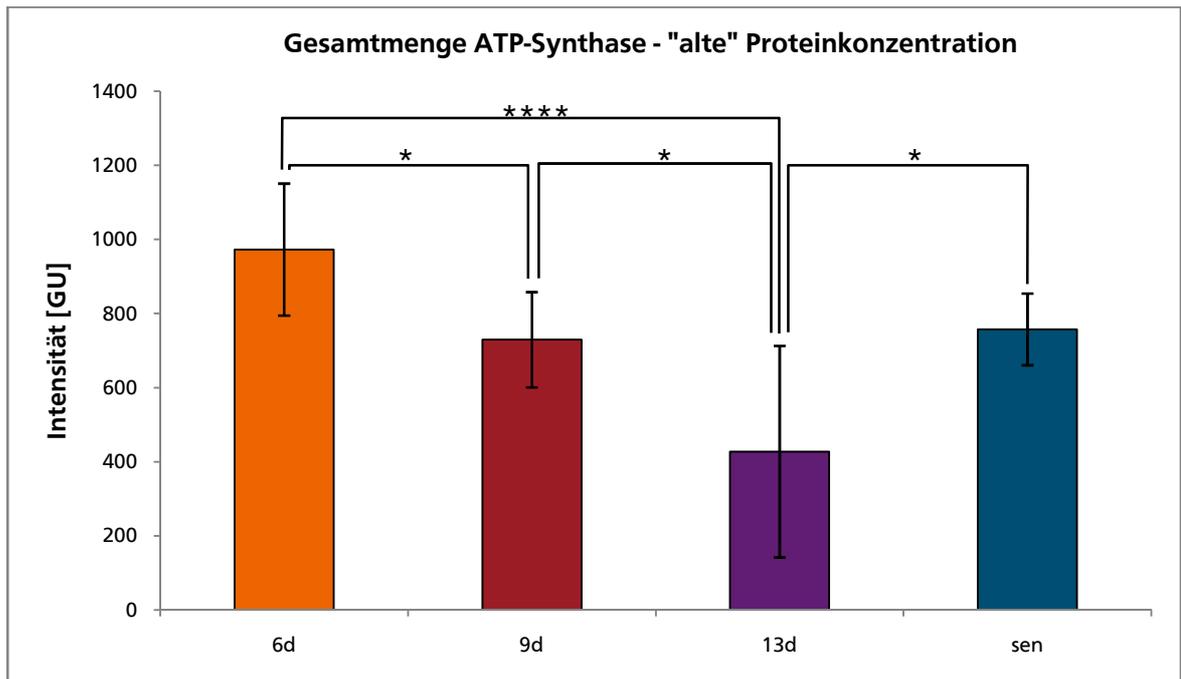
A**B**

Abbildung 5.1.11 Altersabhängigkeit der ATP-Synthase Gesamtmenge. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten von Monomer und Dimer in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. **(A)** Normiert auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (Normierungsfaktoren siehe Anhang Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-48%, $p = 0,0054$), den 6 und 13 Tage alten (-58%, $p = 0,0009$) sowie den 6 Tage alten und seneszenten Proben (-39%, $p = 0,0031$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 52% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. **(B)** Normiert auf die "alte" Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-25%, $p = 0,0380$), den 6 und 13 Tage alten (-56%, $p = 0,0009$), den 9 und 13 Tage alten (-41%, $p = 0,0469$) sowie den 13 Tage alten und seneszenten Proben (+77%, $p = 0,0193$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 66% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

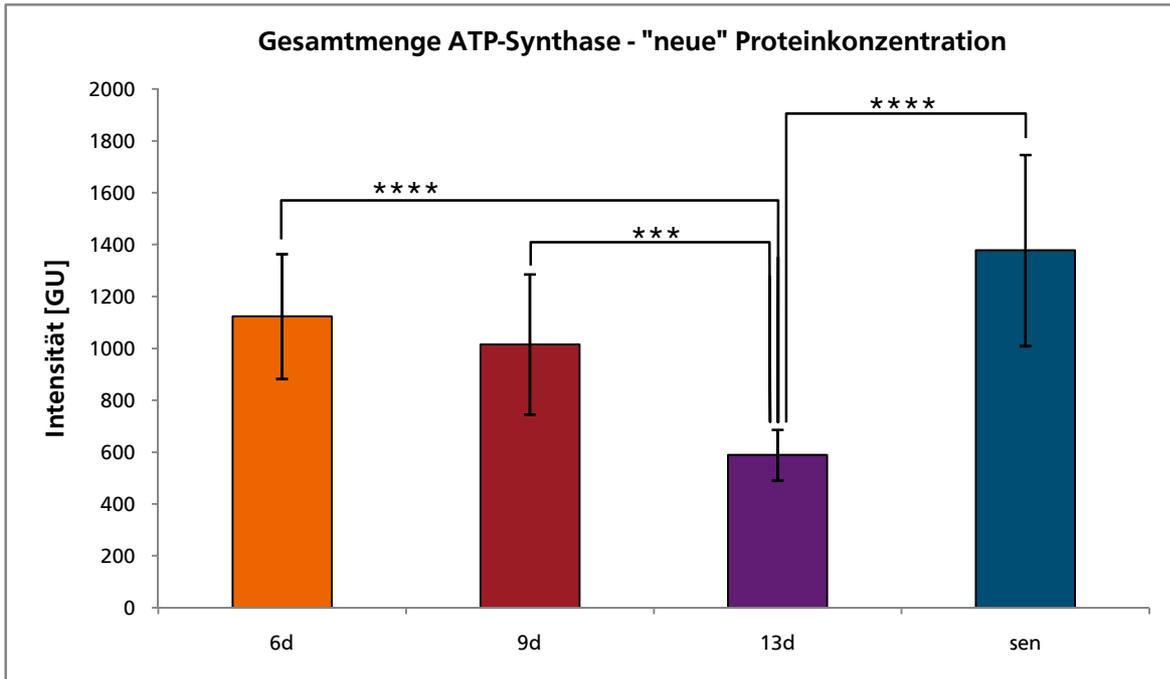
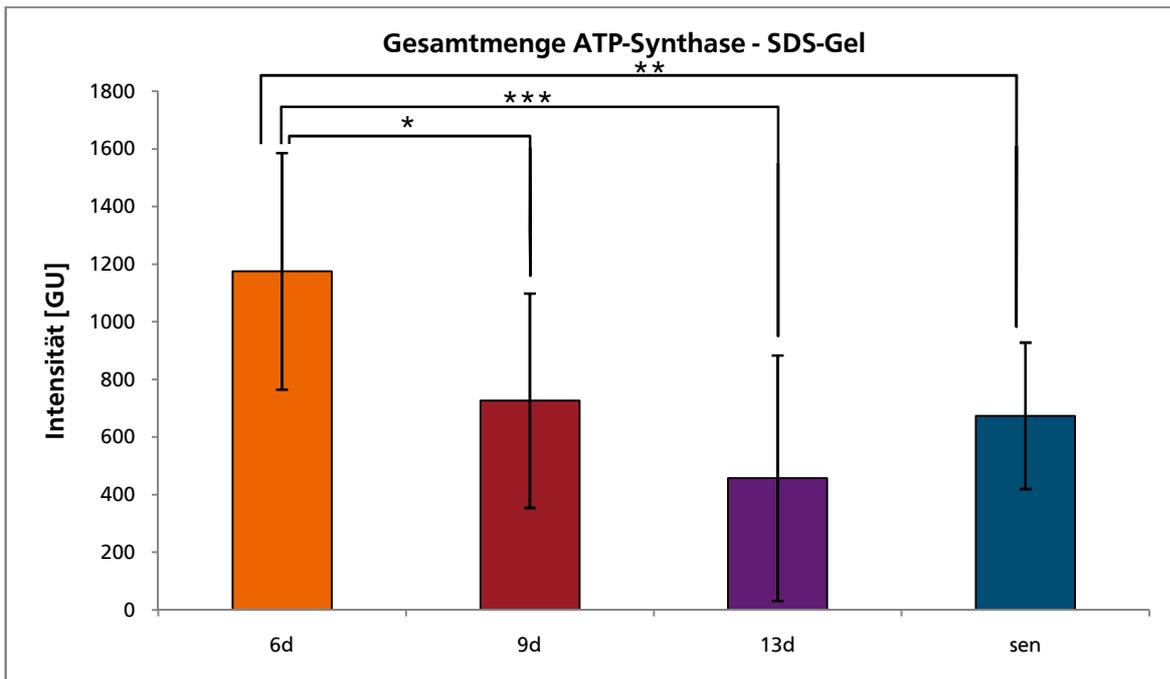
A**B**

Abbildung 5.1.12 Altersabhängigkeit der ATP-Synthase Gesamtmenge. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten von Monomer und Dimer in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. **(A)** Normiert auf die "neue" Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren siehe Anhang Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 13 Tage alten (-48%, $p = 0,0003$), den 9 und 13 Tage alten (-42%, $p = 0,0031$) sowie den 13 Tage alten und seneszenten Proben (+134%, $p = 0,0009$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 88% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. **(B)** Normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Anhang Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-38%, $p = 0,0305$), den 6 und 13 Tage alten (-61%, $p = 0,0041$) sowie den 6 Tage alten und seneszenten Proben (-43%, $p = 0,0071$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 53% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

5.1.1.2 Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV)

Die Komplexe I bis IV der oxidativen Phosphorylierung sind bei Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran und bei Prokaryoten in der Cytoplasmamembran lokalisiert^[181], so also auch die Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV). Diese katalysiert den finalen Schritt der Atmungskette: die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser durch gleichzeitige Oxidation von Cytochrom *c*. Dabei werden vier Protonen aus der Matrix (bzw. in Prokaryoten aus dem Cytoplasma) für die Wassersynthese verwendet und weitere vier Protonen aus der Matrix (dem Cytoplasma) in den Intermembranraum transportiert^[208]. Somit trägt Komplex IV der oxidativen Phosphorylierung zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran bei, der für die Phosphorylierung von ADP zu ATP durch die ATP-Synthase (Komplex V) notwendig ist. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnten Tsukihara *et al.* (1996)^[209] nachweisen, dass Komplex IV als Homodimer vorliegt, was durch weitere Kristallstrukturanalysen bestätigt werden konnte^[210-212]. Mittels blau-nativer Gelelektrophorese und Solubilisierung mit dem milden Detergens Digitonin kann Komplex IV jedoch primär als Monomer detektiert werden. Sowohl Monomer als auch Homodimer sind aktiv^[213]. Durch die Kombination von hochauflösender farblos-nativer Gelelektrophorese und in-Gel Aktivitätstests konnten Wittig *et al.* (2007)^[214] sogar aktives Tetramer nachweisen. Zusätzlich kann Komplex IV in Kombination mit dem Komplex III Dimer und/oder Komplex I in Form von spezifischen Superkomplexen vorliegen^[4, 200, 215-218]. Dies konnte auch schon für *P. anserina* bestätigt werden^[198, 219]. Alle im Rahmen dieser Arbeit auf 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* detektierten Superkomplexe werden in Kapitel 5.1.1.5 besprochen. Im aktuellen Kapitel liegt das Augenmerk auf dem Monomer von Komplex IV (IV₁), da das Dimer (IV₂) auf den 2D-BN/SDS-Gelen nicht identifiziert werden konnte. Dies war auch schon bei der quantitativen Analyse von Rattenhirnmitochondrien im Rahmen meiner Diplomarbeit^[132] der Fall.

Für die Quantifizierung von Komplex IV aus den 2D-BN/SDS-Gelen werden die Untereinheiten II und Vb sowie der Polypeptid V Precursor herangezogen. Die Identifizierung auf dem Gel erfolgte mittels Vergleich mit Daten von *Neurospora crassa*^[6], da *Podospora anserina* in der MASCOT-Datenbank zur Analyse von Peptide Mass Fingerprinting (PMF, Abschnitt 4.6.1) Daten nur sehr schlecht annotiert ist. Untereinheit Vb sowie der Polypeptid V Precursor sind in der Kern-DNA codiert, Untereinheit II in der mitochondrialen DNA (mtDNA)^[220]. Abbildung 5.1.13 zeigt auf einem Ausschnitt aus einem 2D-BN/SDS-Gel die drei für die quantitative Analyse verwendeten Untereinheiten von Komplex IV. Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten sind auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normiert, die entsprechenden Daten für die anderen drei Normierungsmethoden finden sich im Anhang (Abschnitt A.1.2).

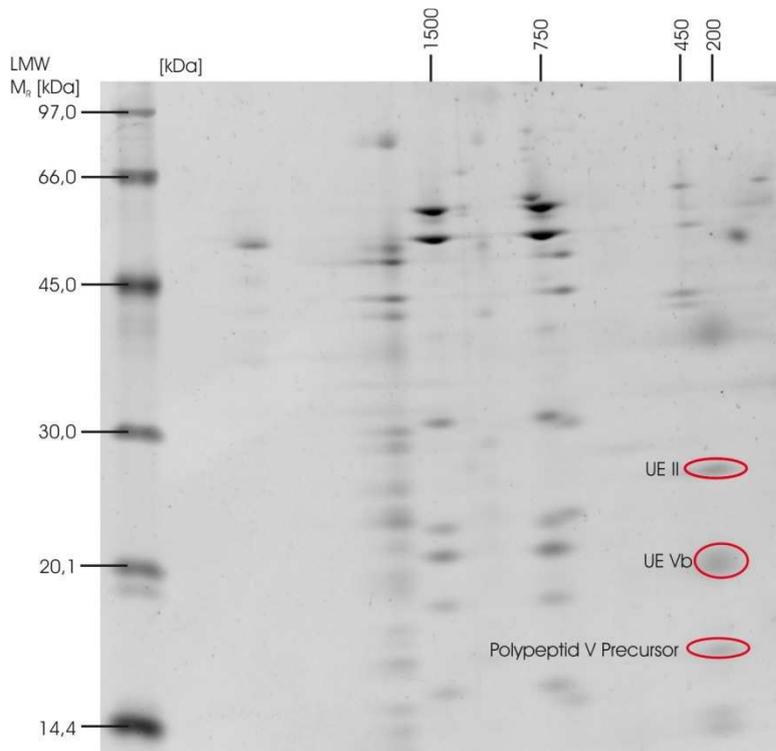


Abbildung 5.1.13 Ausschnitt aus einem SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52). Untereinheit II und Vb sowie der Polypeptid V Precursor des Komplex IV Monomers sind rot markiert. Die mit Hilfe der Software Delta2D erhaltenen Intensitäten dieser Untereinheiten werden für die nachfolgende quantitative Analyse von Komplex IV in *P. anserina* verwendet. Dimerer Komplex IV konnte auf den 2D-BN/SDS-Gelen nicht identifiziert werden. Die Quantifizierung der Komplex IV enthaltenden Superkomplexe erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

In Abbildung 5.1.14 A sind die Intensitäten der Untereinheiten II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors (VP) für alle zwölf Proben von *Podospora anserina* (siehe Tabelle 5.1.1) dargestellt. Abbildung 5.1.14 B zeigt jeweils den Mittelwert der drei Individuen pro Altersstufe. Untereinheit Vb hat stets die größte Intensität, gefolgt von Untereinheit II und dem Polypeptid V Precursor. Die Verhältnisse der Intensitäten der drei Untereinheiten von Komplex IV₁ sind dabei über alle Proben hinweg sehr konstant. Für die gemittelten Werte (Abbildung 5.1.14 B) liegen sie im Bereich von $0,45 \pm 0,09$ (UE II/ UE Vb), $1,40 \pm 0,28$ (UE II/ VP) und $3,22 \pm 0,72$ (UE Vb/ VP). Ein konstantes Verhältnis der Intensitäten der verschiedenen Untereinheiten spricht für eine akkurate und reproduzierbare Quantifizierung. Betrachtet man die Intensitäten der drei Untereinheiten für die einzelnen Individuen (Abbildung 5.1.14 A), so fällt direkt die hohe Intensität für das 9 Tage alte Individuum mit der Kulturnummer #65 (vgl. Tabelle 5.1.1) auf. Dieses Individuum zeigt von allen zwölf die höchste Intensität für die Komplex IV Untereinheiten, wohingegen die Intensitäten der anderen beiden Individuen dieser Altersstufe wesentlich geringer sind. Dies schlägt sich bei der Zusammenfassung der drei Proben pro Altersgruppe auch entsprechend in den Standardabweichungen nieder, die entsprechend groß ausfallen. Dasselbe Individuum hat auch schon beim Monomer und Dimer der ATP-Synthase (vgl. Abbildung 5.1.7) und der ATP-Synthase Gesamtmenge (vgl. Abbildung 5.1.9 A) wesentlich größere Intensitäten gezeigt, als die beiden anderen Individuen derselben Altersstufe. Zwar sind auch die Gel-zu-Gel Unterschiede dieser Kultur recht groß, wie die Standardabweichungen in Abbildung 5.1.14 A zeigen, jedoch kann anhand der Rohdaten

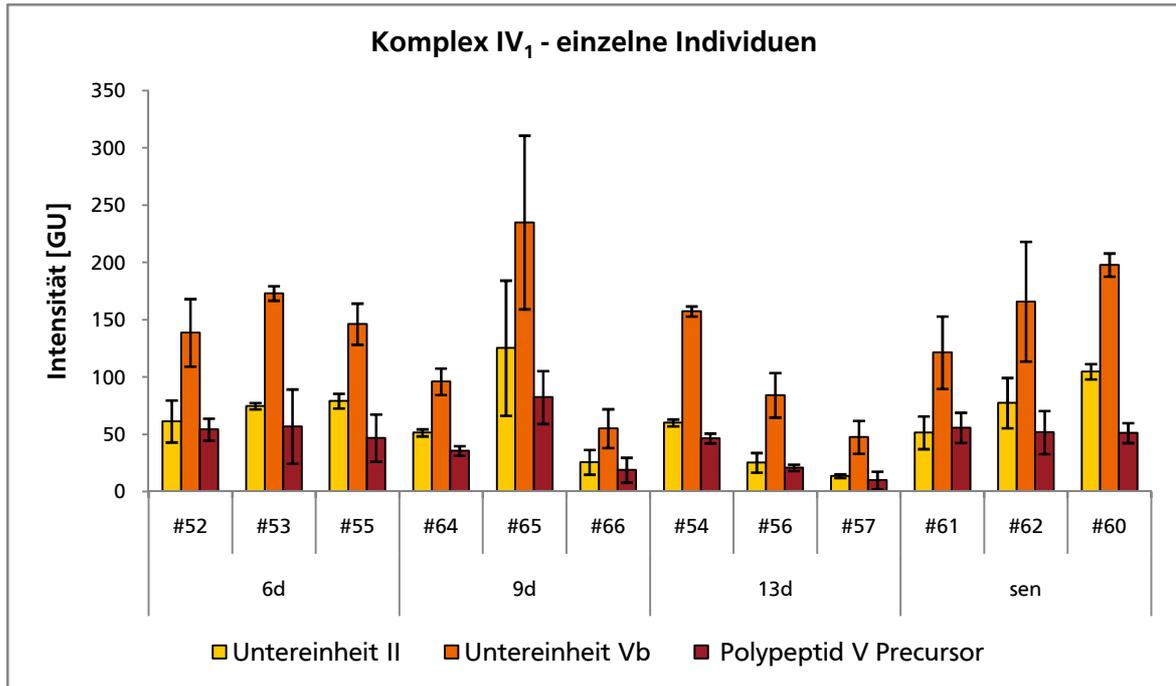
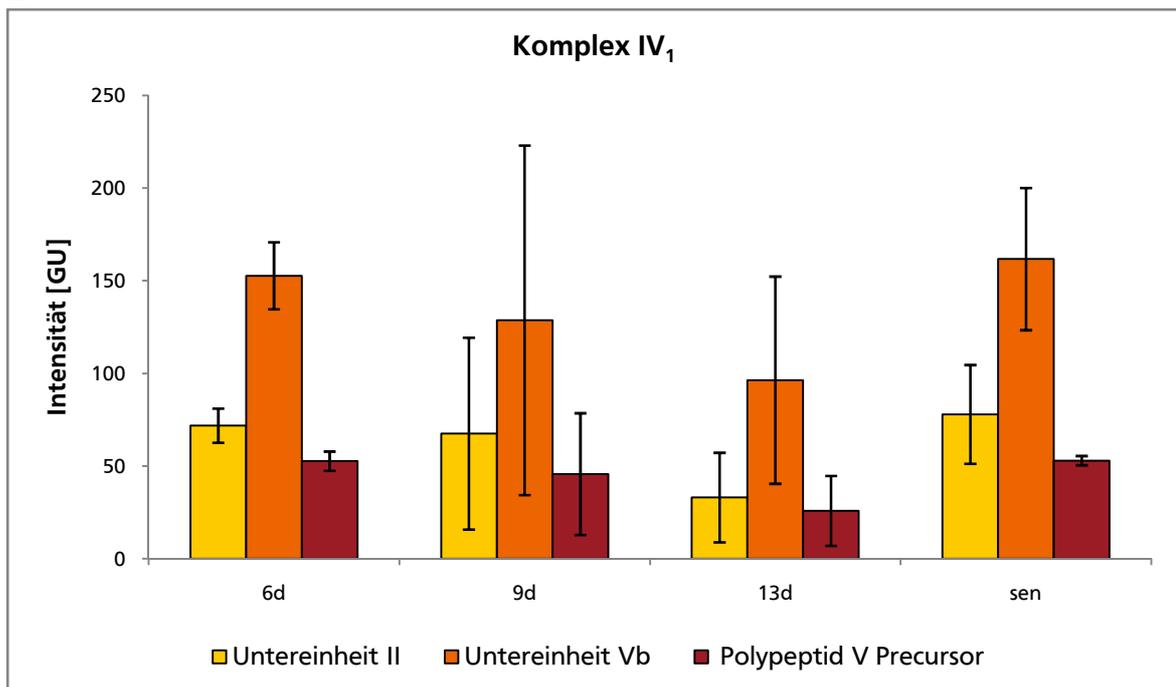
A**B**

Abbildung 5.1.14 Altersabhängige Intensitäten der Untereinheit II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors (VP) von Komplex IV in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Die Verhältnisse der Intensitäten der drei Untereinheiten von Komplex IV₁ sind über alle Proben hinweg sehr konstant. Für die gemittelten Werte (B) liegen sie im Bereich von $0,45 \pm 0,09$ (UE II/ UE Vb), $1,40 \pm 0,28$ (UE II/ VP) und $3,22 \pm 0,72$ (UE Vb/ VP). Wie schon im Falle des ATP-Synthase Monomers und Dimers (vgl. Abbildung 5.1.7) und der Gesamtmenge an ATP-Synthase (vgl. Abbildung 5.1.9 A) zeigt das 9 Tage alte Individuum mit der Kulturnummer #65 eine im Vergleich zu den anderen beiden Individuen dieser Altersstufe stark erhöhte Intensität. Anhand der Mittelwerte der drei Individuen pro Altersstufe (B) lässt sich eine Abnahme der Komplex IV₁ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen vermuten, wobei die seneszenten Kulturen – wie auch schon bei der ATP-Synthase – diesen Trend nicht fortsetzen, sondern sogar am meisten Komplex IV₁ zu besitzen scheinen.

sowohl von Komplex IV als auch der ATP-Synthase kein einzelnes der drei angefertigten Gelreplikate für diese Tatsache verantwortlich sein. Anhand der im Anhang aufgeführten zusätzlichen Daten für die drei anderen Normierungsmethoden wird außerdem deutlich, dass Kultur #65 nur im Falle der Normierung auf Porin dieses Verhalten zeigt. Dies wäre durch einen Fehler bei der Quantifizierung der entsprechenden Porin-Bande zu erklären, diese ist aber klar abgegrenzt und zeigt ein deutliches Signal (vgl. Abbildung 5.1.1), so dass dies eher unwahrscheinlich ist. Die im Vergleich zu den beiden anderen Kulturen gleichen Alters stark erhöhte Intensität – sowohl für Komplex IV als auch für die ATP-Synthase – kann somit entweder auf Fehler bei der Solubilisierung der Proben zurückgeführt werden, wobei dies stets für alle Individuen einer Altersstufe am selben Tag und unter Verwendung derselben Digitonin-Stammlösung geschah, oder ist auf ein tatsächlich erhöhtes Vorkommen von Komplex IV und ATP-Synthase in diesem Individuum zurückzuführen. Auch für die anderen drei Altersstufen entsprechen die Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen im Großen und Ganzen denen, die auch schon beim ATP-Synthase Monomer und Dimer (vgl. Abbildung 5.1.7) und der ATP-Synthase Gesamtmenge (vgl. Abbildung 5.1.9 A) beobachtet werden konnten. Anhand der in Abbildung 5.1.14 B dargestellten Mittelwerte der drei Individuen pro Altersstufe lässt sich eine Abnahme der Komplex IV Menge von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen vermuten, wobei die seneszenten Kulturen – wie auch schon bei der ATP-Synthase – diesen Trend nicht fortsetzen, sondern in etwa die gleiche Komplex IV Menge besitzen wie die 6 Tage alten Proben. Um die altersabhängige Veränderung der Menge von Komplex IV ausführlicher diskutieren zu können, ist in Abbildung 5.1.15 jeweils die Summe aller drei betrachteten Untereinheiten pro Altersstufe dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex IV Menge um 44% von den 6 zu den 13 Tage alten Proben sowie eine ebenfalls statistisch signifikante Zunahme um 88% von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen. Auf die Intensitäten bezogen liegt somit bei den 6 Tage alten und den seneszenten Proben nahezu die gleiche Menge an Komplex IV vor, wobei die seneszenten etwa 6% mehr besitzen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant und durch die unterschiedliche Gewinnung der seneszenten im Vergleich zu den 6, 9 und 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) ist auch keine direkte Vergleichbarkeit zwischen seneszenten und jüngeren Proben gegeben. Betrachtet man also lediglich die 6, 9 und 13 Tage alten Kulturen, ist eine Abnahme der Menge von Komplex IV Monomer im fortgeschrittenen Alter zu beobachten (die 13 Tage alten Individuen haben schon 87% bis 93% ihrer Lebenserwartung erreicht). Da Komplex IV bei der Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser gleichzeitig vier Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert^[208], trägt er zusammen mit den Komplexen I und III₂ zum Aufbau

eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran bei, mittels dessen die ATP-Synthase angetrieben wird^[181]. Eine Abnahme der Komplex IV Menge könnte somit – vor allem in Kombination mit einer gleichzeitigen Abnahme von Komplex I und III₂ – zu einem verringerten elektrochemischen Gradienten führen, wodurch die antreibende Kraft für die ATP-Synthase geringer wird und es zu einem Energiedefizit für die gesamte Zelle kommt. Komplex IV Mangelfunktion ist außerdem eine der am weitesten verbreiteten Atmungskettendefekte beim Menschen und mit einer ganzen Reihe unterschiedlicher Krankheitsbilder verbunden^[220], so dass auch eine pathogene Auswirkung von zu wenig Komplex IV nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Diskussion der Gesamtmenge von Komplex IV inklusive der Komplex IV-enthaltenden Superkomplexe und die prozentuale Verteilung des Komplexes auf diese verschiedenen Formen erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

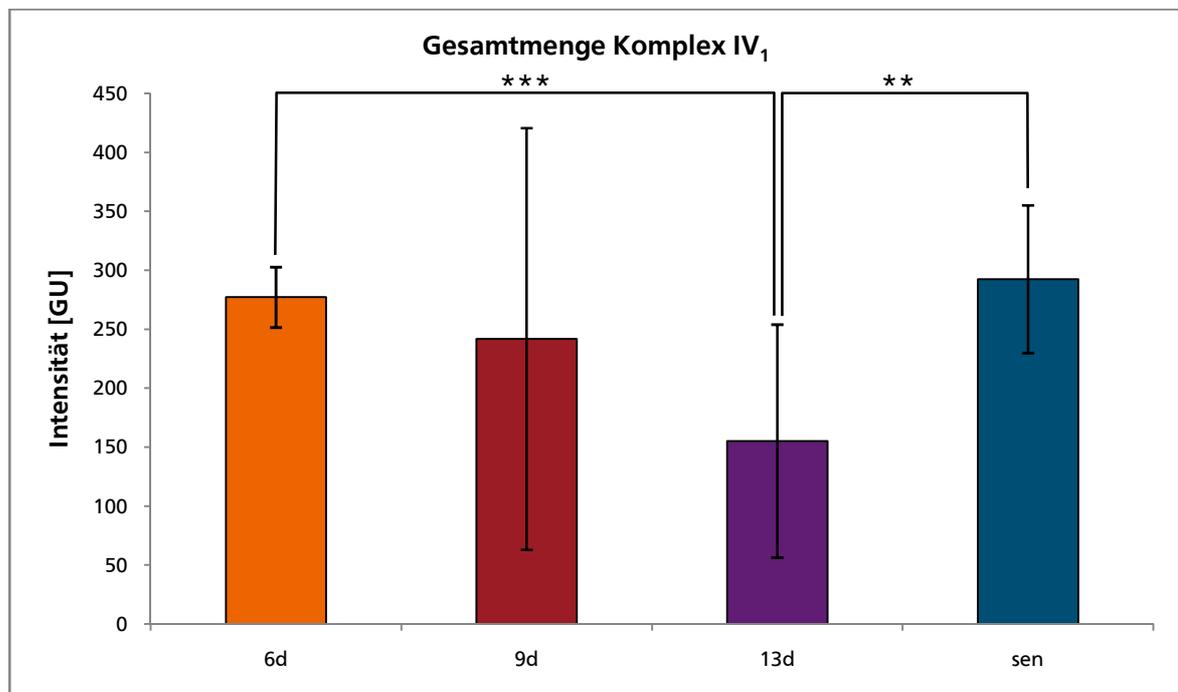


Abbildung 5.1.15 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex IV₁. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten der Untereinheiten II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors von Komplex IV₁ in GU. Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex IV Menge um 44% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen sowie eine ebenfalls statistisch signifikante Zunahme um 88% von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen. Somit liegt bei den 6 Tage alten und seneszenten Proben nahezu die gleiche Menge von Komplex IV₁ vor, wobei die seneszenten Kulturen etwa 6% mehr besitzen. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant und aufgrund der unterschiedlichen Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sind diese nicht direkt mit den jüngeren vergleichbar. (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,005, **** p < 0,001)

5.1.1.3 Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III₂)

Als Bestandteil der oxidativen Phosphorylierung kommt die Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase (Komplex III₂, auch Cytochrom-*bc1*-Komplex) in der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten und der Cytoplasmamembran von Prokaryoten vor^[181]. Sie liegt stets als Homodimer vor^[208] und kann als individueller Komplex auch nur in dieser Form auf den BN- und 2D-BN/SDS-Gelen detektiert werden. Zusammen mit Komplex IV und/oder Komplex I kann Komplex III₂ außerdem in Form stöchiometrischer Superkomplexe vorkommen^[4, 200, 215-218], wobei auch hier stets das Homodimer beteiligt ist. Entsprechende Superkomplexe mit Beteiligung von Komplex III₂ konnten auch schon für *Podospira anserina* nachgewiesen werden^[198, 219] und sind auch auf den im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigten 2D-BN/SDS-Gelen zu finden. In diesem Kapitel wird jedoch nur das Vorliegen des Komplex III Homodimers behandelt. Quantifizierung und Diskussion der Superkomplexe erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

In Säugern besteht ein Komplex III Monomer aus bis zu elf Untereinheiten, von denen lediglich eine – das Cytochrom *b* – in der mitochondrialen DNA codiert ist^[221]. Als Teil der oxidativen Phosphorylierung katalysiert Komplex III₂ die Übertragung von zwei Elektronen des Ubichinols auf Cytochrom *c*, wodurch das Cytochrom *c* reduziert und Ubichinol zu Ubichinon oxidiert wird^[222]. Dabei werden für jedes oxidierte Ubichinol zwei Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transportiert^[223, 224], so dass Komplex III₂ wie auch Komplex IV zum Aufbau des für die ATP-Synthase notwendigen Protonengradienten beiträgt. Zusammen mit Komplex I stellt Komplex III₂ außerdem die Hauptquelle für Superoxidradikal-Anionen (O₂^{•-}) dar^[29-31], die weitere reaktive Sauerstoffspezies (ROS von engl. *reactive oxygen species*), wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H₂O₂) generieren können, welches wiederum bei Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen durch die Fenton-Reaktion Hydroxylradikale (OH[•]) erzeugt^[149, 225] (siehe Abschnitt 4.7). Durch Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO[•]) erzeugen Superoxidradikal-Anionen außerdem Peroxynitrit (ONOO⁻)^[226]. Zwar dient die Produktion von ROS einerseits als metabolisches Signal^[227-232] und ist für die Zelle ein normaler Zustand, da etwa 1% des umgesetzten Sauerstoffs zu ROS führen^[225, 233], andererseits kann eine gesteigerte ROS-Produktion, beispielsweise durch beeinträchtigte Funktion der Komplexe III₂ oder I^[234], das mitochondriale Schutzsystem überfordern und es kommt zu Mutationen der mtDNA, Strukturveränderungen von Proteinen und Kohlenhydraten, Peroxidation von Lipiden und Schädigung der Membranen^[235]. Trotzdem gehören Komplex III₂ Mangelfunktionen zu den am wenigsten verbreiteten Atmungskettendefekten beim Menschen^[220, 236], werden allerdings meistens durch Mutationen der einzigen mitochondrial codierten Untereinheit (Cytochrom *b*) verursacht^[220].

Für die Quantifizierung von Komplex III₂ aus den 2D-BN/SDS-Gelen werden Core Protein 1 und 2 herangezogen, die beide in der Kern-DNA codiert sind^[221]. Wie schon bei den Untereinheiten von Komplex IV erfolgt die Identifizierung auf dem Gel durch Vergleich mit Daten von *Neurospora crassa*^[6], da *Podospora anserina* in der MASCOT-Datenbank zur Analyse von Peptide Mass Fingerprinting (PMF, Abschnitt 4.6.1) Daten nur sehr schlecht annotiert ist. Abbildung 5.1.16 zeigt auf einem Ausschnitt aus einem 2D-BN/SDS-Gel die beiden für die quantitative Analyse verwendeten Untereinheiten von Komplex III₂. Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten sind auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normiert, die entsprechenden Daten für die anderen drei Normierungsmethoden finden sich im Anhang (Abschnitt A.1.3).

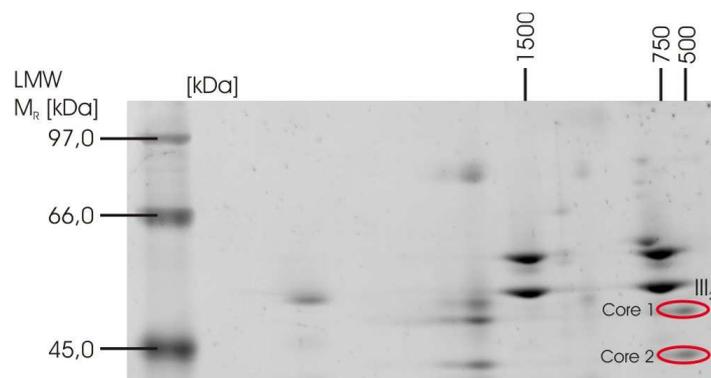


Abbildung 5.1.16 Ausschnitt aus einem SYPRO[®] Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52). Core Protein 1 und 2 des Komplex III Homodimeren (III₂) sind rot markiert. Die mit Hilfe der Software Delta2D erhaltenen Intensitäten dieser beiden Untereinheiten werden für die nachfolgende quantitative Analyse von Komplex III₂ in *P. anserina* verwendet. Die Quantifizierung der Komplex III₂ enthaltenden Superkomplexe erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

In Abbildung 5.1.17 A sind die Intensitäten von Core Protein 1 und 2 für alle zwölf Proben von *Podospora anserina* (siehe Tabelle 5.1.1) dargestellt. Abbildung 5.1.17 B zeigt jeweils den Mittelwert der drei Individuen pro Altersstufe. Dabei fällt auf, dass das Verhältnis von Core Protein 1 zu Core Protein 2 sich mit dem Alter ändert, denn während bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen Core Protein 1 überwiegt, ist bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mehr Core Protein 2 als 1 vorhanden. Dies gilt nicht nur für den Mittelwert der drei Individuen pro Altersstufe sondern für jedes einzelne Individuum (Abbildung 5.1.17 A). Von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen nimmt das Verhältnis von Core Protein 1 zu Core Protein 2 kontinuierlich ab (6d: $1,14 \pm 0,16$, 9d: $1,20 \pm 0,07$, 13d: $0,41 \pm 0,12$). Zu den seneszenten Proben hin gibt es wieder einen leichten Anstieg ($0,71 \pm 0,21$), die Intensitäten für das Core Protein 2 sind aber noch immer höher als die des Core Protein 1. Wie diese veränderte Zusammensetzung der Untereinheiten von Komplex III₂ zustande kommt und in welchem Zusammenhang sie mit dem Alternsprozess steht ist unbekannt. Unabhängig vom Verhältnis der beiden betrachteten Untereinheiten lässt sich eine Abnahme der Komplex III₂ Menge von

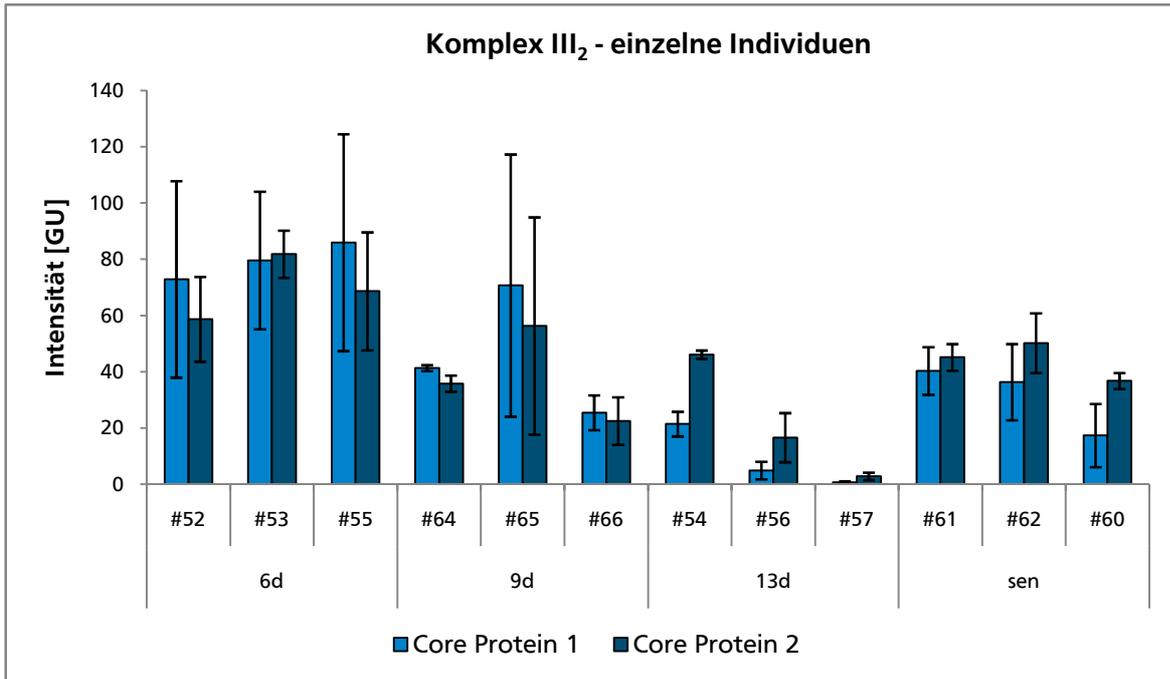
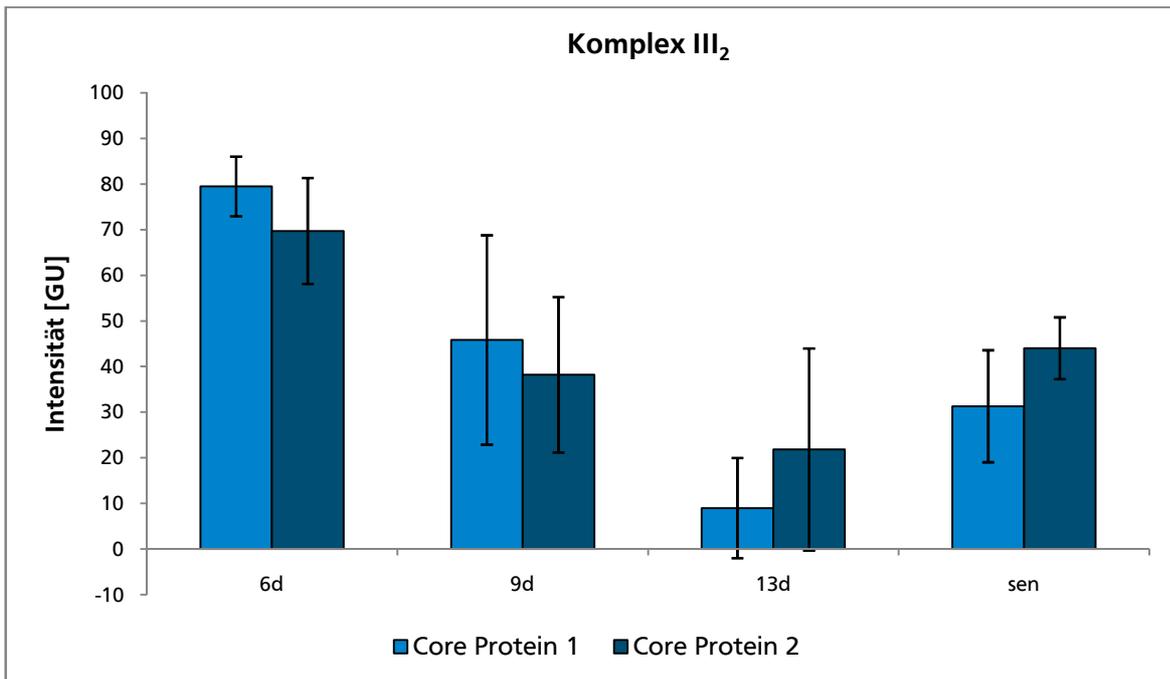
A**B**

Abbildung 5.1.17 Altersabhängige Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Während bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen Core Protein 1 überwiegt, ist bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mehr Core Protein 2 als 1 vorhanden. Unabhängig vom Verhältnis der beiden betrachteten Unter-einheiten lässt sich eine Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen beobachten, die von den seneszenten Proben jedoch nicht fortgesetzt wird. (A) Die Individuen der 6 Tage alten und seneszenten Kulturen sind sich jeweils relativ ähnlich. Kultur #65 der Altersstufe 9d zeigt – wie schon bei der ATP-Synthase und Komplex IV₁ – eine höhere Intensität als die beiden anderen Individuen dieser Gruppe, der Unterschied ist hier jedoch geringer. Die 13 Tage alten Individuen zeigen erneut sehr unterschiedliche Intensitäten, die von Kultur #54 zu #57 abnehmen und in einer sehr großen Standardabweichung für die gemittelten Werte (B) resultieren.

den 6 zu den 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen beobachten, die – wie auch schon bei ATP-Synthase und Komplex IV₁ – von den seneszenten Proben nicht fortgesetzt wird. Die Frage ob im hohen Alter tatsächlich eine veränderte Menge dieser Atmungskettenkomplexe vorliegt oder die unterschiedlichen Verfahren bei der Gewinnung der seneszenten und der jüngeren Proben (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) eventuell zu einer Verjüngung oder einer anderen Art von Veränderung bei den seneszenten Kulturen führen, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Während sich die Individuen der 6 Tage alten und seneszenten Kulturen im Bezug auf die Intensitäten für Core Protein 1 und 2 von Komplex III₂ jeweils relativ ähnlich sind, zeigt Kultur #65 der Altersstufe 9d wie schon bei der ATP-Synthase und Komplex IV₁ eine höhere Intensität als die beiden anderen Individuen dieser Gruppe, wobei der Unterschied hier jedoch geringer ausfällt. Die 13 Tage alten Individuen zeigen – ebenfalls wie schon zuvor bei ATP-Synthase und Komplex IV₁ – sehr unterschiedliche Intensitäten, die von Kultur #54 zu #57 abnehmen und in einer sehr großen Standardabweichung für die gemittelten Werte (Abbildung 5.1.17 B) resultieren. Um die altersabhängige Veränderung der Menge von Komplex III₂ ausführlicher diskutieren zu können, ist in Abbildung 5.1.18 jeweils die Summe der beiden betrachteten Untereinheiten pro Altersstufe dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge sowohl von den 6 zu den 9 Tage alten (-44%, $p = 0,0118$) als auch von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen (-63%, $p = 0,0092$). Auch die 79%-ige Abnahme von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen ist statistisch hoch signifikant ($p = 0,0003$), so dass – ohne Berücksichtigung der seneszenten Kulturen – eine graduelle Abnahme der Komplex III₂ Menge mit dem Alter zu verzeichnen ist. Die seneszenten Kulturen, bei denen durch ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) keine direkte Vergleichbarkeit mit den jüngeren Proben gegeben ist, enthalten in etwa so viel Komplex III₂ wie die 9 Tage alten Kulturen. Das entspricht einer 50%-igen Abnahme verglichen mit den 6 Tage alten ($p = 0,0017$) sowie einer 144%-igen Zunahme ausgehend von den 13 Tage alten Proben ($p = 0,0041$). Wiederum kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob im hohen Alter tatsächlich eine drastische Erhöhung der Komplex III₂ Menge vorliegt oder die unterschiedlichen Methoden der Probengewinnung bei den seneszenten und den jüngeren Kulturen einen Vergleich altersabhängiger Unterschiede unmöglich machen. Da Komplex III₂ zusammen mit den Komplexen IV und I zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran beiträgt, mittels dessen die ATP-Synthase angetrieben wird^[181], könnte eine Abnahme der Komplex III₂ Menge – vor allem in Kombination mit einer gleichzeitigen Abnahme von Komplex I und IV – zu einem stark verringerten elektrochemischen Protonengradienten und somit zu verminderter ATP-Synthase führen, was ein Energiedefizit für die gesamte Zelle nach sich ziehen sollte. Da Komplex III₂

Mangelfunktionen zu den am wenigsten verbreiteten Atmungskettendefekten beim Menschen gehören^[220, 236] und meistens durch Mutationen der mitochondrial codierten Untereinheit Cytochrom *b* verursacht werden^[220], ist eine zusätzliche pathogene Auswirkung einer verminderten Komplex III₂ Menge zwar nicht auszuschließen aber unwahrscheinlich. Interessant wäre, ob mit der bei den 13 Tage alten im Vergleich mit den 6 Tage alten Kulturen stark verringerten Komplex III₂ Menge eine entsprechend verringerte Produktion von ROS einhergeht. Entsprechende Messungen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt, allerdings wird in Kapitel 5.1.2 auf nicht-enzymatische oxidative Proteinmodifikationen der ATP-Synthase aus *Podospora anserina* eingegangen.

Die Diskussion der Gesamtmenge von Komplex III₂ inklusive der Komplex III₂-enthaltenden Superkomplexe und die prozentuale Verteilung des Komplexes auf diese verschiedenen Formen erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

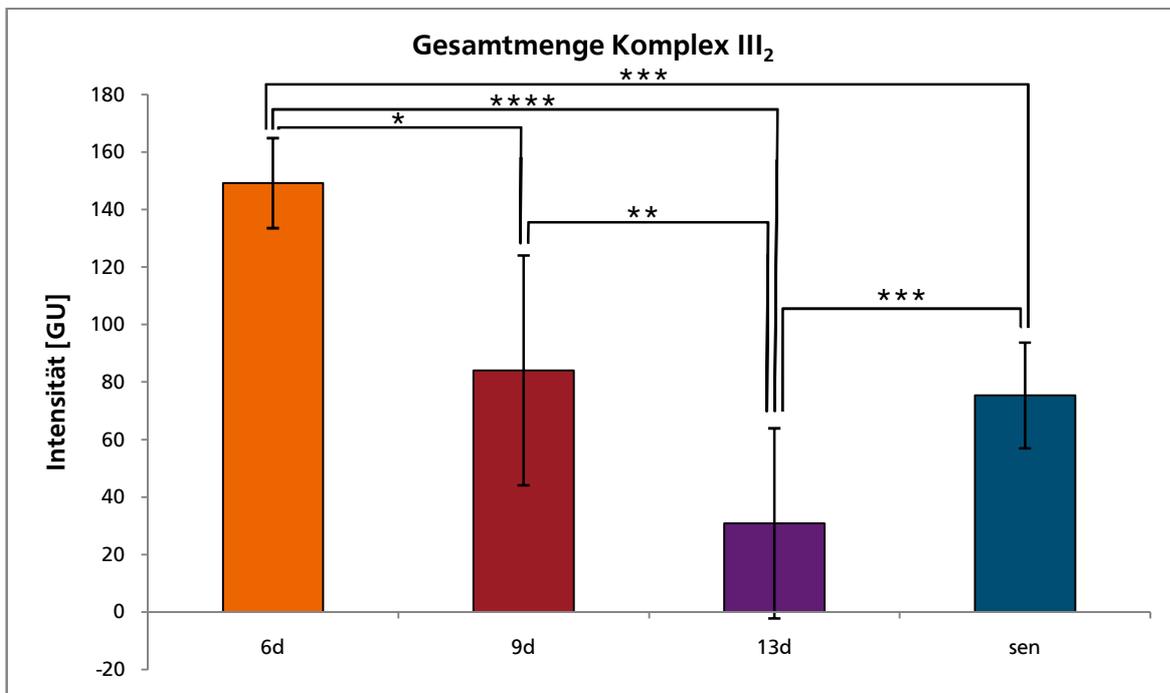


Abbildung 5.1.18 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex III₂. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU. Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge sowohl von den 6 zu den 9 Tage alten (-44%, $p = 0,0118$) als auch von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen (-63%, $p = 0,0092$). Auch die 79%-ige Abnahme von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen ist statistisch signifikant ($p = 0,0003$), so dass – ohne Berücksichtigung der seneszenten Kulturen – eine graduelle Abnahme der Komplex III₂ Menge mit dem Alter zu verzeichnen ist. Die seneszenten Kulturen, bei denen durch ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) keine direkte Vergleichbarkeit mit den jüngeren Proben gegeben ist, enthalten in etwa so viel Komplex III₂ wie die 9 Tage alten Kulturen. Das entspricht einer 50%-igen Abnahme verglichen mit den 6 Tage alten ($p = 0,0017$) sowie einer 144%-igen Zunahme ausgehend von den 13 Tage alten Proben ($p = 0,0041$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

5.1.1.4 NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I) ist mit einer molaren Masse von etwa 1 MDa in Eukaryoten^[237] der größte Komplex der oxidativen Phosphorylierung und liegt in der inneren Mitochondrienmembran von Eukaryoten und der Cytoplasmamembran von Prokaryoten vor^[181]. Sie katalysiert die Oxidation von NADH aus Glycolyse und Citratzyklus, wobei die beiden freiwerdenden Elektronen zur Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol dienen und für jedes übertragene Elektron zwei Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum transportiert werden^[238, 239]. Somit trägt Komplex I, wie auch die Komplexe III₂ und IV, zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten bei, mittels dessen die ATP-Synthese angetrieben wird. Komplex I aus Rinderherzmitochondrien besteht aus 46 Untereinheiten^[240], von denen sieben in der mitochondrialen DNA codiert sind^[241, 242]. Der prokaryotische Komplex besteht aus 14 Untereinheiten und hat eine molare Masse von etwa 500 kDa^[237]. Einige Untereinheiten von Komplex I scheinen zusätzliche Funktionen zu haben, wie beispielsweise GRIM-19. Diese Untereinheit wurde zuerst als Interferon-β- und Retinolsäure-induzierter Regulator für den Zelltod identifiziert^[243, 244], später aber als Untereinheit von Komplex I erkannt^[243], die eine entscheidende Rolle bei der Elektronen-Transferaktivität spielt^[245]. Auf welche Weise GRIM-19, das nicht wie andere Apoptose-Faktoren im Intermembranraum lokalisiert ist, aus dem Mitochondrium exportiert wird ist noch unklar^[238]. Komplex I Mangelfunktion ist die am weitesten verbreitete Ursache für Fehlfunktionen der Atmungskette^[12, 13] und zieht ein breites Spektrum von Krankheitsbildern nach sich^[238]. Mutationen der mitochondrial codierten Untereinheiten können beispielsweise zur Leber'schen Hereditären Optikusneuropathie (LHON) führen, einer Form der Blindheit, bei der lediglich der Sehnerv betroffen ist^[246, 247]. Ebenfalls mit dem Defekt von Komplex I verbunden sind Erkrankungen wie das Leigh-Syndrom, das bereits in frühester Kindheit auftritt und mit progressiver Neurodegeneration einhergeht^[248] sowie die Parkinson-Krankheit, da Defekte von Komplex I am Absterben dopaminerger Gehirnzellen beteiligt sind^[249]. Mittels BN- und 2D-BN/SDS-PAGE kann Komplex I als individueller Komplex, vor allem jedoch in Form von Superkomplexen mit Beteiligung von Komplex III₂ und/oder IV detektiert werden. Es gibt außerdem erste Hinweise auf das Vorkommen von Komplex I Homodimeren^[1, 7, 8]. Im Hirngewebe von Ratten liegt der überwiegende Teil von Komplex I in Form von Superkomplexen vor und es kann nur wenig individueller Komplex detektiert werden^[172, 173]. Im Rahmen meiner Diplomarbeit lag Komplex I im Gesamthirn von Ratten verschiedener Altersstufen nur in Form von Superkomplexen vor und es konnte gar kein individueller Komplex identifiziert werden^[132]. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass die Ausbildung von Superkomplexen für Stabilität und eventuell auch Assemblierung von Komplex I essentiell ist, da beispielsweise

fehlender Komplex III₂ oder IV im Bakterium *Paracoccus denitrificans* zu einer verringerten Komplex I Menge führt^[250]. Auch im Menschen konnte nachgewiesen werden, dass Komplex I durch Assoziation mit Komplex III₂ stabilisiert wird und Mutationen von Komplex III₂, beispielsweise des mitochondrial codierten Cytochrom *b* Gens oder der in der Kern-DNA codierten BCS1L Untereinheit, sekundäre Defekte von Komplex I nach sich ziehen^[238, 251, 252]. Es ist zwar kein aktiver, jedoch vollständig assemblierter Komplex III₂ notwendig, um eine ausreichende Stabilisierung von Komplex I zu gewährleisten^[251-253]. Es wird vermutet, dass auch Komplex IV bei Assemblierung und Stabilität von Komplex I eine Rolle spielt^[254, 255]. Zwar ist mittlerweile offensichtlich, dass die Ausbildung von Superkomplexen die Stabilität von Komplex I verbessert, jedoch ist noch immer unklar, ob diese Stabilisierung ein Resultat der Unterstützung der Assemblierung des Komplexes ist oder erst nach dieser erfolgt^[238]. Es gibt jedoch erste Hinweise darauf, dass Komplex I schon vor seiner vollständigen Assemblierung Superkomplexe ausbilden kann und sich auch in seiner Abwesenheit Superkomplexe bestehend aus Komplex III₂ und IV bilden können^[6]. Diese könnten eventuell als eine Art Gerüst für Komplex I Intermediate während dessen Assemblierung dienen und dabei sowohl der Stabilisierung als auch dem Schutz vor Abbau dienen^[238].

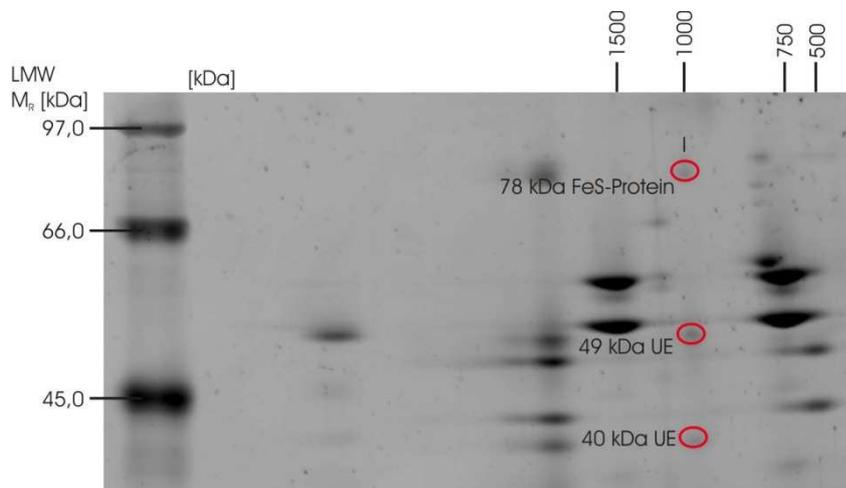


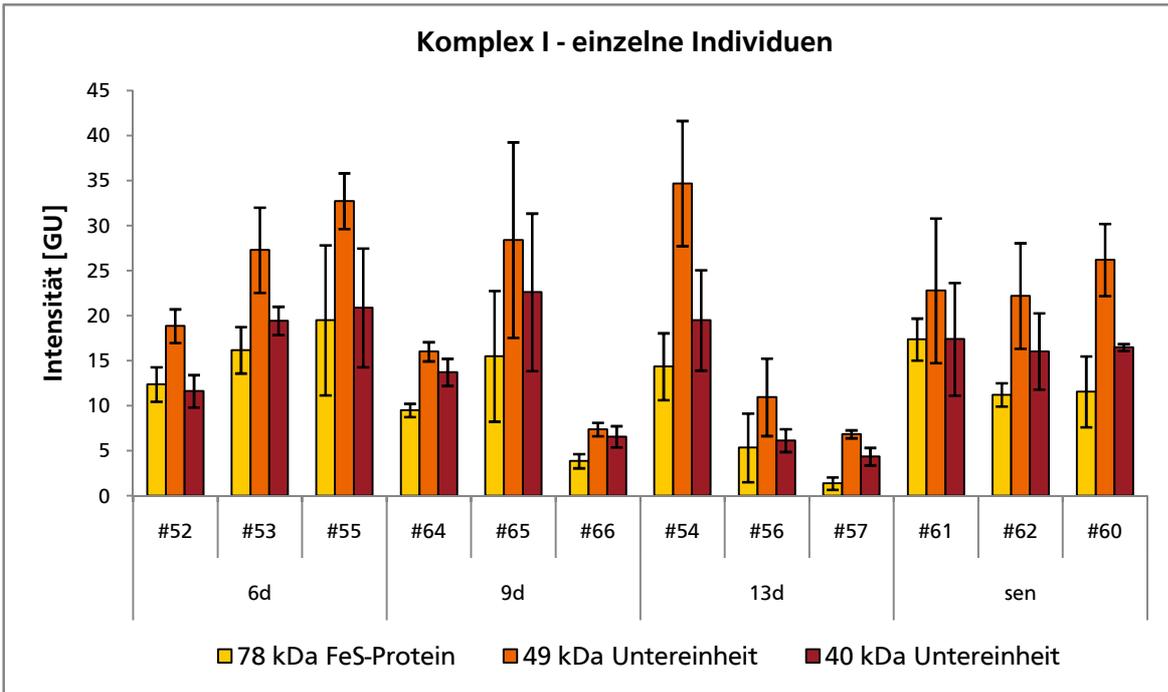
Abbildung 5.1.19 Ausschnitt aus einem SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52). Das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I sind rot markiert. Die mit Hilfe der Software Delta2D erhaltenen Intensitäten dieser drei Untereinheiten werden für die nachfolgende quantitative Analyse von individuellem Komplex I in *P. anserina* verwendet. Die Quantifizierung der Komplex I enthaltenden Superkomplexe erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit können auf 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina* sowohl individueller Komplex I als auch Superkomplexe mit dessen Beteiligung detektiert werden. Homodimere, wie sie für *Neurospora crassa*^[7], *Yarrowia lipolytica*^[8] sowie die langlebige *P. anserina* Mutante ex1^[1] beschrieben werden, können nicht identifiziert werden. In diesem Kapitel wird nur das Vorliegen von individuellem Komplex I behandelt; Quantifizier-

ung und Diskussion der Superkomplexe erfolgt separat in Kapitel 5.1.1.5. Für die Quantifizierung von Komplex I aus den 2D-BN/SDS-Gelen werden das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit herangezogen, die alle in der Kern-DNA codiert sind^[6, 238]. Wie schon bei den Untereinheiten der Komplexe IV und III₂ erfolgte die Identifizierung auf dem Gel durch Vergleich mit Daten von *Neurospora crassa*^[6], da *Podospora anserina* in der MASCOT-Datenbank zur Analyse von Peptide Mass Fingerprinting (PMF, Abschnitt 4.6.1) Daten nur sehr schlecht annotiert ist. Abbildung 5.1.19 zeigt auf einem Ausschnitt aus einem 2D-BN/SDS-Gel die für die quantitative Analyse verwendeten Untereinheiten von Komplex I. Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten sind auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normiert, die entsprechenden Daten für die anderen drei Normierungsmethoden finden sich im Anhang (Abschnitt A.1.4).

In Abbildung 5.1.20 A sind die Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit für alle zwölf Proben von *P. anserina* (siehe Tabelle 5.1.1) dargestellt. Abbildung 5.1.17 B zeigt jeweils den Mittelwert der drei Individuen pro Altersstufe. Die Intensitäten der 49 kDa Untereinheit sind stets am größten, die des 78 kDa FeS-Proteins am geringsten. Wie schon bei der Quantifizierung der Komplexe IV und III₂ zeigen auch hier die drei Individuen der 6 Tage alten und seneszenten Kulturen recht einheitliche Intensitäten, während bei den 9 Tage alten Proben das Individuum mit der Kulturnummer #65 – wie bisher immer – eine gegenüber den anderen beiden Individuen dieser Altersstufe erhöhte Intensität zeigt und die Menge an Komplex I innerhalb der Gruppe der 13 Tage alten Kulturen von Probe #54 zu #57 abnimmt. Aus der Tatsache, dass auf allen im Rahmen der vorliegenden Arbeit angefertigten 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* nur sehr wenig individueller Komplex I vorliegt (nur etwa 5 bis 25 GU pro betrachteter Untereinheit), resultieren sehr große Standardabweichungen. Betrachtet man die in Abbildung 5.1.20 B dargestellten Mittelwerte der einzelnen Untereinheiten für die vier verschiedenen Altersstufen, so scheinen zwar die 9 und 13 Tage alten Kulturen etwas weniger individuellen Komplex I zu besitzen als die 6 Tage alten und seneszenten Proben, jedoch lässt sich aufgrund der schon erwähnten großen Standardabweichungen zunächst keine klare Aussage treffen. Um die altersabhängige Veränderung der Menge von individuellem Komplex I genauer diskutieren zu können, ist in Abbildung 5.1.21 jeweils die Summe der drei betrachteten Untereinheiten pro Altersstufe dargestellt. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Menge an individuellem Komplex I um 31% von den 6 zu den 9 Tage alten und um 42% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen, während weder die 16%-ige Abnahme von den 9 zu den 13 Tage alten Proben noch die 56%-ige Zunahme von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen statistisch signifikant ist. Somit ist eine altersbedingte Abnahme der Menge an individuellem Komplex I

A



B

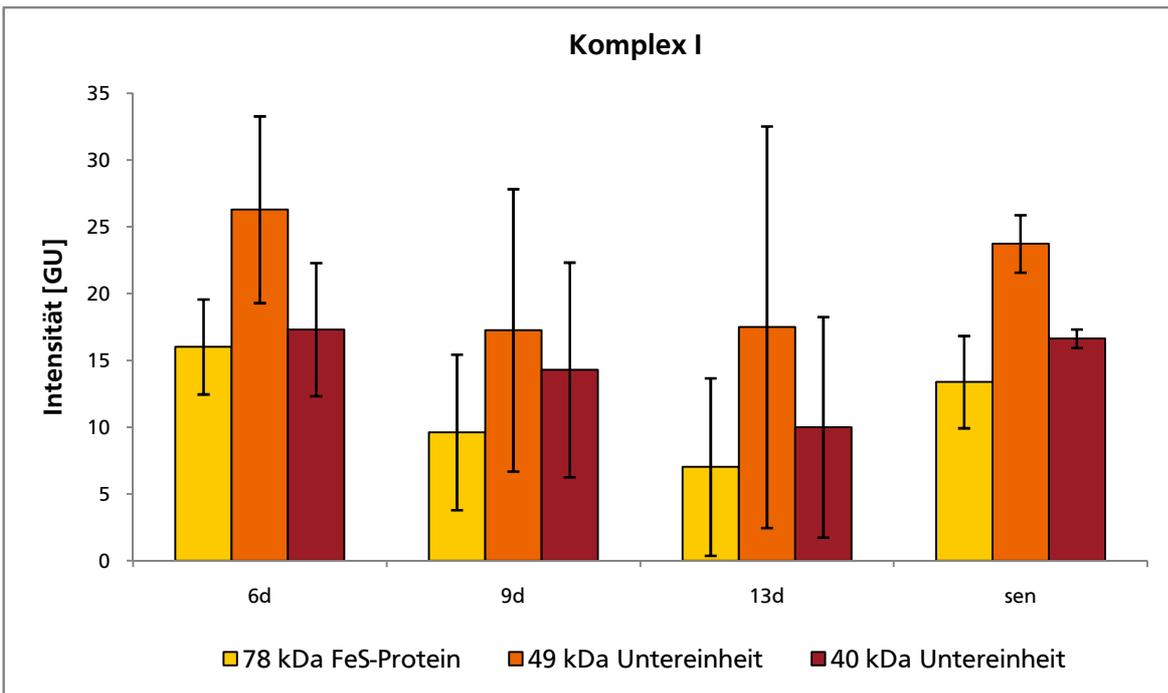


Abbildung 5.1.20 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von individuellem Komplex I in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. A Die Intensitäten der 49 kDa Untereinheit sind stets am größten, die des 78 kDa FeS-Proteins am geringsten. Während die drei Individuen der 6 Tage alten und seneszenten Kulturen recht einheitliche Intensitäten zeigen, ist die Intensität des 9 Tage alten Individuums mit der Kulturnummer #65 gegenüber den anderen beiden Individuen dieser Altersstufe deutlich erhöht und innerhalb der Gruppe der 13 Tage alten Kulturen kann eine Abnahme der Komplex I Menge von Probe #54 zu #57 festgestellt werden. B Die 9 und 13 Tage alten Kulturen scheinen etwas weniger individuellen Komplex I zu besitzen als die 6 Tage alten und seneszenten Proben. Aufgrund der durch die niedrigen Intensitäten von nur etwa 5 bis 25 GU bedingten hohen Standardabweichungen kann diesbezüglich jedoch keine klare Aussage getroffen werden.

bereits zu Anfang der Lebensspanne zu beobachten, die – wie schon bei der ATP-Synthase und den Komplexen III₂ und IV – von den seneszenten Kulturen nicht fortgeführt wird. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die andersartige Gewinnung der seneszenten Kulturen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den jüngeren Kulturen gewährleistet ist.

Das nur wenig individueller Komplex I detektiert werden kann deckt sich mit früheren Ergebnissen aus Rattenhirngewebe, wo der überwiegende Teil^[172, 173] oder sogar die komplette Komplex I Menge^[132] in Form von Superkomplexen vorliegt. Dies deckt sich weiterhin mit der Tatsache, dass Komplex III₂ für eine ausreichende Stabilisierung von Komplex I notwendig ist^[251-253] und vermutlich auch Komplex IV bei Assemblierung und Stabilität von Komplex I eine Rolle spielt^[254, 255]. Die Abnahme der Menge an individuellem Komplex I mit dem Alter ist schwer zu interpretieren, da dies natürlich einerseits – für den Fall, dass Komplex I überwiegend in Superkomplexen vorliegt – positiv zu sehen ist, da individuell vorliegender Komplex I vermutlich instabil und gegenüber des in Superkomplexen stabilisierten Komplexes weniger aktiv und leistungsfähig ist sowie vermutlich mehr reaktive Sauerstoffspezies produziert. Für den Energiehaushalt der Zelle ist somit das Vorliegen von möglichst wenig individuellem Komplex I vorteilhaft. Letztendlich ist aber die Gesamtmenge von Komplex I und vor allem die Verteilung dessen auf individuellen Komplex und Superkomplexe entscheidend, wie sie in Kapitel 5.1.5 diskutiert wird.

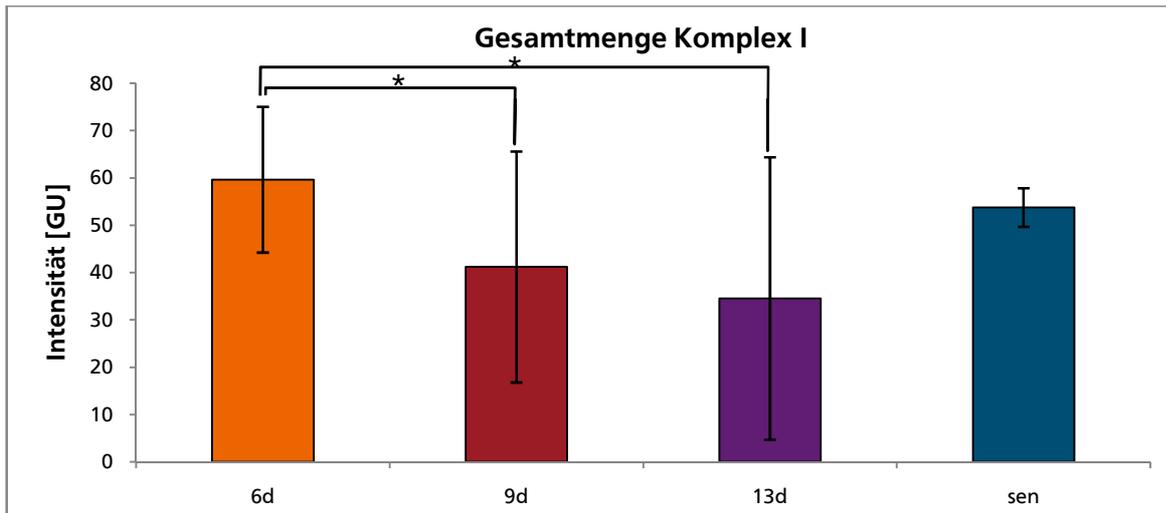


Abbildung 5.1.21 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge von individuellem Komplex I. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU. Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Menge an individuellem Komplex I um 31% von den 6 zu den 9 Tage alten ($p = 0,0305$) und um 42% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0305$). Die 16%-ige Abnahme von den 9 zu den 13 Tage alten Proben und die 56%-ige Zunahme von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen sind nicht statistisch signifikant. Es ist eine altersbedingte Abnahme der Menge an individuellem Komplex I bereits zu Anfang der Lebensspanne zu beobachten, die – wie schon bei der ATP-Synthase und den Komplexen III₂ und IV – von den seneszenten Kulturen nicht fortgeführt wird. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die andersartige Gewinnung der seneszenten Kulturen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den jüngeren Proben gegeben ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

5.1.1.5 Superkomplexe

Wie schon bei der Diskussion der quantitativen Ergebnisse für die Komplexe I, III₂ und IV erwähnt, können diese nicht nur individuell oder in Form von Homooligomeren sondern auch als spezifische Superkomplexe vorliegen. Bereits 1955 postulierten Chance & Williams^[256] das sogenannte "*steady state*" oder "*solid state*" Modell, nach dem die Atmungskettenkomplexe I bis IV geordnet vorliegen und spezifisch zu Superkomplexen zusammengelagert sind^[4]. Im Gegensatz dazu steht das von Hackenbrock *et al.* (1986)^[257] veröffentlichte "*Random Collision*" Modell, das davon ausgeht, dass die innere Mitochondrienmembran eine große Fluidität besitzt und dass die Proteinkomplexe und Redoxkomponenten der oxidativen Phosphorylierung unabhängig voneinander lateral in der Membran diffundieren. Der Elektronentransfer erfolgt nach diesem Modell durch zufällige Zusammenstöße der Komplexe I bis IV mit Ubichinon und Cytochrom *c*. Lange Zeit war das *Random Collision* Modell die in der Wissenschaft vorherrschende Meinung, basierend unter anderem auf der Isolierung funktionaler individueller Atmungskettenkomplexe^[258] und fehlender elektronenmikroskopischer Aufnahmen assoziierter Komplexe^[259]. Selbst die Isolierung erster stabiler Superkomplexe von Komplex III₂ und IV aus *Paracoccus denitrificans*^[215], dem thermophilen Bakterium PS3^[260] und dem ebenfalls thermophilen Archaeon *Sulfolobus* sp. strain 7^[261] konnte dies nicht

ändern, da dies als besondere Eigenart dieser beiden Reiche (*Bacteria* und *Archaea*) interpretiert wurde. Nichtsdestotrotz konnten Ragan & Heron^[262] bereits 1978 zeigen, dass die Elektronentransferrate rekonstituierter Atmungskettenproteine höher ist, wenn die Komplexe in einer bestimmten Stöchiometrie vorliegen und bei der Isolierung und Reinigung von Proteinkomplexen der oxidativen Phosphorylierung konnte schon in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts oft die Co-Isolierung mehrerer Komplexe beobachtet werden^[258, 262-267]. Während der letzten 10 bis 15 Jahre konnten schließlich immer mehr Belege für die Existenz spezifischer Superkomplexe erbracht werden, die das *solid state* Modell unterstützen. Die erste biochemische Charakterisierung von Superkomplexen gelang Cruciat *et al.* (2000)^[268], die in *Saccharomyces cerevisiae* einen aus einem Komplex III Homodimer und einer Kopie von Komplex IV bestehenden Superkomplex identifizieren konnten sowie Schägger & Pfeiffer (2000)^[4], die Superkomplexe mit einer Kopie von Komplex I, einem Homodimer von Komplex III und bis zu vier Kopien von Komplex IV in Rinderherzmitochondrien identifizieren konnten. Seitdem konnten Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung durch Verwendung von nativer Gelelektrophorese, Gelfiltration und Immunopräzipitation in vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen werden, darunter Bakterien wie *P. denitrificans*^[250], höhere Pflanzen^[197, 269, 270], verschiedene Säugetiere^[5, 271, 272] und auch die beiden filamentösen Pilze *Neurospora crassa*^[6] und *Podospira anserina*^[198, 219]. Die Existenz stöchiometrischer Superkomplexe wird jedoch noch immer kontrovers diskutiert. Als mögliche Vorteile von Superkomplexen gegenüber dem Vorliegen individueller Komplexe werden eine Steigerung der katalytischen Aktivität, Substratkanalisierung, Stabilisierung der individuellen Komplexe sowie die Verhinderung der Generierung reaktiver Intermediate diskutiert^[4]. Neuere Studien legen sogar eine weitere, übergeordnete Strukturierung der Superkomplexe in sogenannte Megakomplexe^[273] oder "respiratory strings"^[200, 218] nahe. Die am häufigsten identifizierten und am besten charakterisierten Superkomplexe sind III₂IV₁ und III₂IV₂ die beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae*^[4] vorkommen sowie I₁III₂ und I₁III₂IV₁₋₄ die unter anderem in *Arabidopsis thaliana* und Rinderherzmitochondrien nachgewiesen werden konnten^[4, 194, 197, 216, 269]. Auch der Superkomplex I₁IV₁ ohne Beteiligung von Komplex III₂ konnte bereits in verschiedenen Organismen nachgewiesen werden^[4, 6-8, 274, 275]. Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), die im Gegensatz zu den Komplexen I, III₂ und IV nicht als Protonenpumpe fungiert und das Schlüsselenzym des Citratzyklus darstellt^[276, 277], konnte bisher nicht als Bestandteil mitochondrialer Superkomplexe identifiziert werden^[4, 216, 268, 275, 278, 279], was auch mit den Ergebnissen von Bianchi *et al.* (2004)^[279] übereinstimmt, die kinetische Belege für die Unabhängigkeit von Komplex II liefern. Obwohl Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bisher in allen daraufhin untersuchten Organismen nachgewiesen werden konnten, ist die

Zusammensetzung der Atmungskette aus individuellen Komplexen und Superkomplexen Spezies- und oft auch gewebespezifisch. In Pflanzen ist der Superkomplex I₁III₂ der am häufigsten vorkommende^[194], während in Rinderherzmitochondrien vor allem I₁III₂IV₁ vorliegt^[213]. In *Saccharomyces cerevisiae*, die keinen Komplex I besitzt^[9-11], dominieren die Superkomplexe III₂IV₁ und III₂IV₂^[4]. Neuere Daten führen außerdem zu der Annahme, dass auch die Interaktionen der individuellen Komplexe innerhalb der Superkomplexe spezies- oder reichspezifisch sind^[213]. Neben den Wechselwirkungen der individuellen Komplexe untereinander spielt außerdem das Phospholipid Cardiolipin eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung von Superkomplexen, wie bereits für *Saccharomyces cerevisiae*^[280-282] und Patienten mit Barth-Syndrom^[283] nachgewiesen werden konnte. Daraus konnte geschlossen werden, dass Cardiolipin spezifisch für die Stabilisierung von Komplex III₂ und IV Interaktionen verantwortlich ist^[218].

Im Rahmen dieser Arbeit können auf den 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina* zwei Superkomplexe mit den Stöchiometrien I₁III₂IV₁ und I₁III₂IV₂ identifiziert werden, die in früheren Arbeiten mit b und c bezeichnet wurden, was auch hier übernommen werden soll. In der Dissertation von Krause (2004)^[1] konnte zusätzlich Superkomplex a (I₁III₂) bei *P. anserina* detektiert werden und auch der in *Saccharomyces cerevisiae* dominierende^[4] Superkomplex III₂IV₁, der unter anderem auch in Spinat^[197] und verschiedenen Geweben von *Rattus norvegicus*^[272] vorkommt, konnte von Krause in *P. anserina* identifiziert werden^[1]. Dabei stellt III₂IV₁ in Mitochondrien von seneszenten Wildtyp-Kulturen sogar den am häufigsten vorkommenden Superkomplex dar, während in den entsprechenden juvenilen Kulturen Superkomplex b (I₁III₂IV₁) dominiert und III₂IV₁ in wesentlich geringerer Menge vorliegt. Das genaue Alter der mit „juvenil“ und „seneszent“ bezeichneten Kulturen ist in der Dissertation von Krause (2004)^[1] nicht angegeben, was einen direkten Vergleich mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnen Daten schwierig macht. Allerdings stammt der von Krause verwendete Wildtyp ebenfalls aus dem Arbeitskreis von Prof. Osiewacz an der Goethe-Universität Frankfurt am Main, so dass zumindest in dieser Hinsicht eine Vergleichbarkeit gewährleistet ist. Da zum Zeitpunkt der Dissertation von Krause (2004)^[1] die Methode der quantitativen Fluoreszenzfärbung noch nicht im Arbeitskreis etabliert war, können diese Daten außerdem nur qualitativ betrachtet und auch nur qualitativ mit den in dieser Arbeit beschriebenen quantitativen Daten verglichen werden. In der Dissertation von Krause (2004)^[1] wurde außerdem die langlebige Mutante grisea untersucht, bei der eine Funktionsverlustmutation im für den Transkriptionsfaktor GRISEA codierenden Gen vorliegt. Das Fehlen dieses Transkriptionsfaktors führt wiederum dazu, dass das für einen Kupfer-Transporter codierende *PaCtr3*-Gen nicht exprimiert wird^[25, 26]. Da Kupfer ein Co-Faktor für die

Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) ist, führt die *Grisea*-Mutation zur Inaktivierung von Komplex IV^[27]. Die Lebensspanne dieser *Podospora*-Mutante ist um etwa 60% verlängert^[27]. Die in der Dissertation von Krause (2004)^[1] gezeigten silbergefärbten 2D-BN/SDS-Gele der *grisea*-Mutante von *P. anserina* zeigen, obwohl dort nicht diskutiert, ebenfalls Superkomplex III₂IV₁, wobei dessen Menge – und die Menge von Superkomplexen im Allgemeinen – durch die Zugabe von Kupfersulfat zum Kulturmedium deutlich erhöht werden konnte. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ebenfalls der im Arbeitskreis von Prof. Osiewacz kultivierte Wildtyp-Stamm von *P. anserina* analysiert wird, können die Superkomplexe I₁III₂ und III₂IV₁ auf keinem der fluoreszenz- oder silbergefärbten 2D-BN/SDS-Gele der zwölf Proben unterschiedlichen Alters (vgl. Tabelle 5.1.1) detektiert werden. Dies könnte zum einen mit den im Vergleich zu Krause (2004)^[1] harscheren Solubilisierungsbedingungen (Digitonin/Protein-Verhältnis 8:1 (w/w) anstatt 4:1 (w/w)) zusammenhängen oder andererseits auf eine Veränderung des *Podospora*-„Wildtyps“ aus dem Arbeitskreis von Prof. Osiewacz im Laufe der Zeit zurückzuführen sein, da die in der vorliegenden Arbeit analysierten Proben aus dem Jahr 2009 stammen, während die von Krause untersuchten Mitochondrien bereits 2003 oder früher isoliert wurden. Zusätzlich ist anzumerken, dass die Isolierung der in der vorliegenden Arbeit analysierten Mitochondrien in Anlehnung an Gredilla *et al.* (2006)^[130] erfolgte (vgl. Abschnitt 3.5.1), während die von Krause (2004)^[1] untersuchten Mitochondrien nach Krause *et al.* (2004)^[219] isoliert sowie zusätzlich mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gereinigt wurden.

Für die Quantifizierung der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) aus den 2D-BN/SDS-Gele werden das 78 kDa FeS-Proteins sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und Core Protein 1 und 2 von Komplex III₂ herangezogen, die alle in der Kern-DNA codiert sind^[6, 221, 238]. Da die entsprechenden Untereinheiten der individuellen Komplexe bereits durch Vergleich mit Daten von *Neurospora crassa* identifiziert wurden (vgl. Abschnitt 5.1.3 und 5.1.4) ist ihre Zuordnung innerhalb der Superkomplexe ebenfalls möglich. Untereinheiten von Komplex IV sind zwar ebenfalls vorhanden, was ja auch zur Identifizierung der beiden Superkomplexe als b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) beigetragen hat, zeigen jedoch nur geringe Intensitäten und sind schwerer eindeutig zu identifizieren, so dass sie nicht für die Quantifizierung der Superkomplexe herangezogen werden. Abbildung 5.1.22 zeigt auf einem Ausschnitt aus einem 2D-BN/SDS-Gel die für die Quantifizierung der Superkomplexe verwendeten Untereinheiten von Komplex I und III₂. Alle in diesem Kapitel dargestellten Daten sind auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normiert, die entsprechenden Daten für die anderen drei Normierungsmethoden finden sich im Anhang (Abschnitt A.1.5).

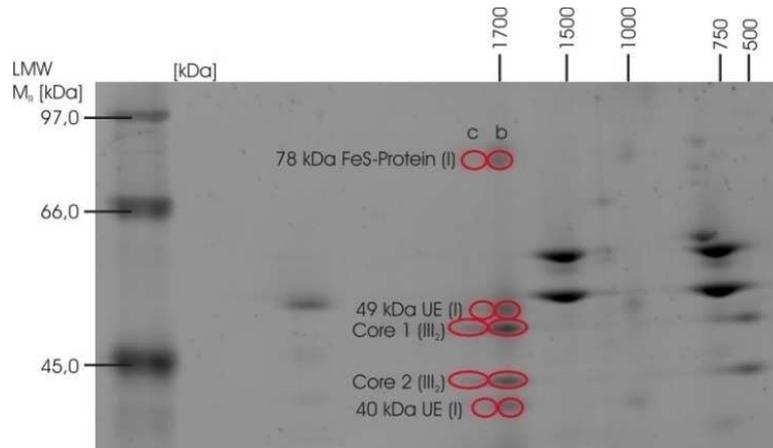
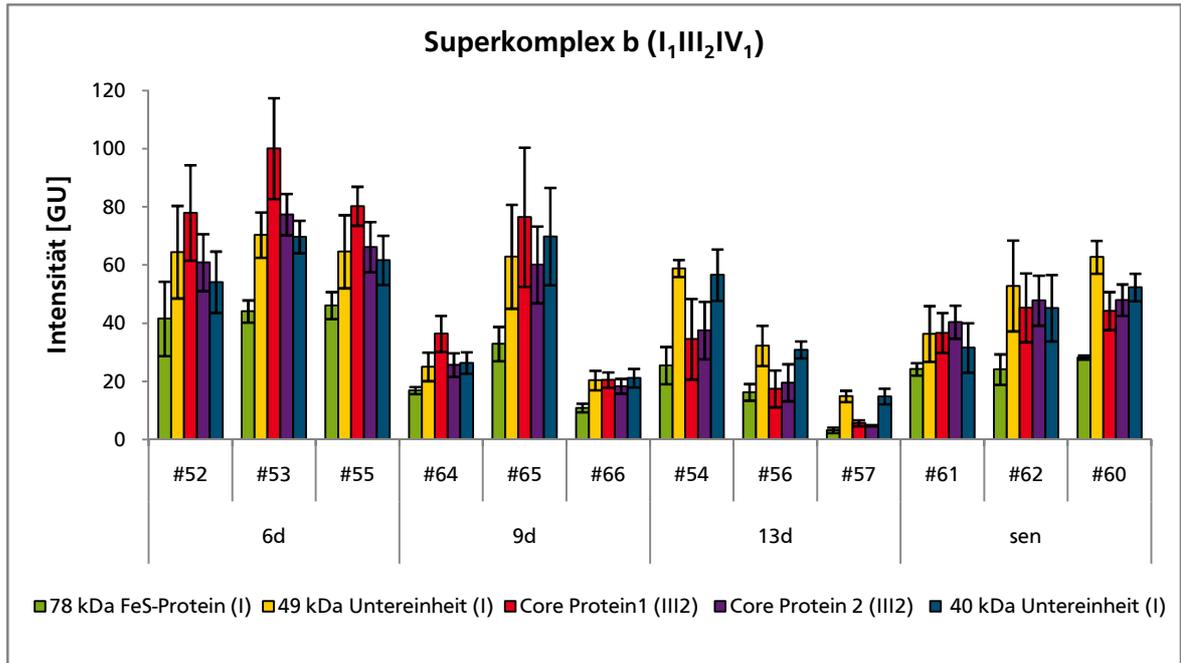


Abbildung 5.1.22 Ausschnitt aus einem SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52). Das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und Core Protein 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteile der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) sind rot markiert. Die mit Hilfe der Software Delta2D erhaltenen Intensitäten dieser Untereinheiten werden für die nachfolgende quantitative Analyse dieser beiden Superkomplexe in *P. anserina* verwendet.

Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂)

Abbildung 5.1.23 zeigt die Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteile der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) für alle zwölf Proben von *Podospora anserina* (siehe Tabelle 5.1.1). Superkomplex b (I₁III₂IV₁) liegt in allen Proben in deutlich größerer Menge – etwa um den Faktor 4 – vor als Superkomplex c (I₁III₂IV₂). Das Verhältnis von Superkomplex b zu c scheint dabei jeweils konstant zu bleiben. Bei den 6 Tage alten Individuen sind die Verhältnisse der Intensitäten für die einzelnen Untereinheiten recht konstant und bilden eine Art Pyramide, bei der das Core Protein 1 von Komplex III₂ die höchste Intensität besitzt. Auch untereinander zeigen die drei Individuen dieser Altersstufe sehr einheitliche Intensitäten. Beide Beobachtungen gelten für Superkomplex b und c gleichermaßen. Die Intensitäten der 9 und 13 Tage alten Individuen sind untereinander weniger konsistent als die 6 Tage alten oder seneszenten Kulturen. Bei den 13 Tage alten Proben zeigt sich – wie auch schon für die individuellen Komplexe I, III₂ und IV sowie die ATP-Synthase beobachtet – eine Abnahme der Intensität von Kultur #54 zu #57. Das 9 Tage alte Individuum mit der Kulturnummer #65 weist erneut eine gegenüber den anderen beiden Individuen dieser Altersstufe erhöhte Intensität auf. Auch diese Beobachtungen gelten für Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) gleichermaßen. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen zeigt sich bei den anderen drei Altersstufen eine leicht veränderte Zusammensetzung aus den fünf betrachteten Untereinheiten. Bei den 9 Tage alten Kulturen besitzt das Core Protein 1 von Komplex III₂ noch immer die höchste Intensität, jedoch ist die bei den 6 Tage alten Proben vorhandene Pyramiden-Form abhanden gekommen, da hier vor allem die 40 kDa Untereinheit von

A



B

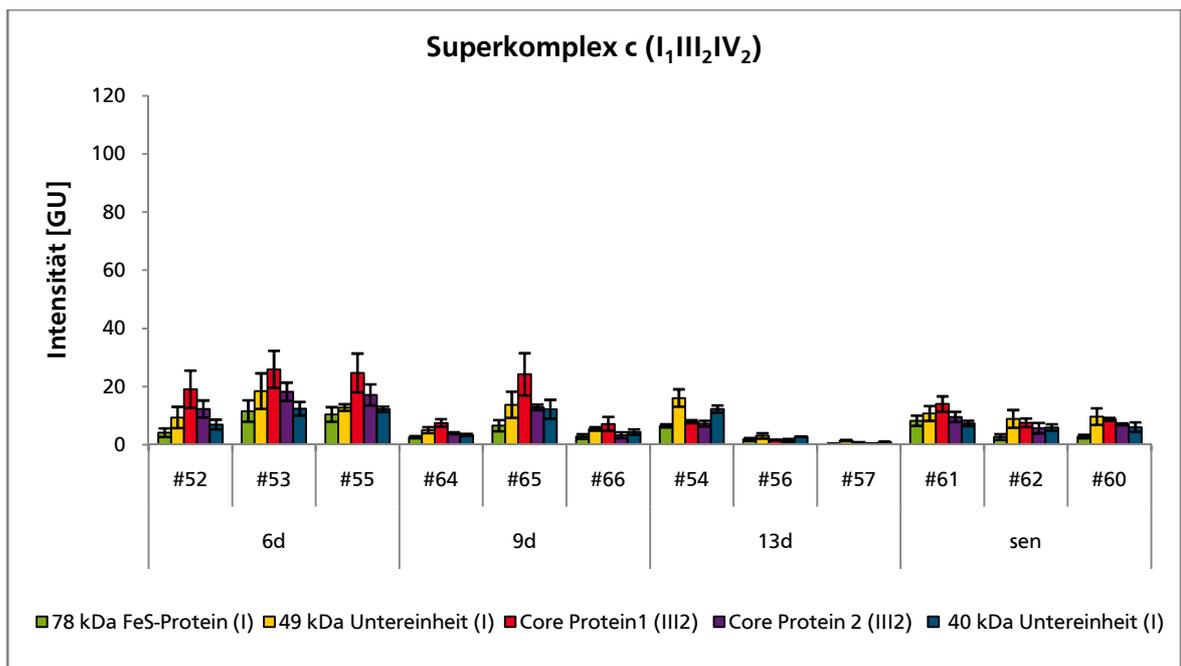


Abbildung 5.1.23 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteil der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) (A) und c ($I_1III_2IV_2$) (B) aller zwölf Proben von *Podospira anserina* (siehe Tabelle 5.1.1) in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für beide Diagramme der gleiche Maximalwert für die y-Achse gewählt. Da die Balken für Superkomplex c somit aber sehr klein werden sind dessen Intensitäten in Abbildung 5.1.23 C ein weiteres Mal dargestellt. Bei allen Proben liegt etwa 4-mal so viel Superkomplex b wie c vor, wobei das Verhältnis der beiden Superkomplexe jeweils recht konstant bleibt. Die Individuen der 6 Tage alten und seneszenten Kulturen zeigen untereinander sehr ähnliche Intensitäten, während bei den 13 Tage alten Proben die Intensität von Kultur #54 zu #57 abnimmt und das 9 Tage alte Individuum #65 eine wesentlich größere Intensität aufweist als die beiden anderen Individuen dieser Gruppe. Bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen weist stets das Core Protein 1 von Komplex III₂ die höchste Intensität auf, während dies bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben für die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I gilt.

C

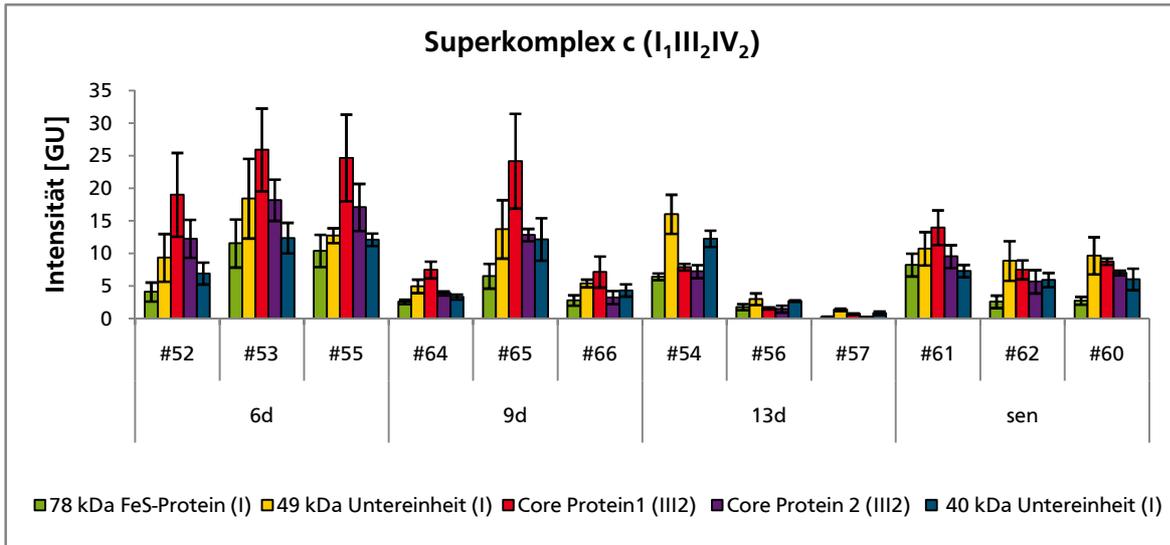
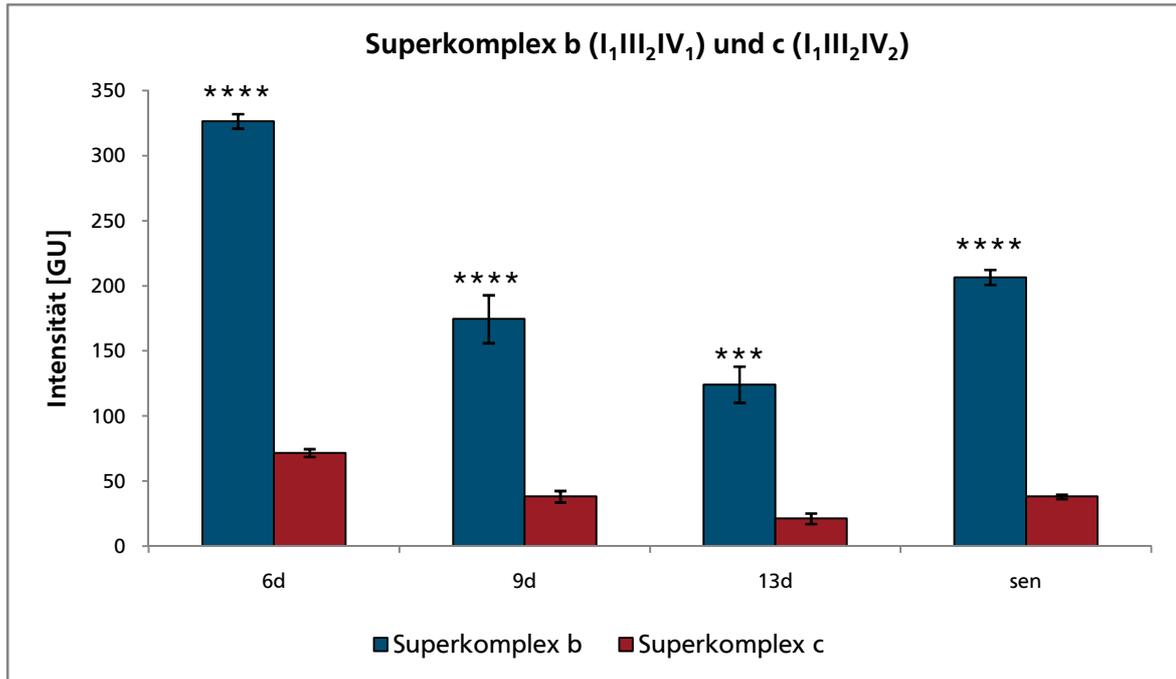


Abbildung 5.1.23 C Eine detaillierte Abbildungsbeschriftung befindet sich auf der vorhergehenden Seite.

Komplex I eine vergleichsweise größere Intensität aufweist. Bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben weisen die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I die höchsten Intensitäten auf, während das Core Protein 1 von Komplex III₂ nun nach der 78 kDa Untereinheit von Komplex I die zweitgeringste Intensität besitzt. Dies gilt für die 13 Tage alten Kulturen und die seneszenten Individuen #62 und #60 gleichermaßen für Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂), das seneszente Individuum mit der Kulturnummer #61 zeigt hingegen nur bei Superkomplex b dieses Verhalten, während für Superkomplex c die Pyramiden-Form der 6 Tage alten Kulturen zu erkennen ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese vermeintlichen Veränderungen der Zusammensetzung der Superkomplexe auf Ungenauigkeiten bei der quantitativen Auswertung mit der Software Delta2D zurückzuführen sind, da die Proteinbanden teilweise sehr dicht aneinander liegen und nur geringe Intensitäten aufweisen. Andererseits sind die Verhältnisse der Intensitäten innerhalb einer Altersstufe recht konstant und auch zwischen Superkomplex b und c stimmen diese größtenteils überein und zeigen keine zufällige Verteilung. Da auch die gezeigten Standardabweichungen zwischen den drei Gelreplikaten pro Probe nicht höher sind als bei der Quantifizierung der individuellen Komplexe oder der ATP-Synthase, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Daten ausreichend verlässlich und reproduzierbar sind. Um eine übersichtlichere Darstellung zu ermöglichen und da die Verhältnisse der einzelnen Untereinheiten, wie bereits erwähnt, zumindest innerhalb einer Gruppe weitestgehend konstant sind, werden die Intensitäten der fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III₂ aufaddiert und es wird jeweils der Mittelwert der drei Individuen pro Altersstufe gebildet. Die daraus resultierenden Intensitäten für die vier Gruppen sowie das jeweilige Verhältnis von Superkomplex b und c sind in Abbildung 5.1.24 dargestellt.

A



B

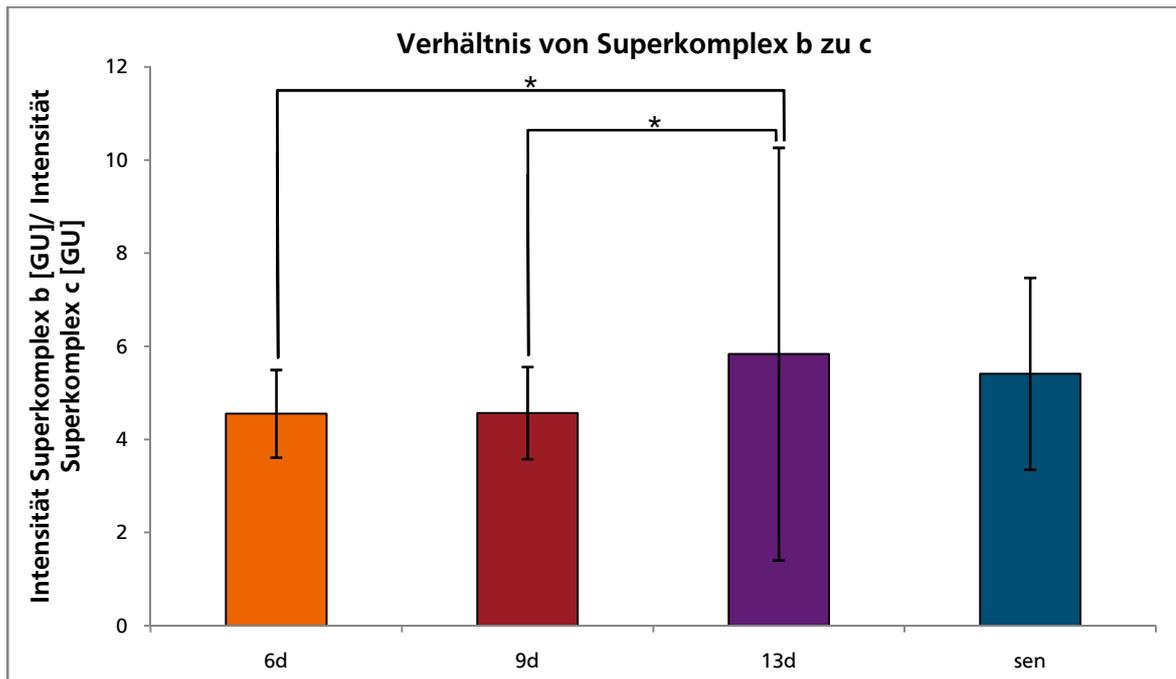


Abbildung 5.1.24 Altersabhängiger Vergleich von Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) (A) und Altersabhängigkeit des Verhältnisses der Intensitäten von Superkomplex b und c (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Die Intensitäten für die fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 wurden addiert und die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe gemittelt. Bei allen Altersstufen liegt deutlich mehr Superkomplex b als c vor und der Unterschied der aufsummierten Intensitäten ist dabei innerhalb einer Gruppe stets statistisch signifikant (6d, 9d, sen: $p < 0,001$; 13d: $p < 0,005$). Die 6 Tage alten Kulturen scheinen insgesamt mehr Superkomplexe zu besitzen, als die anderen drei Altersstufen. (B) Verhältnis der Intensitäten von Superkomplex b zu c bei den vier Altersstufen. Gezeigt ist der Mittelwert für die drei Individuen pro Altersstufe, die Werte basieren auf der Summe der fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 . Es zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Verhältnisses von Superkomplex b zu c um jeweils 28% von den 6 bzw. 9 Tage alten zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0380$ bzw. $0,0243$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

In Abbildung 5.1.24 A lässt sich nochmals eindeutig erkennen, dass bei allen vier Altersstufen jeweils deutlich mehr Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) als c ($I_1III_2IV_2$) vorliegt. Der Unterschied der aufsummierten Intensitäten für Superkomplex b und c innerhalb einer Gruppe ist dabei stets statistisch signifikant (6d, 9d, sen: $p < 0,001$; 13d: $p < 0,005$). Die 6 Tage alten Kulturen besitzen offensichtlich eine größere Menge an beiden Superkomplexen, als die drei anderen Altersstufen. Dies wird anhand der Gesamtmenge der Superkomplexe in Abbildung 5.1.25 ausführlich diskutiert. Das Verhältnis von Superkomplex b zu c ist für alle Altersstufen größer 4, so dass Superkomplex b mit einer Kopie von Komplex I einem Homodimer von Komplex III und einer Kopie von Komplex IV stets dominiert. Dies stimmt zum Teil mit den Daten aus der Dissertation von Krause (2004)^[1] überein, wo in juvenilen Wildtyp-Kulturen von *Podospora anserina* ebenfalls Superkomplex b vorherrscht, in seneszenten Kulturen allerdings III_2IV_1 den am häufigsten vorkommenden Superkomplex darstellt, der in der vorliegenden Arbeit gar nicht identifiziert werden konnte. Für die 6 und 9 Tage alten Kulturen ist das Verhältnis der beiden Superkomplexe mit 4,55 und 4,57 nahezu gleich groß, während es bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mit 5,84 und 5,41 deutlich höher liegt. Dabei ist aber nur die jeweils 28%-ige Zunahme von den 6 bzw. 9 Tage alten zu den 13 Tage alten Kulturen statistisch signifikant ($p = 0,0380$ bzw. $0,0243$) und das Verhältnis von Superkomplex b zu c weist bei den 13 Tage alten Proben eine sehr große Standardabweichung auf. Nichtsdestotrotz ist eine signifikante Zunahme der Menge an Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) im Vergleich zu Superkomplex c ($I_1III_2IV_2$) gegen Ende der Lebensspanne hin zu verzeichnen. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass die Menge an individuellem Komplex IV Monomer von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ebenfalls um 44% abnimmt (vgl. Abbildung 5.1.15), so dass in älteren *Podospora*-Kulturen vermehrt Superkomplex b mit nur einer anstatt zwei Kopien von Komplex IV gebildet wird. Welche Auswirkungen dies auf den Energiemetabolismus hat ist schwer zu beurteilen, da nicht geklärt ist, welcher Superkomplex bei *Podospora anserina* der in Hinsicht auf Substratkanalisierung, Enzymaktivitätssteigerung etc. effektivste ist. Allerdings zeigten Schäfer *et al.* (2006)^[274] in Rinderherzmitochondrien, dass die Aktivität von Komplex I in Superkomplex a (I_1III_2) nur halb so groß ist wie in Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) und auch die Komplex III_2 -Aktivität in Superkomplex a wesentlich geringer ist als in Superkomplex b. Wernicke *et al.* (2010)^[284] konnten dies für die Komplex I-Aktivität eines Parkinson-Modells in Ratten bestätigen und Frenzel *et al.* (2010)^[172] ermittelten ebenfalls $I_1III_2IV_1$ als den Superkomplex mit der höchsten Komplex I-Aktivität (analysiert: $I_1III_2IV_{0.3}$) in Rattencortex. Nimmt man an, dass diese für Säuger gewonnenen Ergebnisse auch für den filamentösen Pilz *Podospora anserina* gültig sind, wäre zu erwarten, dass die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelte starke Abnahme der Menge an Superkomplex b bei den 13 im Vergleich zu den

6 Tage alten Kulturen sowie die Zunahme des Verhältnisses von Superkomplex b zu c schwerwiegende Auswirkungen auf den Energiemetabolismus des Organismus hat. Um dies besser beurteilen zu können, sollten weiterführende Studien die Aktivität der Atmungskettenkomplexe in ihrer individuellen Form sowie in den verschiedenen Superkomplexen berücksichtigen. Zur noch jungen Theorie der sogenannten *respiratory strings*^[200, 218] können die hier gewonnenen Daten zunächst nicht beitragen, da für Säugetiere der Aufbau aus I₁III₂IV₄- und III₂IV₄-Einheiten^[200] und für Pflanzen (Kartoffel) I₂III₂IV₂ als Grundeinheit^[273] postuliert wird, die bei *P. anserina* alle nicht detektiert werden konnten.

Gesamtmenge der Superkomplexe

Abbildung 5.1.25 zeigt die Gesamtmenge an Superkomplexen bei den vier Altersstufen von *Podospora anserina*. Dafür wurden die Intensitäten für Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) addiert. Wie bereits anhand von Abbildung 5.1.24 A zu erwarten, besitzen die 6 Tage alten Kulturen am meisten Superkomplexe und es lassen sich statistisch signifikante Abnahmen um 47% (6d:9d, p = 0,0071), 63% (6d:13d, p = 0,0007) und 39% (6d:sen, p = 0,0017) feststellen. Am wenigsten Superkomplexe besitzen dabei die 13 Tage alten Kulturen, von denen aus ein statistisch signifikanter Anstieg der Superkomplex-Menge um 68% (p = 0,0305) zu den seneszenten Proben zu beobachten ist. Damit enthalten die seneszenten nach den 6 Tage alten Kulturen am zweitmeisten Superkomplexe und führen den Trend einer Abnahme der Superkomplex-Menge mit dem Alter nicht fort. Dieses Verhalten war auch schon bei der quantitativen Analyse der individuellen Atmungskettenkomplexe (vgl. 5.1.2 bis 5.1.4) und der ATP-Synthase (vgl. 5.1.1) zu beobachten und ist vermutlich auf die andersartige Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen zurückzuführen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1), wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den 6, 9 und 13 Tage alten Proben gegeben ist.

Eine Abnahme der Superkomplex-Menge mit dem Alter könnte erhebliche Auswirkungen auf den Energiehaushalt einer Zelle und die Produktion reaktiver Nebenprodukte haben, da die Aufgaben spezifischer Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe neben Stabilisierung der individuellen Komplexe – speziell Komplex I^[238, 250-252] – und Steigerung der katalytischen Aktivität insbesondere auch Substratkanalisierung und die Verhinderung der Bildung reaktiver Intermediate umfassen^[4]. Frenzel *et al.* (2010)^[172] stellten ebenfalls eine 1,6-fache Abnahme der Gesamtmenge der Superkomplexe I₁III₂IV_{0.3} (a-d) in Rattencortex fest. Die Abnahme für die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) betrug dabei 31% bzw. 41%. Andere Hirnareale zeigen jedoch teilweise sehr unterschiedliche Ergebnisse^[207]. Da das

Phospholipid Cardiolipin eine essentielle Rolle bei der Stabilisierung von Superkomplexen^[218, 280-283] – insbesondere der Komplex III₂ und IV Interaktionen^[218] – spielt, ist eine ergänzende Analyse der Cardiolipin-Menge sinnvoll. Dies wurde in der Diplomarbeit von Saager (2010)^[129] mit den selben Proben, die für die hier diskutierte quantitative Analyse der Atmungskettenkomplexe und Superkomplexe verwendet werden (siehe Tabelle 5.1.1), durchgeführt. Die Lipide wurden nach Appel (2008)^[285] basierend auf Bligh & Dyer (1959)^[286] isoliert und die Lipidzusammensetzung mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Nach Färbung mit Kupfersulfat-Phosphorsäure-Reagenz und anschließender Veraschung können die einzelnen Lipidklassen densitometrisch quantifiziert werden. Neben Cardiolipin konnte Saager in ihrer Diplomarbeit^[129] Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylinositol in den Mitochondrienmembranen von *P. anserina* detektieren und quantifizieren. Bei allen vier Altersstufen ist Cardiolipin nur in geringen Mengen vorhanden und seine Menge – angegeben in nmol Phosphat pro mg Protein – verändert sich mit dem Alter nicht. Auch der prozentuale Anteil des Cardiolipins an den betrachteten Lipiden verändert sich nach den Daten von Saager (2010)^[129] kaum. Somit scheint bei *P. anserina* kein Zusammenhang zwischen der altersabhängigen Abnahme der Superkomplex-Menge und der Cardiolipin-Menge zu bestehen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse von Saager (2010)^[129] sich auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1) beziehen, da zum Zeitpunkt der Anfertigung der Diplomarbeit nur diese zur Verfügung stand. Eine direkte Vergleichbarkeit mit den in der vorliegenden Arbeit auf Basis der Menge an Porin der äußeren Mitochondrienmembran diskutierten Daten ist somit nicht gegeben. Desweiteren postuliert die sogenannte „*membrane pacemaker*“ („Membran-Schrittmacher“) Theorie des Alterns – eine Erweiterung der Theorie der Freien Radikale – eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung von Lipiden mit dem Alter, was eine große Rolle bei der Lipidperoxidation und somit auch beim Alternsprozess spielt^[287]. Tatsächlich erkannten Lewin & Timiras bereits 1984, dass sich die Fettsäurezusammensetzung von Lipiden – darunter auch Cardiolipin – mit dem Alter verändert^[288]. Neuere Studien zeigen beispielsweise eine Zunahme ungesättigter Fettsäuren beim Cardiolipin des Rattenherzens, wobei die Menge an Cardiolipin jedoch konstant bleibt^[289] sowie eine veränderte Fettsäurezusammensetzung bei Patienten mit Barth-Syndrom, die entsprechend auch destabilisierte Superkomplexe aufweisen^[283]. Eine ergänzende Analyse der altersabhängigen Fettsäurezusammensetzung von *Podospira anserina* Cardiolipin ist somit für ein besseres Verständnis der hier beobachteten altersabhängigen Abnahme der Superkomplex-Menge wünschenswert.

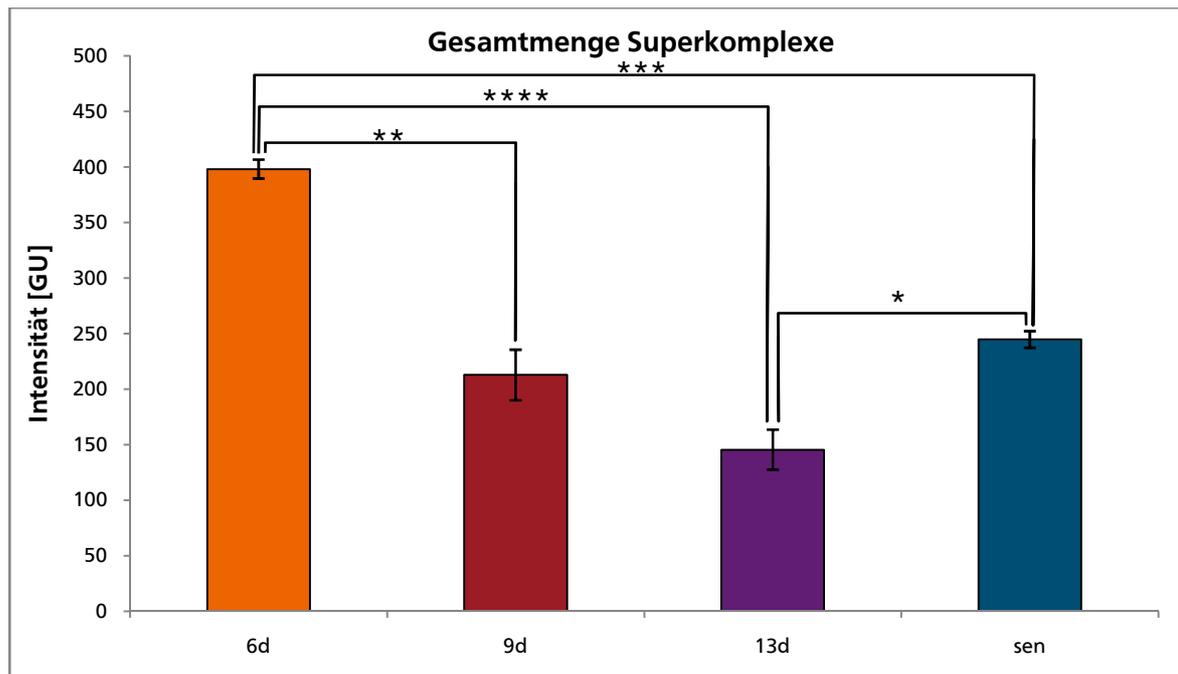


Abbildung 5.1.25 Altersabhängige Intensitäten der Gesamtmenge an Superkomplexen, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Die 6 Tage alten Kulturen besitzen am meisten Superkomplexe und es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme zu den 9 (-47%, $p = 0,0071$) und 13 Tage alten (-63%, $p = 0,0007$) sowie seneszenten (-39%, $p = 0,0017$) Proben. Am wenigsten Superkomplexe besitzen die 13 Tage alten Kulturen. Von diesen zu den seneszenten Proben erfolgt ein statistisch signifikanter Anstieg um 68% ($p = 0,0305$), so dass die seneszenten nach den 6 Tage alten Kulturen am zweitmeisten Superkomplexe besitzen. Damit führen die seneszenten Kulturen einmal mehr den Trend einer altersabhängigen Abnahme nicht fort, was höchstwahrscheinlich auf ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen ist, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den 6, 9 und 13 Tage alten Proben gegeben ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Gesamtmenge individueller Komplex + Superkomplexe für die Komplexe III_2 und I

Mit Hilfe der quantitativen Daten für die Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) können zusätzlich die Gesamtmenge der Komplexe I und III_2 als individuelle Komplexe und als Bestandteil von Superkomplexen sowie die prozentuale Verteilung auf die verschiedenen Formen berechnet werden. Da Untereinheiten von Komplex IV in den Superkomplexen nur geringe Intensitäten zeigen und schwer eindeutig zu identifizieren sind, werden sie nicht für die Quantifizierung der Superkomplexe herangezogen und es ist folglich auch keine Berechnung der Gesamtmenge von Komplex IV inklusive der Komplex IV-enthaltenden Superkomplexe und der prozentuale Verteilung des Komplexes auf diese verschiedenen Formen möglich.

Gesamtmenge Komplex III₂ inklusive Superkomplexe

In Abbildung 5.1.26 A ist die Gesamtmenge von Komplex III₂, bestehend aus der Summe der Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) dargestellt. Zum besseren Vergleich ist in Abbildung 5.1.26 B zusätzlich nochmals die Gesamtmenge von individuellem Komplex III₂ ohne Berücksichtigung der Superkomplexe gezeigt (siehe auch Abbildung 5.1.18). Beide Diagramme zeigen ein nahezu identisches Bild. Wie individueller Komplex III₂ nimmt auch die Gesamtmenge dieses Komplexes von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen stark ab, während die seneszenten Proben in etwa die gleiche Menge an Komplex III₂ aufweisen wie die 9 Tage alten Kulturen. Die 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen besitzen nur noch 23% der Komplex III₂-Gesamtmenge der 6 Tage alten Proben ($p = 0,0003$); bei individuellem Komplex III₂ sind es 21% ($p = 0,0003$). Bezogen auf die Gesamtmenge von Komplex III₂ inklusive seinem Vorliegen in Superkomplexen besitzen die 9 Tage alten Kulturen noch 53% der Komplex III₂-Gesamtmenge der 6 Tage alten Proben ($p = 0,0071$); bei individuellem Komplex III₂ sind es 56% ($p = 0,0118$). Die auf andere Weise als die jüngeren Proben gewonnenen seneszenten Kulturen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) setzen diesen Trend einer Abnahme der Gesamtmenge von Komplex III₂ wie bereits erwähnt nicht fort, sondern besitzen in etwa so viel Komplex III₂ wie die 9 Tage alten Proben. Dies ist durch einen statistisch signifikanten Anstieg um 134% ($p = 0,0041$; individueller Komplex III₂ 144%, $p = 0,0041$) von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen gekennzeichnet. Die Komplex III₂ Gesamtmenge zeigt somit unabhängig vom Vorliegen des Komplexes als individuelles Homodimer oder Bestandteil eines der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) oder c (I₁III₂IV₂) die gleiche altersabhängige Abnahme. Dieses Ergebnis geht konform mit der ebenfalls altersabhängigen Abnahme der Superkomplex-Menge (vgl. Abbildung 5.1.25). Dabei scheint stets der gleiche Anteil von Komplex III₂ individuell bzw. in Form von Superkomplexen vorzuliegen. Um dies zu überprüfen ist in Abbildung 5.1.27 die prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer, Superkomplex b und Superkomplex c gezeigt. Es lässt sich erkennen, dass sich die prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf die drei in der vorliegenden Arbeit vorkommenden und betrachteten Formen im Verlauf des Alterns tatsächlich kaum verändert. Im Mittel liegen 43% als individueller Komplex III₂, 47% als Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und 10% als Superkomplex c (I₁III₂IV₂) vor. Bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen von *P. anserina* zeigt sich jedoch eine leichte Verschiebung zugunsten von Superkomplex b. Während bei den 6 und 9 Tage alten Proben nahezu der gleiche Prozentsatz von Komplex III₂ in Form von individuellem Komplex und Superkomplex b vorliegt, verzeichnet der Superkomplex bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen im Mittel 9 Prozentpunkte mehr als der individuelle Komplex III₂.

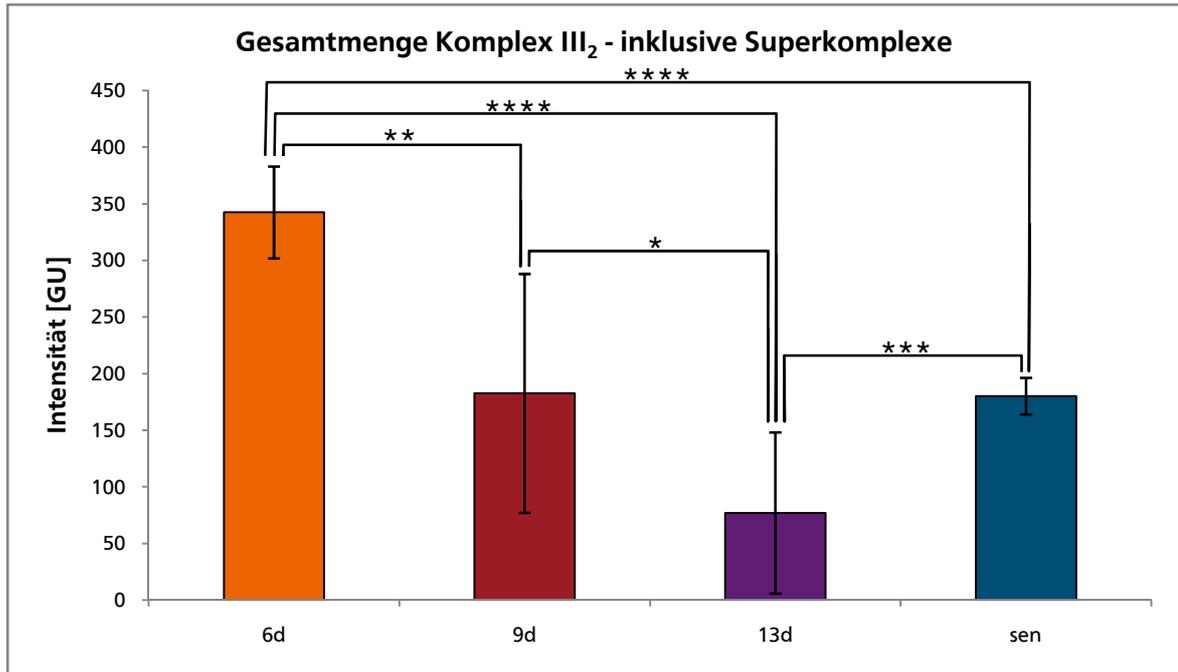
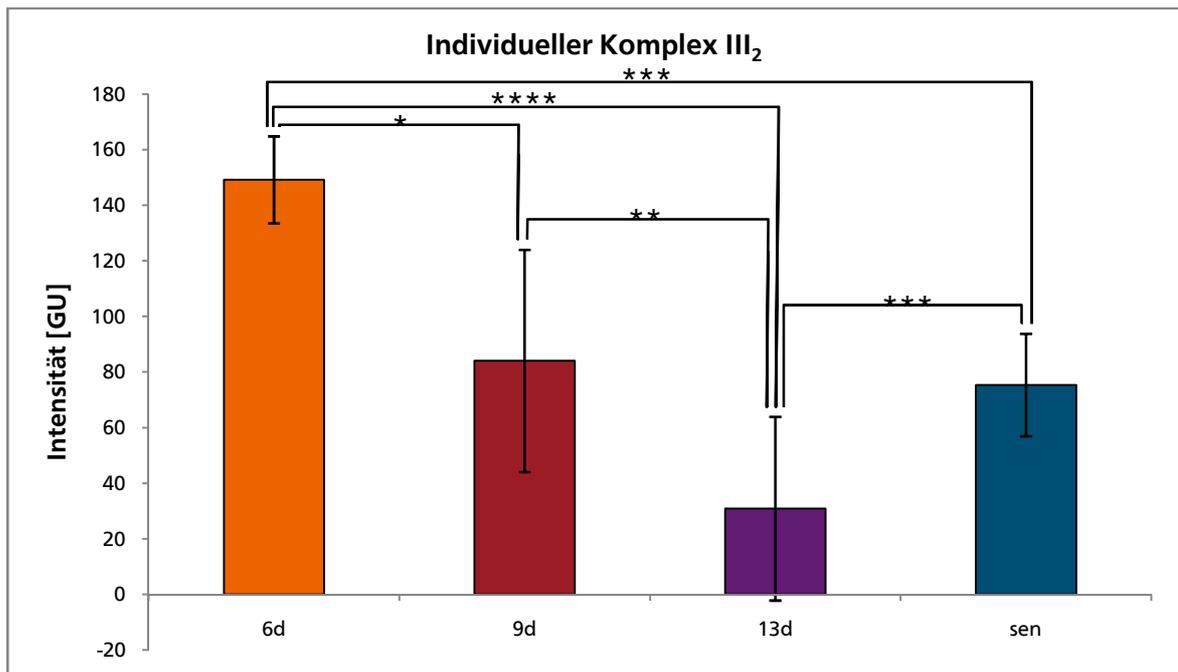
A**B**

Abbildung 5.1.26 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge von Komplex III₂, bestehend aus der Summe der Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) (**A**) sowie Summe der Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von individuellem Komplex III₂ in GU (**B**). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (**A**) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge sowohl von den 6 zu den 9 Tage alten (-47%, p = 0,0071) als auch von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen (-58%, p = 0,0305). Auch die 77%-ige Abnahme von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen ist statistisch signifikant (p = 0,0003). Für **B** zeigt sich ein nahezu identisches Bild. Von den 6 zu den 9 Tage alten Kulturen nimmt die Menge an individuellem Komplex III₂ um 44% ab (p = 0,0118), von den 9 zu den 13 Tage alten um 63% (p = 0,0092). Auch die 79%-ige Abnahme von den 6 zu den 13 Tage alten Individuen ist statistisch signifikant (p = 0,0003). Die seneszenten Kulturen führen den Trend einer graduellen Abnahme der Komplex III₂ Menge weder bei **A** noch bei **B** fort. Daraus ergibt sich eine Zunahme um 134% bzw. 144% von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen (jeweils p = 0,0041). (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,005, **** p < 0,001)

Wie bereits in Kapitel 5.1.3 erwähnt, trägt Komplex III₂ zusammen mit den Komplexen I und IV zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran bei, mittels dessen die ATP-Synthase angetrieben wird^[181]. Eine Abnahme der Komplex III₂ Menge – vor allem in Kombination mit einer gleichzeitigen Abnahme von Komplex I und IV – könnte zu einem verringerten elektrochemischen Gradienten und somit zu verminderter ATP-Synthese führen, was ein Energiedefizit für die gesamte Zelle nach sich zieht. Die prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer und die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) ändert sich zwar nicht maßgeblich mit dem Alter, allerdings liegen dadurch in älteren *Podospora*-Kulturen aber auch insgesamt weniger Superkomplexe vor. Wie bereits vorher diskutiert, könnte eine Abnahme der Superkomplex-Menge mit dem Alter erhebliche Auswirkungen auf den Energiehaushalt einer Zelle und die Produktion reaktiver Nebenprodukte haben, da Superkomplexe für die Stabilisierung der individuellen Komplexe – insbesondere Komplex I^[238, 250-252] – wichtig sind und außerdem zur Steigerung der katalytischen Aktivität beitragen und durch Substratkanalisierung die Bildung reaktiver Intermediate vermindern^[4]. Bei Krause (2004)^[1] liegen in juvenilen *Podospora*-Kulturen etwa 50% der Gesamtmenge von Komplex III₂ in den Superkomplexen a-c (I₁III₂IV₀₋₂) vor, während in seneszenten Kulturen individueller Komplex III₂ überwiegt. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten konnte Krause (2004)^[1] also eine altersabhängige Veränderung der prozentualen Verteilung feststellen. Wie hier beschrieben fand Krause (2004)^[1] jedoch auch eine generelle Abnahme^[1] des Gehalts an den Atmungskettenkomplexen I, III₂, IV und V (ATP-Synthase) in seneszenten, verglichen mit juvenilen Kulturen.

Gesamtmenge Komplex I inklusive Superkomplexe

In Abbildung 5.1.28 A ist die Gesamtmenge von Komplex I, bestehend aus der Summe der Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) dargestellt. Zum besseren Vergleich ist in Abbildung 5.1.28 B zusätzlich nochmals die Gesamtmenge von individuellem Komplex I ohne Berücksichtigung der Superkomplexe gezeigt (siehe auch Abbildung 5.1.21). Es zeigt sich zunächst ein ähnliches Bild auf beiden Diagrammen, allerdings nimmt die Gesamtmenge von Komplex I mit Berücksichtigung der Superkomplexe b und c im Verlauf des Alterns etwas stärker ab als die Menge an individuellem Komplex I. In beiden Fällen besitzen die 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen am wenigsten Komplex I. Für die Gesamtmenge von Komplex I sind es 49% weniger ($p = 0,0041$) als bei den 6 Tage alten Kulturen, für individuellen Komplex I 42% ($p = 0,0305$). Von den 6 zu den 9 Tage alten Proben ist eine Abnahme der Komplex I Menge um 41% ($p = 0,0092$), verglichen mit 31%

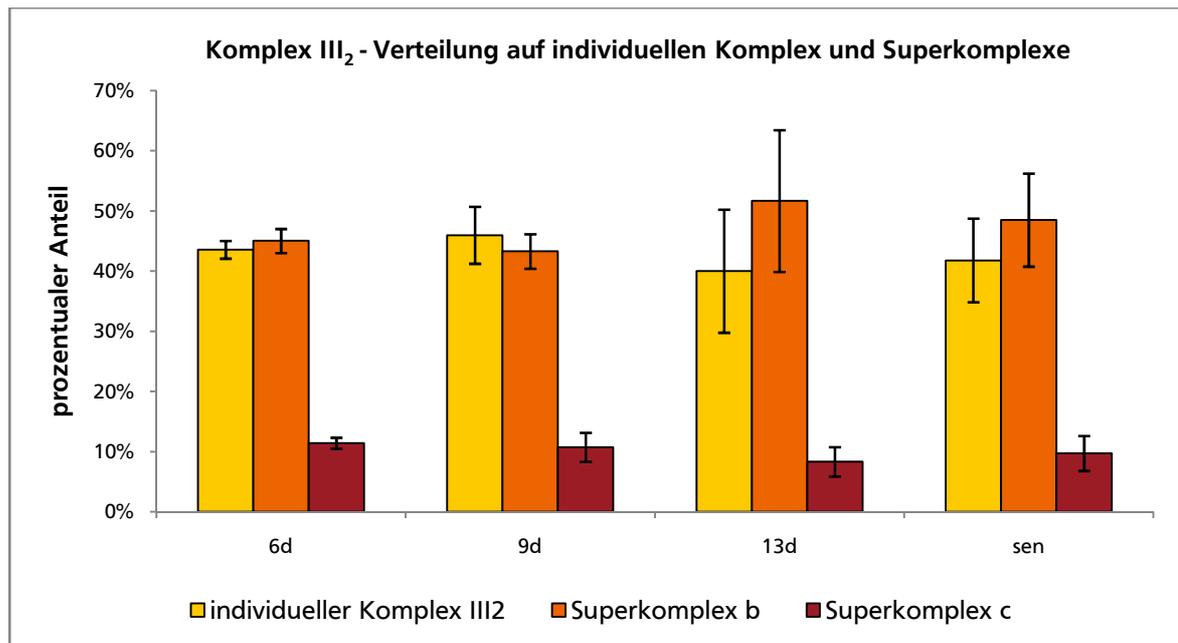


Abbildung 5.1.27 Altersabhängige prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer sowie Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Es zeigt sich kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung von Komplex III₂ auf die drei in der vorliegenden Arbeit vorkommenden und analysierten Formen mit dem Alter. Im Mittel liegen 43% von Komplex III₂ als individuelles Homodimer, 47% in Superkomplex b und 10% in Superkomplex c vor. Es zeigt sich jedoch eine leichte Verschiebung zugunsten von Superkomplex b bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen. Während bei den 6 und 9 Tage alten Proben nahezu der gleiche Prozentsatz von Komplex III₂ in Form von individuellem Komplex und Superkomplex b vorliegt, verzeichnet der Superkomplex bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen im Mittel 9 Prozentpunkte mehr als individueller Komplex III₂.

beim individuellen Komplex I ($p = 0,0305$) zu verzeichnen. Die seneszenten Kulturen besitzen sowohl bei Betrachtung der Gesamtmenge als auch bei individuellem Komplex I nach den 6 Tage alten Proben am zweitmeisten Komplex I. Doch während sie bei individuellem Komplex I nahezu die gleiche Menge, wie die 6 Tage alten Kulturen besitzen (-10%, statistisch nicht signifikant), sind es bei der Gesamtmenge inklusive der Superkomplexe b und c 27% weniger ($p = 0,0031$). Das die seneszenten Kulturen den von den jüngeren Proben gezeigten Trend nicht fortführen, ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit für die gesamte quantitative Analyse der Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe von *Podospora anserina* charakteristisch und mit großer Wahrscheinlichkeit auf die andersartige Gewinnung der seneszenten Kulturen zurückzuführen (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1). Im Gegensatz zu Komplex III₂ nimmt die Menge an Komplex I bereits am Anfang der Lebensspanne recht stark ab, da bei den 9 und 13 Tage alten Kulturen nahezu die gleiche Menge an Komplex I vorliegt, während die Komplex III₂ Menge sukzessive von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen abnimmt (vgl. Abbildung 5.1.26). Wie schon Komplex III₂ zeigt jedoch auch die Gesamtmenge von Komplex I unabhängig vom Vorliegen als individueller Komplex oder Bestandteil eines der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) die gleiche altersabhängige Abnahme. Dieses

Ergebnis geht wiederum konform mit der ebenfalls altersabhängigen Abnahme der Superkomplex-Menge (vgl. Abbildung 5.1.25). Wie schon bei Komplex III₂ scheint auch bei Komplex I stets der gleiche Anteil individuell bzw. in Form von Superkomplexen vorzuliegen. Um dies zu überprüfen ist in Abbildung 5.1.29 die prozentuale Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex, Superkomplex b (I₁III₂IV₁) und Superkomplex c (I₁III₂IV₂) gezeigt. Wie schon bei Komplex III₂ zeigt sich auch bei Komplex I keine signifikante Veränderung der Verteilung auf individuellen Komplex und die Superkomplexe b und c mit dem Alter. Im Mittel liegen 26% der Komplex I Gesamtmenge als individueller Komplex, 63% als Superkomplex b und 11% als Superkomplex c vor. In Übereinstimmung mit den Daten für Komplex III₂ (vgl. Abbildung 5.1.27) liegt auch bei Komplex I der geringste Prozentsatz als Superkomplex c (I₁III₂IV₂) vor. Anders als bei Komplex III₂ verteilen sich die restlichen Prozente jedoch nicht nahezu gleich auf individuellen Komplex und Superkomplex b (I₁III₂IV₁), sondern letzterer enthält mit im Mittel 63% den Großteil der Gesamtmenge an Komplex I. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen kann man bei den älteren Proben einen leichten Anstieg des Prozentsatzes an freiem Komplex I von 23% bei den 6 Tage alten auf im Mittel 27% bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben feststellen, der jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Wie Komplex III₂ trägt auch Komplex I zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran bei, mittels dessen die ATP-Synthase angetrieben wird^[181]. Die Abnahme der Komplex I Gesamtmenge mit dem Alter in Kombination mit der ebenfalls festgestellten Abnahme der Mengen von Komplex III₂ (vgl. Abbildung 5.1.26) und – wenn auch weniger stark – Komplex IV (vgl. Abbildung 5.1.15) könnte somit ein verringertes elektrochemisches Potential und daraus resultierend eine verminderte ATP-Synthese nach sich ziehen, was ein Energiedefizit für die gesamte Zelle, gegebenenfalls aber auch eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies bedeuten würde. In Übereinstimmung mit den Daten für Komplex III₂ ändert sich die Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex und die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) zwar nicht maßgeblich mit dem Alter, allerdings liegen dadurch in älteren *Podospira*-Kulturen auch insgesamt weniger Superkomplexe vor. Wie ebenfalls bereits früher diskutiert sind Superkomplexe für die Stabilisierung der individuellen Atmungsketten Komplexe – insbesondere Komplex I^[238, 250-252] – wichtig, tragen zur Steigerung der katalytischen Aktivität bei und können durch Substratkanalisierung die Bildung reaktiver Intermediate vermindern^[4]. Eine Abnahme der Superkomplex-Menge mit dem Alter könnte somit erhebliche Auswirkungen auf den Energiehaushalt einer Zelle und die Produktion reaktiver Nebenprodukte haben. Krause (2004)^[1] konnte ebenfalls eine starke Abnahme der

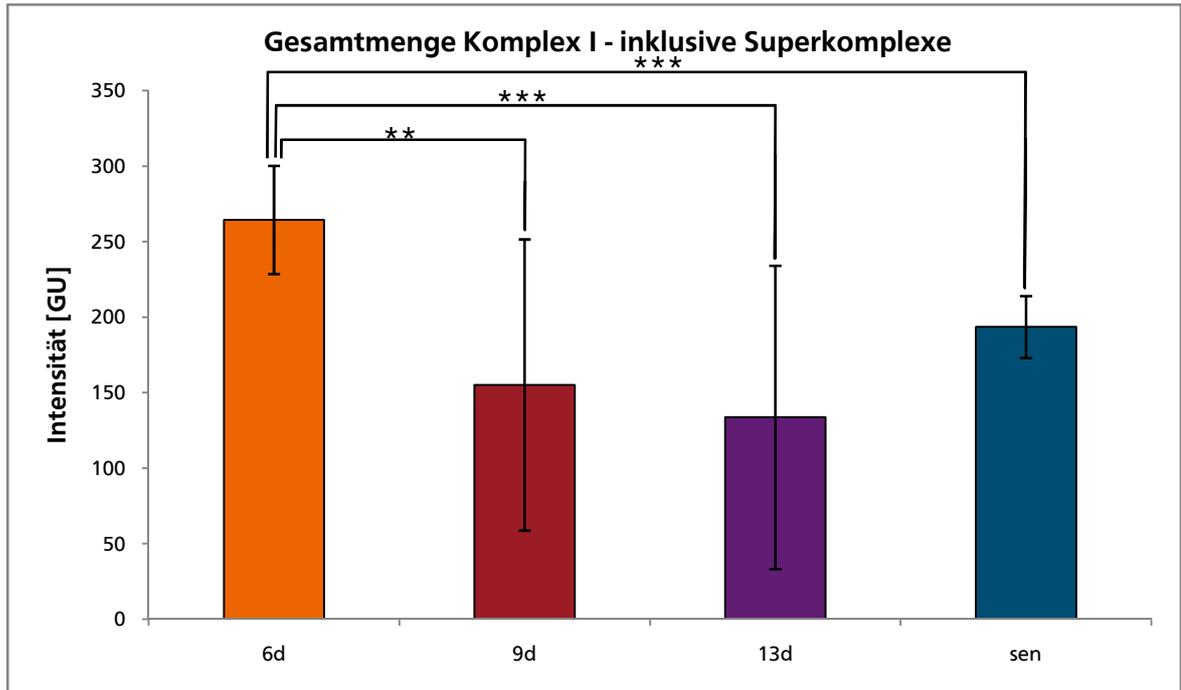
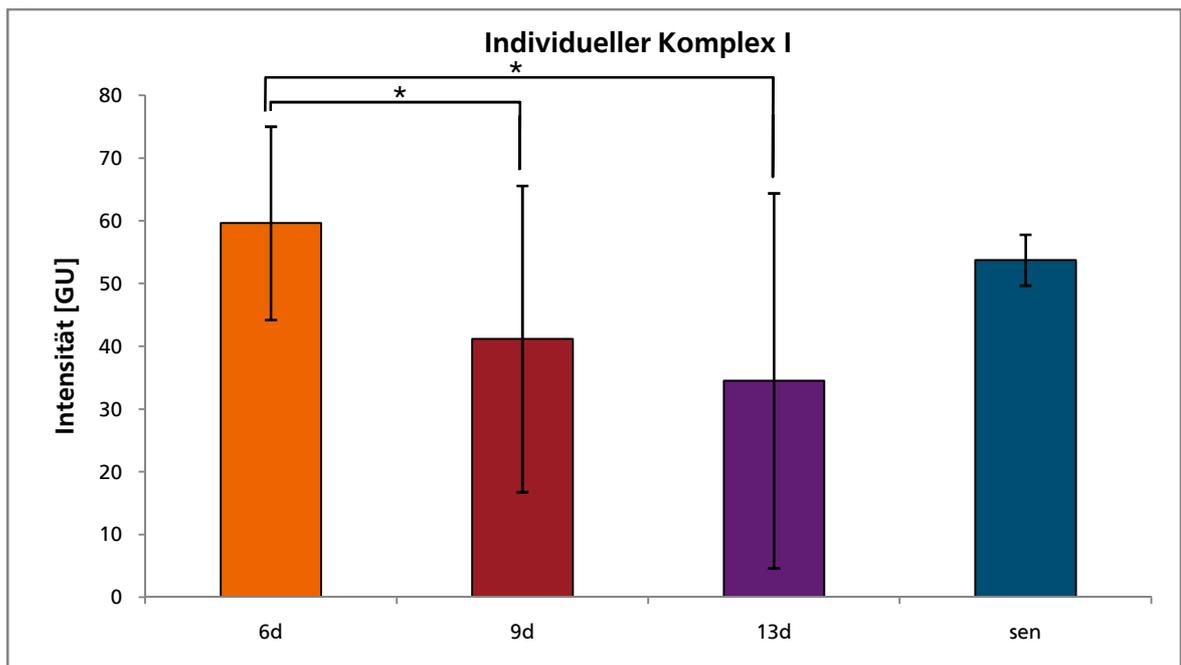
A**B**

Abbildung 5.1.28 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge von Komplex I, bestehend aus der Summe der Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) (A) sowie Summe der Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von individuellem Komplex I (B) in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex I Menge von den 6 Tage alten Kulturen zu den 9 Tage alten (-41%, $p = 0,0092$), 13 Tage alten (-49%, $p = 0,0041$) sowie seneszenten (-27%, $p = 0,0031$) Proben. Für B zeigt sich ein nahezu identisches Bild. Von den 6 zu den 9 Tage alten Kulturen nimmt die Menge an individuellem Komplex I um 31% ab ($p = 0,0305$), von den 6 zu den 13 Tage alten um 42% ($p = 0,0305$). Die seneszenten Kulturen führen den Trend einer Abnahme der Komplex I Menge bereits zu Beginn der Lebensspanne weder bei A noch bei B fort. Bei B enthalten sie jedoch fast genauso viel Komplex I wie die 6 Tage alten Proben (-10%, statistisch nicht signifikant). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

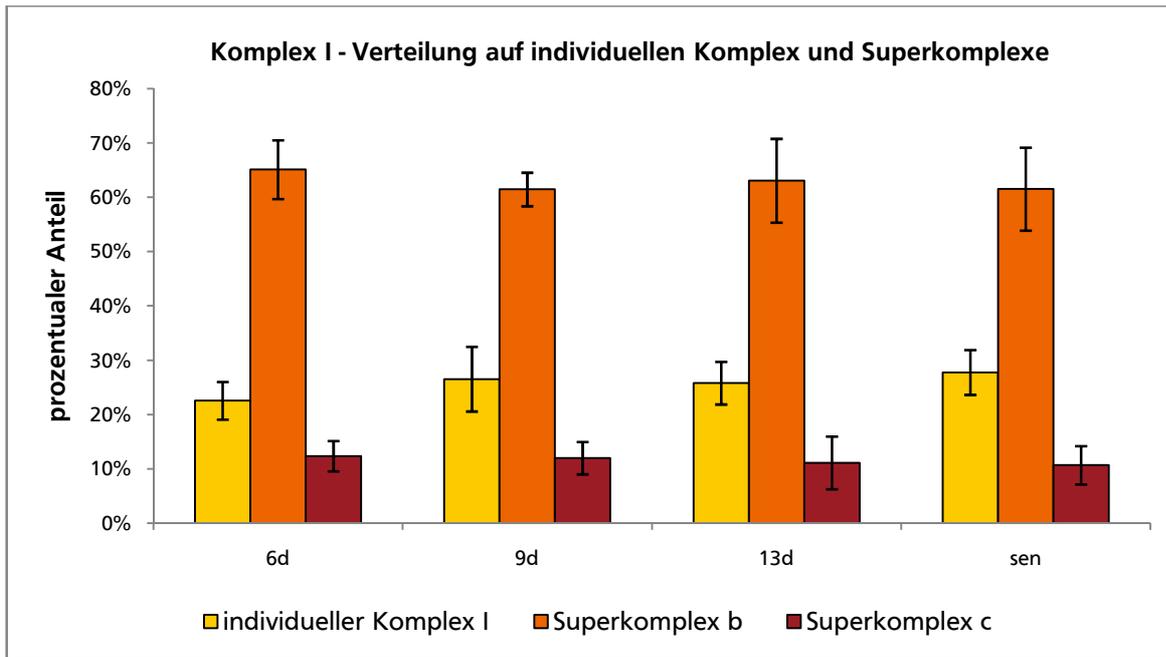


Abbildung 5.1.29 Altersabhängige prozentuale Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex sowie Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Es zeigt sich kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung von Komplex I auf die drei in der vorliegenden Arbeit vorkommenden und analysierten Formen mit dem Alter. Im Mittel liegen 26% von Komplex I als individueller Komplex, 63% in Superkomplex b und 11% in Superkomplex c vor. In Übereinstimmung mit den Daten für Komplex III_2 (vgl. Abbildung 5.1.27) liegt auch bei Komplex I der geringste Prozentsatz als Superkomplex c vor. Anders als bei Komplex III_2 verteilen sich die restlichen Prozente jedoch nicht nahezu gleich auf individuellen Komplex und Superkomplex b, sondern letzterer enthält mit im Mittel 63% den Großteil der Gesamtmenge an Komplex I. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen kann man bei den älteren Proben einen leichten Anstieg des Prozentsatzes an freiem Komplex I von 23% bei den 6 Tage alten auf im Mittel 27% bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben feststellen, der jedoch nicht statistisch signifikant ist.

Menge an Komplex I in seneszenten verglichen mit juvenilen *Podospora*-Kulturen feststellen. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Daten fand Krause (2004)^[1] jedoch zusätzlich ein vermehrtes Vorliegen von individuellem Komplex I (> 50%) in seneszenten Kulturen, während in juvenilen Proben die Hauptmenge von Komplex I in den Superkomplexen a-c ($I_1III_2IV_{0-2}$) vorlag. Dass der überwiegende Teil von Komplex I in Form von Superkomplexen vorliegt, wurde auch schon von Söhn (2010)^[173] in Rattenhirn und Frenzel *et al.* (2010)^[172] in Rattencortex festgestellt. Im Rahmen meiner Diplomarbeit lag Komplex I im Gesamthirn von Ratten verschiedener Altersstufen ausschließlich in Form von Superkomplexen vor und es konnte gar kein individueller Komplex identifiziert werden^[132]. Dies lässt sich mit der Tatsache erklären, dass die Ausbildung von Superkomplexen für Stabilität und eventuell auch Assemblierung von Komplex I essentiell ist, da beispielsweise fehlender Komplex III_2 oder IV im Bakterium *Paracoccus denitrificans* zu einer verringerten Komplex I Menge führt^[250] und auch im Menschen Mutationen von Genen für verschiedene Untereinheiten von Komplex III_2 sekundäre Defekte von Komplex I nach sich ziehen^[238, 251, 252]. Vermutlich spielt auch Komplex IV bei Assemblierung und Stabilität von Komplex I eine Rolle^[254, 255].

5.1.1.6 Zusammenfassung

Durch die Kombination von blau-nativer und denaturierender Gelelektrophorese (2D-BN/SDS-PAGE) und anschließende Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO[®] Ruby konnten altersabhängige Veränderungen in der Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) von *Podospora anserina* mittels der Software Delta2D ermittelt werden. Dabei wurde neben den individuellen Komplexen I, III₂ und IV auch die ATP-Synthase (Komplex V) in ihrer monomeren und dimeren Form, sowie das Vorliegen von freier F₁-Kopfgruppe analysiert. Zusätzlich konnten die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) und damit auch die Gesamtmenge der Komplexe I und III₂ quantifiziert werden. In Tabelle 5.1.2 sind die prozentualen Veränderungen der untersuchten Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bezogen auf die jüngste Altersstufe (6 Tage) zusammenfassend dargestellt.

Grundsätzlich kann eine Abnahme aller Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bezogen auf die mit 6 Tagen jüngste Altersstufe festgestellt werden. Lediglich für Komplex IV zeigen die seneszenten Kulturen eine Zunahme um 6% verglichen mit den 6 Tage alten Proben (vgl. Tabelle 5.1.2). Während von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen stets eine kontinuierliche Abnahme erfolgt, so dass die Menge des betrachteten Komplexes oder Superkomplexes bei den 13 Tage alten Proben immer am geringsten ist, setzen die seneszenten Kulturen diesen Trend nie fort, sondern weisen oft in etwa die gleiche Menge wie die 9 Tage alten Proben auf. Das dies tatsächlich auf eine Zunahme der Menge an Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung von den 13 Tage alten, zu den nur ein oder zwei Tage älteren, seneszenten Kulturen (vgl. Tabelle 5.1.1) zurückzuführen ist, erscheint eher unwahrscheinlich. Die seneszenten Kulturen wurden jedoch auf etwas andere Weise gewonnen als die 6, 9 und 13 Tage alten (siehe hierzu Abschnitt 5.3.1), so dass keine direkte Vergleichbarkeit gegeben ist. Die in Tabelle 5.1.2 dargestellten Werte zeigen, dass die Menge der Atmungskettenkomplexe und –superkomplexe bei *Podospora anserina* schon bei den 9 Tage alten Kulturen – also nach Erreichen von 60% bis 64% ihrer Lebensspanne – um ein Drittel bis die Hälfte abgenommen hat. Lediglich Komplex IV bildet hier eine Ausnahme, da dessen Menge von den 6 zu den 9 Tage alten Kulturen lediglich um 13% abnimmt. Bei den 13 Tage alten Kulturen ist schließlich selten noch mehr als die Hälfte der ursprünglichen Menge bei den 6 Tage alten Proben vorhanden. Die Menge von individuellem Komplex III₂ nimmt sogar um 79% ab, die Komplex III₂ Gesamtmenge unter Einbeziehung der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) um 77%. Die Menge an freier F₁-Kopfgruppe der ATP-Synthase ist bei den 13 Tage alten Kulturen zwar ebenfalls 77% niedriger als bei den 6 Tage alten, jedoch hat dies quasi keinen Einfluss auf die ATP-Synthase Gesamtmenge, so dass

unabhängig vom Alter in etwa der gleiche Prozentsatz der ATP-Synthase als freier F₁-Kopfteil vorliegt. Das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase (vgl. Abbildung 5.1.8) liegt bei den 13 Tage alten Proben um 38% höher als bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten *Podospora*-Kulturen. Die prozentuale Verteilung der Komplexe I und III₂ auf individuellen Komplex sowie die Superkomplexe b und c (vgl. Abbildung 5.1.27 und 5.1.29) ändert sich nicht maßgeblich mit dem Alter.

Eine Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter führt mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinträchtigung des Energiehaushalts der Zelle und könnte eine der Ursachen und/oder Konsequenzen des Alternsprozesses sein. Zusätzlich ist jedoch auch mit einer Abnahme der Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu rechnen, da die Atmungskettenkomplexe – insbesondere Komplex I und III₂ – deren Hauptquelle sind^[29-31].

Tabelle 5.1.2 Altersabhängige Veränderungen in der Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung von *Podospora anserina*, ermittelt anhand von SYPRO[®] Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gelen. Alle Veränderungen sind in Prozent bezogen auf die jüngste Altersgruppe (6 Tage) angegeben. Innerhalb jeder Altersstufe standen drei Individuen zur Verfügung (siehe Tabelle 5.1.1) und es wurden jeweils drei Gelreplikate pro Individuum angefertigt. In der Regel ist eine Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter zu verzeichnen; die Zunahme an Komplex IV bei den seneszenten Kulturen ist in rot gekennzeichnet. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Normierung auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (Normierungsfaktoren im Anhang, Tabelle A.1). Sämtliche Werte wurden durch Mittelung der drei Gele pro Individuum sowie der drei Individuen pro Altersstufe gewonnen; alle Veränderungen sind unabhängig von ihrer statistischen Signifikanz aufgelistet.

OxPhos		Veränderung bezogen auf die 6 Tage alten Kulturen		
		9 Tage	13 Tage	seneszent
Individuelle Komplexe	Komplex IV	-13%	-44%	+6%
	Komplex III ₂	-44%	-79%	-50%
	Komplex I	-31%	-42%	-10%
Superkomplexe	b (I ₁ III ₂ IV ₁)	-47%	-62%	-37%
	c (I ₁ III ₂ IV ₂)	-47%	-70%	-47%
ATP-Synthase	Monomer	-50%	-55%	-42%
	Dimer	-46%	-62%	-34%
	freier F ₁ -Teil	-40%	-72%	-65%
Gesamtmenge	Komplex III ₂	-47%	-77%	-47%
	Komplex I	-41%	-49%	-27%
	ATP-Synthase	-48%	-58%	-39%
	ATP-Synthase (inkl. F ₁ -Teil)	-48%	-59%	-40%
	Superkomplexe	-47%	-63%	-39%

5.1.2 Analyse posttranslationaler Modifikationen mittels LC-ESI-MS/MS

Die Abnahme der Syntheserate für Proteine ist zwar eine der am häufigsten beobachteten altersabhängigen Veränderungen auf biochemischer Ebene^[290], der Prozess des Alterns beeinflusst jedoch auch das Vorkommen posttranslationaler Modifikationen. Es ist eine Vielzahl verschiedener posttranslationaler Modifikationen bekannt, die unter anderem Aktivität, Stabilität, Spezifität, Transport und Lebensspanne eines Proteins bestimmen^[290]. Etliche dieser Modifikationen unterliegen einer strengen enzymatischen Regulation, im Rahmen dieser Arbeit liegt das Augenmerk jedoch auf zufällig auftretenden nicht-enzymatischen Modifikationen, die keiner Regulierung unterliegen^[291, 292].

Dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS von engl. *reactive oxygen species*) beim Alternsprozess eine Rolle spielen, wurde bereits 1956 von Harman^[293] postuliert und ist mittlerweile eine vielbeachtete wissenschaftliche Hypothese. In den letzten Jahren entwickelte sich schließlich die sogenannte „*garbage catastrophe theory*“ (Müllkatastrophen-Theorie), die ROS für die Akkumulation altersabhängiger Schädigungen von Biomolekülen verantwortlich macht^[294-296]. Studien oxidativ modifizierter Proteine zeigen unter anderem eine altersabhängige Zunahme carbonylierter Proteine^[297], oxidiertes Methionin-Reste^[298], vernetzter^[299] und glycosylierter Proteine^[300]. Da die Komplexe I und III₂ der oxidativen Phosphorylierung die Hauptquelle für Superoxidradikal-Anionen (O₂^{•-}) darstellen^[29-31], und bei Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, sind mitochondriale Proteine – und natürlich auch Lipide und die mtDNA – besonders von oxidativen Schäden betroffen. Hunzinger *et al.* (2006)^[301] konnten bei der mitochondrialen Aconitase-2 aus Rinderherzmitochondrien die oxidative Modifikation *N*-Formylkynurenin identifizieren, die auf einen zweifach oxidierten Tryptophan-Rest zurückgeht. *N*-Formylkynurenin kann enzymatisch und nicht-enzymatisch entstehen^[302] und reflektiert ein direktes Ereignis innerhalb der Kette oxidativer Schädigungen, da Tryptophan ein direktes Angriffsziel für ROS darstellt^[291]. Hunzinger *et al.* (2006)^[301] sowie vor ihnen bereits Taylor *et al.* (2003)^[303] konnten außerdem zeigen, dass *N*-Formylkynurenin relativ leicht massenspektrometrisch analysiert werden kann. Groebe *et al.* (2007)^[55] analysierten Mitochondrien juveniler und seneszenter *Podospira anserina* Kulturen und konnten neben einer generellen Zunahme der Menge von SAM-abhängiger *O*-Methyltransferase (SAM-OMT) in seneszenten Kulturen außerdem *N*-Formylkynurenin-Modifikationen dieses Enzyms feststellen. Diese beschränkten sich spezifisch auf drei Tryptophan-Reste und während in juvenilen Kulturen etwa 25% der SAM-OMT modifiziert waren, trugen in den seneszenten Proben circa 50% die Modifikation. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls Mitochondrien juveniler und seneszenter *P. anserina* Kulturen (zur Verfügung gestellt von der AG Osiewacz,

Goethe-Universität Frankfurt am Main) auf diese Modifikation, sowie Hydroxy-Tryptophan und Kynurenin (Strukturformeln in Abbildung 5.1.30) analysiert. Dabei wird die ATP-Synthase als unverzichtbarer Energielieferant der Zelle als Untersuchungsobjekt ausgewählt und es stehen die in Tabelle 5.1.3 aufgeführten Proben zur Verfügung (siehe auch Abschnitt 3.5.1). Zusätzlich wird der Einfluss des kommerziell erhältlichen Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™ (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.1.2) bei der Solubilisierung untersucht. Ebenfalls analysiert wird der Effekt der Zugabe des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien auf den Oxidationsgrad des mitochondrialen Proteoms, da zukünftige Analysen von *P. anserina* Mitochondrien zu einem großen Teil oxidative Veränderungen des Proteoms durch den Alternsprozess berücksichtigen sollen und dafür eine artifizelle Oxidation durch Probengewinnung und -bearbeitung bestmöglich ausgeschlossen werden muss. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien derselben Kultur von Alexandra Werner (AG Osiewacz, Goethe-Universität Frankfurt am Main) einmal mit und einmal ohne Zusatz von Desferal isoliert (siehe Tabelle 5.1.4).

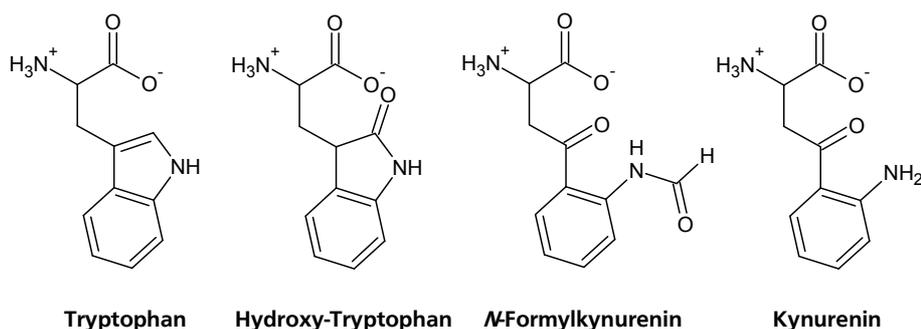


Abbildung 5.1.30 Strukturformeln von Tryptophan sowie seinen oxidativen Modifikationen Hydroxy-Tryptophan, N-Formylkynurenin und Kynurenin.

Tabelle 5.1.3 Isolierte Mitochondrien von *Podospora anserina* für die massenspektrometrische Analyse der ATP-Synthase auf oxidative Modifikationen des Tryptophans (Hydroxy-Tryptophan, N-Formylkynurenin, Kynurenin). Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer und Proteinkonzentration.

Individuum	Alter	Kulturnummer	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
s(-)F69190	9 d (juv)	#33	44,8
s(-)F89041		#46	29,0
s(-)F69190	sen	#40	30,9
s(-)F89041		#47	34,6

Tabelle 5.1.4 Mit und ohne Zusatz des Eisenchelators Desferal isolierte Mitochondrien von *Podospora anserina* unter Angabe von Individuum, Alter, Kulturnummer und Proteinkonzentration.

Individuum	Alter [d]	Kulturnummer	Desferal	Proteinkonzentration [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]
s(-)F111241	7	#81	-	12,1
s(-)F111241	7	#81	+	15,8

Ebenfalls von Interesse ist die Reaktion des Elektrophils 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE, Strukturformel in Abbildung 5.1.31) mit Proteinen. HNE entsteht endogen durch die Peroxidation *n*-6-polyungesättigter Fettsäuren wie Arachidonsäure oder Linolsäure^[304]. Etwa 1-8% des in der Zelle gebildeten HNE modifiziert Proteine^[305]. Dabei werden Michael-Addukte mit der Thiol- bzw. Amino-Gruppe von Cystein-, Histidin- oder Lysin-Resten gebildet^[304], wobei die Reaktion mit Lysin jedoch reversibel ist^[306]. Es konnten schon zahlreiche durch HNE modifizierte Proteine nachgewiesen werden^[307], darunter auch Komplex IV^[308, 309] und II^[310] der Atmungskette. HNE könnte auch eine Rolle bei der Alzheimer-Krankheit spielen, da im Liquor von Alzheimer-Patienten eine erhöhte HNE-Konzentration gefunden wurde, was auf eine verstärkte Lipidperoxidation hindeutet und HNE zu einem möglichen Biomarker für diese Krankheit macht^[311].

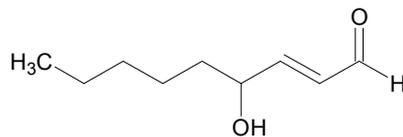


Abbildung 5.1.31 Strukturformel von 4-Hydroxy-2-nonenal.

5.1.2.1 Spezifische Oxidation eines Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina*

Zur Analyse posttranslationaler Modifikationen der ATP-Synthase werden Mitochondrien der juvenilen Kulturen #33 und #46 sowie der seneszenten Kulturen #40 und #47 (siehe Tabelle 5.1.3) mit dem nichtionischen Detergens Digitonin und einem Protein/Detergens-Verhältnis von 1:4 (w/w) solubilisiert und anschließend mittels blau-nativer Gelelektrophorese aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mit einem nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Coomassie-Färbeprotokoll (siehe Abschnitt 4.4.4.2) werden die Banden des ATP-Synthase Monomers und Dimers ausgeschnitten und wie in Abschnitt 4.6.2.1 beschrieben für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Diese wird im Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum von Dr. Sascha Rexroth und Dr. Ansgar Poetsch durchgeführt. Die mittels LC-ESI-MS/MS erhaltenen Daten werden mit der Software Xcalibur (Thermo Electron Corporation) und dem BioworksBrowser von Thermo Fisher Scientific verarbeitet. Die Analyse der MS/MS-Spektren erfolgt mittels des Software-Algorithmus SEQUEST, der eine Kreuzkorrelations (XCorr) Scoring Routine verwendet, um Tandem-Massenspektren mit einem anhand der Peptidsequenzen erstellten Muster-Spektrum zu vergleichen. Für die Bewertung einer Übereinstimmung wird dabei die Differenz zwischen den beiden Sequenzen mit dem höchsten Rang (ΔC_n) verwendet^[312]. Für die Datenauswertung im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die in Tabelle 5.1.5 aufge-

fürten Filter verwendet. Für die Analyse der MRM-Daten (TSQ Vantage) werden Pinpoint (Thermo Scientific) und der BioworksBrowser verwendet. Monoisotopische und mittlere Massenabweichungen für alle betrachteten posttranslationalen Modifikationen werden der Online-Datenbank „UNIMOD protein modifications for mass spectrometry“^[313] entnommen. Zusätzlich wird stets die Oxidation von Methionin berücksichtigt, da diese bekanntermaßen als Artefakt der Probenhandhabung entsteht^[314] und beispielsweise durch Reste von Peroxid beim Gellauf hervorgerufen werden kann.

Tabelle 5.1.5 Für die Analyse der MS/MS-Spektren mittels BioworksBrowser und SEQUEST verwendete Filter.

Typ	Bereich	Parameter
Peptid	Peptid Wahrscheinlichkeit	0,001
Peptid	XCorr vs. Ladungszustand	1,00, 2,00, 2,50, 3,00
Protein	Protein Wahrscheinlichkeit	0,001

Quantifizierung mittels *Spectral Counting*

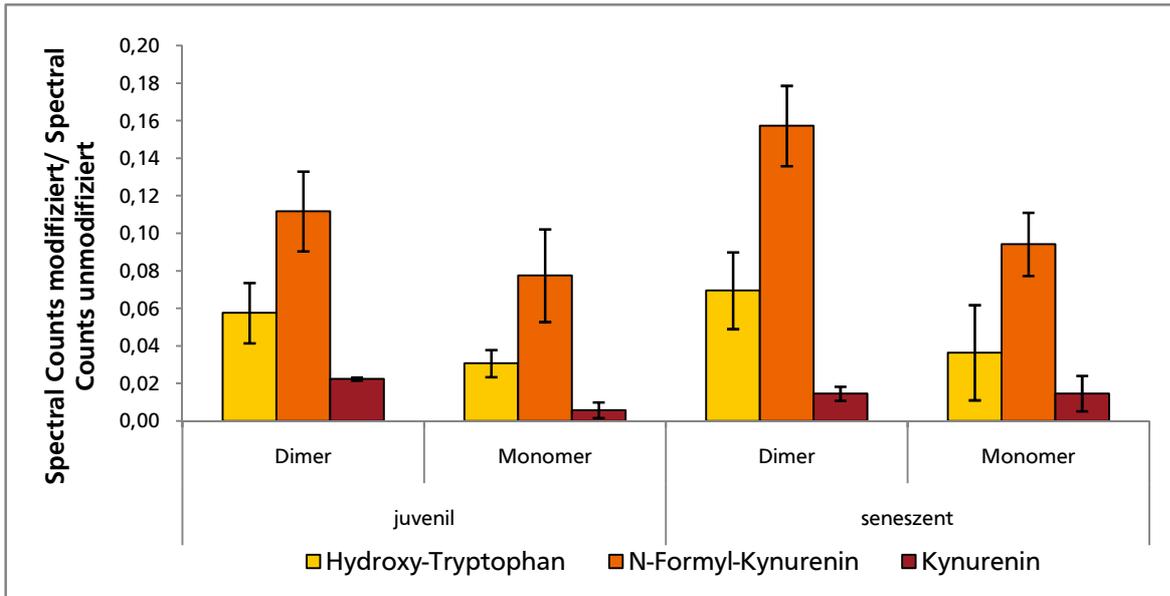
Mittels LC-ESI-MS/MS können in den untersuchten Proben jeweils die α - und β -Untereinheit sowie weitere Untereinheiten der ATP-Synthase und teilweise einige zusätzliche Proteine identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Tryptophan-Reste sind in den Untereinheiten α , γ , ε , D, J, 4 und 6 der ATP-Synthase von *Podospora anserina* vorhanden^[315], wobei in sämtlichen im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen die α -Untereinheit als einzige modifizierte Tryptophan-Reste aufweist. Die ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina* besitzt drei Tryptophan-Reste^[316], die sich in den Peptiden ILQWEADFLSHLK, YSIVVAATASEAAPLQYLAPFTGASIGEWFR und KRWNSGNDSTKK befinden, wobei letzteres bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Analysen identifiziert werden kann. Die Berechnung des Instabilitäts-Index (II) für dieses Peptid mittels ProtParam^[317] ergibt allerdings auch einen Wert von 87,27 und Proteine gelten ab einem $II > 40$ als instabil^[318]. Von den beiden identifizierten Tryptophan-haltigen Peptiden YSIVVAATASEAAPLQYLAPFTGASIGEWFR und ILQWEADFLSHLK kann lediglich letzteres auch mit zu Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) oder Kynurenin (Kyn) oxidiertem Tryptophan-Rest detektiert werden. Der Tryptophan-Rest des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* scheint somit spezifisch oxidiert zu werden. Da Proben von juvenilen und seneszenten Proben gleichermaßen analysiert werden und durch die Verwendung von blau-nativer Gelelektrophorese zusätzlich zwischen monomerer und dimerer Form der ATP-Synthase unterschieden werden kann, können sowohl die Altersabhängigkeit des Vorkommens der drei Tryptophan-Modifikationen TrpOH, NFKyn und Kyn als auch mögliche Unterschiede bezüglich Monomer und

Dimer untersucht werden. Die Daten basieren auf zwei biologischen (verschiedene Individuen von *P. anserina*) Replikaten pro Altersstufe sowie zwei technischen Replikaten (Solubilisierung, BN-Gel, Verdau, MS-Analyse) pro Probe. In Abbildung 5.1.32 A sind die *Spectral Counts* des modifizierten (TrpOH, NFKyn, Kyn), bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids ILQWEADFLSHLK für Monomer und Dimer der ATP-Synthase aus juvenilen bzw. seneszenten Kulturen von *Podospora anserina* dargestellt. Die Daten für die beiden Kulturen pro Altersstufe sowie die technischen Replikate sind bereits gemittelt. Unabhängig von Alter und Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase ist *N*-Formylkynurenin (NFKyn) stets die am häufigsten vertretene Modifikation, gefolgt von Hydroxy-Tryptophan (TrpOH) und Kynurenin (Kyn). Die prozentuale Verteilung auf die drei betrachteten Modifikationen des Tryptophans ist recht konstant und zeigt keine prägnanten Unterschiede zwischen juvenilen und seneszenten Kulturen oder Monomer und Dimer der ATP-Synthase. Im Mittel liegen 28% TrpOH, 64% NFKyn und 8% Kyn, bezogen auf die Gesamtheit von modifiziertem Peptid vor. Abbildung 5.1.32 B zeigt die aufsummierten *Spectral Counts* aller drei Modifikationen bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids ILQWEADFLSHLK, was dem Prozentsatz an modifiziertem Peptid in der jeweiligen Probe entspricht. Das Dimer ist sowohl bei den juvenilen als auch bei den seneszenten Kulturen stärker modifiziert, jedoch ist nur der Unterschied der juvenilen Kulturen – bei denen das Dimer 1,68-mal stärker modifiziert ist als das Monomer – statistisch signifikant ($p = 0,0209$). Das Dimer der seneszenten Proben ist 1,66-mal stärker modifiziert als das Monomer, so dass die beiden Formen der ATP-Synthase unabhängig vom Alter im gleichen Verhältnis von Tryptophan-Oxidationen betroffen zu sein scheinen. Allerdings ist der Prozentsatz an modifiziertem Peptid bei den seneszenten Proben größer, als bei den juvenilen Kulturen. Während bei letzteren 11% des Monomers und 19% des Dimers modifiziert sind, so sind es bei den seneszenten Proben 15% des Monomers und 24% des Dimers (statistisch nicht signifikant).

Quantifizierung anhand der Peakfläche

Die in Tabelle 5.1.3 aufgeführten juvenilen und seneszenten Kulturen von *Podospora anserina* werden zusätzlich auch mittels MRM (*multiple reaction monitoring*, siehe Abschnitt 4.6.3) analysiert, wobei jedoch nur ein technisches Replikat zur Verfügung steht. Die Quantifizierung erfolgt dabei anhand der Peakfläche (siehe Abschnitt 4.8.2.2). Die Messungen werden im Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum von Dr. Sascha Rexroth und Dr. Ansgar Poetsch an einem LTQ Orbitrap Massenspektrometer von Thermo Scientific unter Verwendung der in Tabelle 5.1.6 aufgelisteten Übergänge durchgeführt. Dabei wird jeweils ein Übergang zu einem den Tryptophan-Rest und somit gegebenenfalls die Modifikation

A



B

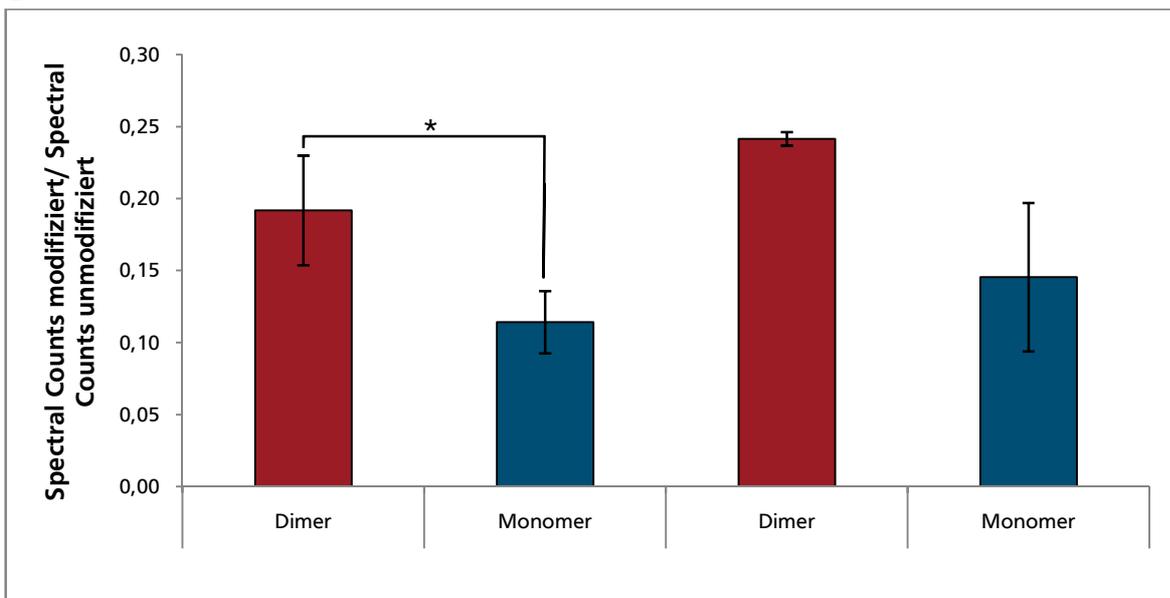


Abbildung 5.1.32 Altersabhängiger Vergleich der Häufigkeit der oxidativen Tryptophan-Modifikationen Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina*. Aufgetragen sind die *Spectral Counts* des modifizierten, bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids. Die Werte für die technischen und biologischen Replikate wurden jeweils gemittelt. (A) Vergleich des altersabhängigen Auftretens von TrpOH, NFKyn und Kyn beim ATP-Synthase Monomer und Dimer juveniler und seneszenter Kulturen von *P. anserina*. NFKyn ist bei allen Proben die häufigste Modifikation, gefolgt von TrpOH und Kyn. Die prozentuale Verteilung der drei Modifikationen ist dabei unabhängig vom Alter der Kultur und vom Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase. Im Mittel liegen 28% TrpOH, 64% NFKyn und 8% Kyn, bezogen auf die Gesamtheit von modifiziertem Peptid vor. (B) Aufsummierte *Spectral Counts* aller Modifikationen bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids. Sowohl in juvenilen als auch in seneszenten Kulturen ist das Dimer stärker modifiziert, jedoch ist nur der Unterschied bei den juvenilen Kulturen – wo das Dimer 1,68-mal stärker modifiziert ist als das Monomer – statistisch signifikant ($p = 0,0209$). Das Dimer der seneszenten Proben ist 1,66-mal stärker modifiziert als das Monomer, so dass die beiden Formen der ATP-Synthase unabhängig vom Alter im gleichen Verhältnis von Tryptophan-Oxidationen betroffen zu sein scheinen. Der Prozentsatz an modifiziertem Peptid ist jedoch bei den seneszenten Proben größer als bei den juvenilen Kulturen. Während bei letzteren 11% des Monomers und 19% des Dimers modifiziert sind, so sind es bei den seneszenten Proben 15% des Monomers und 24% des Dimers (statistisch nicht signifikant). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

tragenden Peptid sowie ein weiterer Übergang zu einem Referenzfragment ohne den Tryptophan-Rest gemessen. Während die Übergänge zu den Tryptophan-haltigen Fragment-Ionen lediglich dazu dienen, den Modifikationsgrad des Tryptophans zu bestimmen, wird das Referenzfragment – das stets das Gleiche ist (vgl. Tabelle 5.1.6) – für die Quantifizierung verwendet. Dafür wird jeweils die Peakfläche des Vorläufer-Ions bestimmt. Wie schon bei der Quantifizierung mittels *Spectral Counting* wird auch hier die Menge an modifiziertem pro unmodifiziertem Peptid betrachtet, so dass für jede Probe der Quotient der Flächen des modifizierten und des unmodifizierten Peptids gebildet wird.

Tabelle 5.1.6 Vorläufer- und Fragment-Ionen für die Analyse der Oxidation eines spezifischen Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* mittels MRM und eines LTQ Orbitrap Massenspektrometers. Es wird jeweils ein Übergang zu einem Trp-haltigen Fragment-Ion sowie zu einem Referenzpeptid (ADFLSHLK) ohne den Tryptophan-Rest gemessen. Angegeben sind jeweils Peptidsequenz, Ladung und Masse sowie beim Fragment-Ion zusätzlich der Ionentyp.

Vorläufer-Ion			Fragment-Ion			
Peptidsequenz	Ladung	Masse	Peptidsequenz	Ionen-Typ	Ladung	Masse
ILQWEADFLSHLK	+2	800,43	WEADFLSHLK	y10	+1	1245,63
ILQ(TrpOH)EADFLSHLK	+2	808,43	ILQ(TrpOH)E	b5	+1	686,35
ILQ(NFKyn)EADFLSHLK	+2	816,43	Q(NFKyn)EADFLSHLK	y11	+1	1405,67
ILQ(Kyn)EADFLSHLK	+3	535,29	Q(Kyn)EADFLSHLK	y11	+2	689,34
ILQWEADFLSHLK	+2	800,43	ADFLSHLK	y8	+1	930,50
ILQ(TrpOH)EADFLSHLK	+2	808,43				
ILQ(NFKyn)EADFLSHLK	+2	816,43				
ILQ(Kyn)EADFLSHLK	+2	802,43				

In Abbildung 5.1.33 sind die Quotienten aus der Peakfläche des modifizierten und des unmodifizierten Peptids einmal für alle drei Modifikationen des Tryptophans (A) und einmal für die Summe der drei Modifikationen (B) aufgetragen. Da die Ergebnisse auf nur einem technischen Replikat beruhen, spiegeln die in Form von Fehlerbalken dargestellten Standardabweichungen die Unterschiede zwischen den Kulturen wider. Diese fallen teilweise sehr groß aus, insbesondere für das ATP-Synthase Dimer der juvenilen Kulturen. Da die gleichen *Podospora*-Kulturen analysiert werden wie auch bei der Auswertung mittels *Spectral Counting*, sind eigentlich vergleichbare Ergebnisse zu erwarten. Dies ist allerdings nicht der Fall. Schon die Verteilung der drei Tryptophan-Modifikationen Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) stimmt nicht mit der mittels *Spectral Counting* erhaltenen überein (vgl. Abbildung 5.1.32 A). Während dort stets NFKyn die am häufigsten vorkommende Modifikation war – gefolgt von TrpOH und Kyn – zeigt die Auswertung anhand der Peakflächen ein vollkommen anderes Bild (Abbildung 5.1.33 A). Beim Dimer der juvenilen Kulturen scheinen alle drei Modifikationen in gleicher Menge vorzukommen, während das

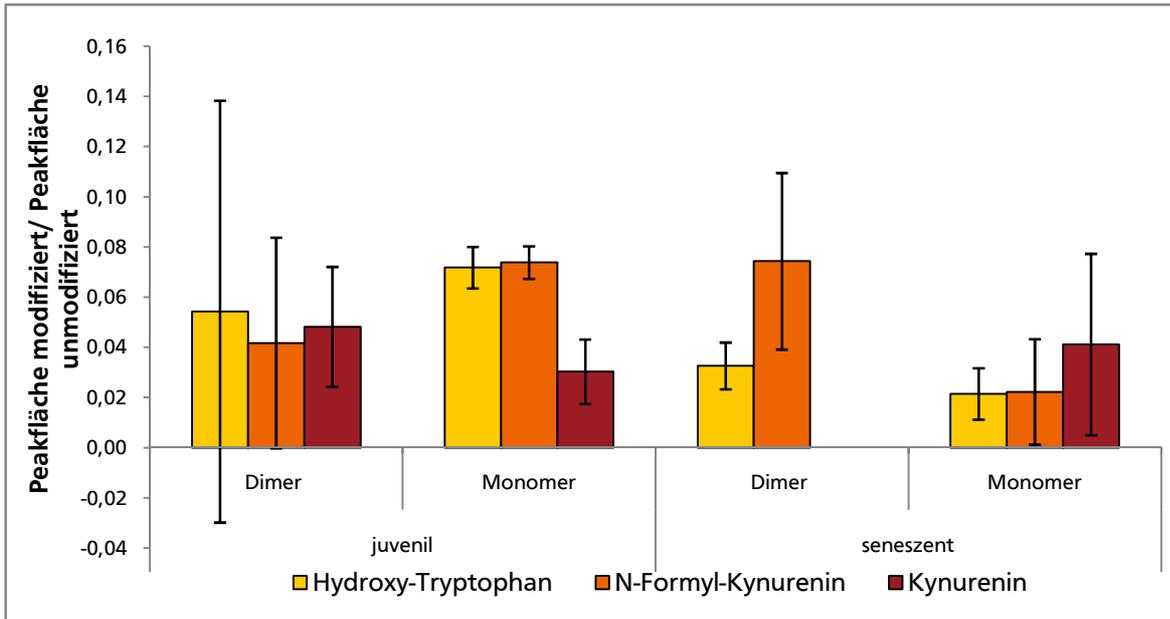
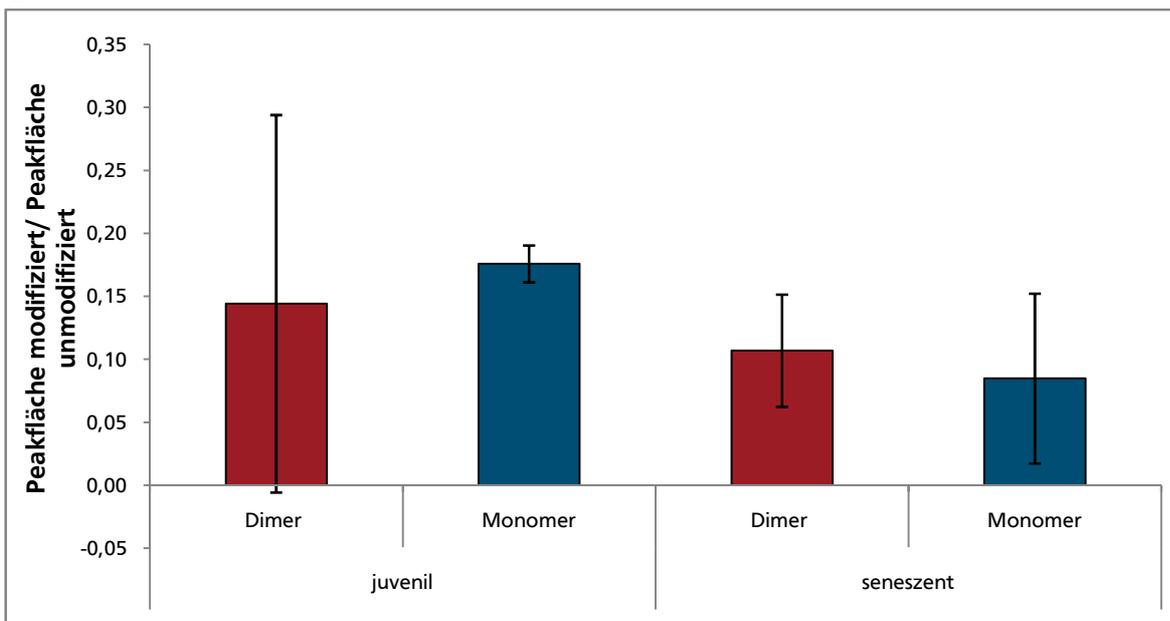
A**B**

Abbildung 5.1.33 Altersabhängiger Vergleich der Häufigkeit der oxidativen Tryptophan-Modifikationen Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina*. Aufgetragen ist jeweils das Verhältnis der Peakflächen von modifiziertem und unmodifiziertem Peptid. Die Werte für die beiden biologischen Replikate wurden gemittelt. Da die Ergebnisse auf nur einem technischen Replikat beruhen, spiegeln die in Form von Fehlerbalken dargestellten Standardabweichungen die Unterschiede zwischen den Kulturen wider. Diese fallen teilweise sehr groß aus, insbesondere für das ATP-Synthase Dimer der juvenilen Kulturen. **(A)** Vergleich des altersabhängigen Auftretens von TrpOH, NFKyn und Kyn beim ATP-Synthase Monomer und Dimer juveniler und seneszenten Kulturen von *P. anserina*. Im Gegensatz zur Auswertung anhand der *Spectral Counts* zeigt sich keine einheitliche Verteilung auf die drei Modifikationen des Tryptophans. **(B)** Die Unterschiede in der Modifikation der ATP-Synthase α -Untereinheit sind bei der Auswertung anhand der Peakflächen wesentlich geringer und aufgrund der teilweise sehr großen Standardabweichungen, sowie der geringen Anzahl technischer (1) und biologischer (2) Replikate auch nicht statistisch signifikant. Tendenziell scheinen die juvenilen Kulturen geringfügig mehr modifiziertes Tryptophan im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* aufzuweisen, als die seneszenten.

Dimer der seneszenten Proben etwa doppelt so viel NFKyn wie TrpOH jedoch gar kein Kyn aufweist. Das Monomer zeigt sowohl bei den juvenilen als auch bei den seneszenten Proben in etwa die gleiche Menge an TrpOH und NFKyn, jedoch ist diese bei den juvenilen größer und bei den seneszenten geringer als die Menge an Kyn. Dementsprechend unterscheiden sich auch die aufsummierten Werte für alle drei Modifikationen des Tryptophans (Abbildung 5.1.33 B) von den anhand der *Spectral Counts* erhaltenen (vgl. Abbildung 5.1.32 B). Die Unterschiede in der Modifikation der ATP-Synthase α -Untereinheit sind bei der Auswertung anhand der Peakflächen wesentlich geringer und aufgrund der teilweise sehr großen Standardabweichungen sowie der geringen Anzahl technischer (1) und biologischer (2) Replikate auch nicht statistisch signifikant. Tendenziell scheinen die juvenilen Kulturen geringfügig mehr modifiziertes Tryptophan im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* aufzuweisen als die seneszenten.

Vergleich der Quantifizierungsmethoden

Ob eher die Ergebnisse des *Spectral Counting* oder der Quantifizierung mittels MRM und Bestimmung der Peakfläche des Vorläufer-Ions den tatsächlich in der Proben vorliegenden Oxidationszustand des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* widerspiegeln kann nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die Technik des *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) ist zwar eine sehr spezifische Methode (vgl. Abschnitt 4.6.3), jedoch ist das für diese Analyse eingesetzte Massenspektrometer (LTQ Orbitrap) nicht speziell für diese Technik ausgelegt und es wurden nur ein technisches und zwei biologische Replikate verwendet. Zum Zeitpunkt dieser Messungen stand das erheblich besser für die Anwendung der MRM-Technik geeignete TSQ Vantage Triple-Quadrupol Massenspektrometer jedoch noch nicht zur Verfügung. Für zukünftige Analysen wird empfohlen, die schnell und einfach durchzuführende Methode des *Spectral Counting* zu verwenden, wenn ein erster Überblick über das Vorkommen einer oder mehrerer Modifikationen gewünscht wird. Sobald eine spezielle Modifikation eines bestimmten Proteins bzw. Peptids jedoch von größerem wissenschaftlichen Interesse ist, sollte die absolute Quantifizierung (AQUA) mittels interner Peptidstandards (siehe Abschnitt 4.8.2.3) genutzt werden.

Absolute Quantifizierung (AQUA) – Auswahl und Optimierung der MRM-Übergänge

Wie bereits im vorherigen Abschnitt über die Quantifizierung der Modifikationen des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* erwähnt, ist die absolute Quantifizierung mittels interner Standards (AQUA) wie sie in Kapitel 4.8.2.3 beschrieben ist, die Methode der Wahl, wenn interessante posttranslationale Modifikationen eines bestimmten Proteins bzw. Peptids analysiert werden sollen. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die Kombination aus *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) und AQUA bevorzugt, um altersabhängige Veränderungen der Mengen an Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) im Peptid ILQWEADFLSHLK der α -Untereinheit der ATP-Synthase in ihrer monomeren oder dimeren Form zu quantifizieren. Dabei werden kommerziell erhältliche, isotopenmarkierte Standardpeptide (siehe Tabelle 4.8.1 und 4.8.2) verwendet. Neben dem unmodifizierten Peptid ILQWEADFLSHLK sowie den die Modifikationen TrpOH, NFKyn und Kyn tragenden Analogs wird außerdem ein weiteres isotopenmarkiertes Peptid der ATP-Synthase α -Untereinheit, das keine leicht oxidierbaren Aminosäurereste (vor allem Tryptophan, Methionin, Glutamin und Asparagin) enthält als Referenz für die Gesamtmenge an ATP-Synthase in einer Probe verwendet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird dafür das Peptid mit der Sequenz HSLVIFDDLSK gewählt.

Die Auswahl der MRM-Übergänge erfolgt anhand von Probemessungen mit den isotopenmarkierten Standardpeptiden. Da die Synthese des *N*-Formylkynurenin-tragenden Peptids nicht erfolgreich war (siehe Abschnitt 4.8.2.3), werden die Übergänge für dieses anhand der Intensitäten, die bei früheren Messungen mit dem LTQ Orbitrap Massenspektrometer erzielt wurden, ausgewählt. Ebenso wird für die Übergänge der Peptide HSLVIFDDLSK und EVAAFAQFGSDLDAATK verfahren, da ersteres zum Zeitpunkt der Optimierung noch nicht als isotopenmarkiertes Standardpeptid zur Verfügung stand und zweiteres sehr kurzfristig als zusätzliches Peptid für die Identifizierung und Quantifizierung der ATP-Synthase α -Untereinheit herangezogen wurde, so dass das entsprechende Standardpeptid ebenfalls nicht vorhanden war. Für die Vorläufer-Ionen des Peptids ILQWEADFLSHLK in seiner unmodifizierten Form sowie mit TrpOH und Kyn gilt, dass die entsprechende dreifach positiv geladene Spezies stets in wesentlich größerer Menge vorhanden ist als die zweifach geladene. Es werden sowohl für das zweifach als auch für das dreifach positiv geladene Vorläufer-Ion des Peptids ILQWEADFLSHLK und seine drei modifizierten Analogs fünf Übergänge sowie für die beiden Referenzpeptide HSLVIFDDLSK und EVAAFAQFGSDLDAATK sechs Übergänge ausgehend von den zweifach geladenen Vorläufer-Ionen bestimmt (siehe Tabelle 5.1.7 und 5.1.8).

Tabelle 5.1.7 MRM-Übergänge für das Peptid ILQWEADFLSHLK in unmodifizierter Form, sowie mit Hydroxy-Tryptophan (TrpOH) und *N*-Formylkynurenin (NFKyn). Angegeben sind Peptidsequenz, Ladung und Masse des Vorläufer-Ions sowie Peptidsequenz, Ionentyp, Ladung und Masse des Fragment-Ions und die verwendete Kollisionsenergie (KE). Die Massen in Klammern beziehen sich auf das entsprechende isotopenmarkierte Standardpeptid.

Vorläufer-Ion			Fragment-Ion				KE [V]
Peptidsequenz	Ladung	Masse	Peptidsequenz	Ion	Ladung	Masse	
ILQWEADFLSHLK	+2	800,4 (803,9)	LQWEADFLSHLK	y12	+2	743,89	25
			FLSHLK	y6	+1	744,44	32
			ADFLSHLK	y8	+1	930,50	25
			EADFLSHLK	y9	+1	1059,55	27
			WEADFLSHLK	y10	+1	1245,63	28
	+3	534,0 (536,3)	ADFLSHLK	y8	+2	465,76	17
			LSHLK	y5	+1	597,37	22
			WEADFLSHLK	y10	+2	623,32	16
			QWEADFLSHLK	y11	+2	687,35	15
			FLSHLK	y6	+1	744,44	17
ILQ(TrpOH)EADFLSHLK	+2	808,4 (811,9)	ILQ(TrpOH)E	b5	+1	686,35 (693,37)	27
			FLSHLK	y6	+1	744,44	32
			ADFLSHLK	y8	+1	930,50	26
			EADFLSHLK	y9	+1	1059,55	25
			(TrpOH)EADFLSHLK	y10	+1	1261,63	27
	+3	539,3 (541,6)	EADFLSHLK	y9	+2	530,28	15
			(TrpOH)EADFLSHLK	y10	+2	631,31	17
			ILQ(TrpOH)E	b5	+1	686,35 (693,37)	18
			Q(TrpOH)EADFLSHLK	y11	+2	695,34	15
			LQ(TrpOH)EADFLSHLK	y12	+2	751,89	16
ILQ(NFKyn)EADFLSHLK	+2	816,4	FLSHLK	y6	+1	744,44	32
			LQ(NFKyn)EADFLSHLK	y12	+2	759,89	23
			ADFLSHLK	y8	+1	930,50	26
			EADFLSHLK	y9	+1	1059,55	25
			(NFKyn)EADFLSHLK	y10	+1	1277,63	27
	+3	544,6	EADFLSHLK	y9	+2	530,28	15
			(NFKyn)EADFLSHLK	y10	+2	639,32	17
			Q(NFKyn)EADFLSHLK	y11	+2	703,35	18
			LQ(NFKyn)EADFLSHLK	y12	+2	759,89	20
			ILQ(NFKyn)EAD	b7	+1	888,42	24

Tabelle 5.1.8 MRM-Übergänge für das die Kynurenin-Modifizierung (Kyn) enthaltende Peptid ILQWEADFLSHLK sowie die beiden Referenzpeptide HSLVIFDLSK und EVAAFAQFGSDLDAATK. Angegeben sind Peptidsequenz, Ladung und Masse des Vorläufer-Ions sowie Peptidsequenz, Ionentyp, Ladung und Masse des Fragment-Ions und die verwendete Kollisionsenergie (KE). Die Massen in Klammern beziehen sich auf das entsprechende isotopenmarkierte Standardpeptid.

Vorläufer-Ion			Fragment-Ion				KE [V]
Peptidsequenz	Ladung	Masse	Peptidsequenz	Ion	Ladung	Masse	
ILQ(Kyn)EADFLSHLK	+2	802,4 (805,9)	Q(Kyn)EADFLSHLK	y11	+2	689,34	22
			FLSHLK	y6	+1	744,44	32
			ILQ(Kyn)EA	b6	+1	745,39 (752,41)	23
			ADFLSHLK	y8	+1	930,50	26
			(Kyn)EADFLSHLK	y10	+1	1249,62	16
	+3	535,3 (537,6)	(Kyn)EADFLSHLK	y10	+2	625,31	16
			Q(Kyn)EADFLSHLK	y11	+2	689,34	16
			FLSHLK	y6	+1	744,44	17
			ILQ(Kyn)EA	b6	+1	745,39 (752,41)	15
			LQ(Kyn)EADFLSHLK	y12	+2	745,89	20
HSLVIFDLSK	+2	637,3	HSLV	b4	+1	437,25	25
			DLSK	y4	+1	462,26	25
			HSLVI	b5	+1	550,33	25
			FDDLSK	y6	+1	724,35	25
			IFDDLSK	y7	+1	837,44	25
			VIFDLSK	y8	+1	936,50	25
EVAAFAQFGSDLDAATK	+2	870,9	SDLDAATK	y8	+1	820,40	33
			FGSDLDAATK	y10	+1	1024,49	33
			QFGSDLDAATK	y11	+1	1152,55	33
			AQFGSDLDAATK	y12	+1	1223,59	33
			EVAAFAQFGSDLDA	b14	+1	1422,65	33
			EVAAFAQFGSDLDA	b15	+1	1493,60	33

Nach Auswahl der Übergänge werden für jeden Übergang Kollisionsenergie (KE) und „S-Lens“ optimiert. Bei der sogenannten *S-Lens* handelt es sich um ein für das TSQ Vantage Triple-Quadrupol Massenspektrometer neuartig entwickeltes, ionenoptisches Einlass-System, das ein elektrostatisches Feld verwendet, um möglichst jedes erzeugte Ion effizient in das Massenspektrometer zu leiten^[319]. Für alle in den Tabellen 5.1.7 und 5.1.8 aufgeführten Übergänge wird eine *S-Lens* Einstellung von 66 V verwendet. Zukünftig kann die Kynureninylierung des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* mit Hilfe der in den Tabellen 5.1.7 und 5.1.8 aufgeführten Angaben für geeignete MRM-Übergänge und den isotopenmarkierten Standardpeptiden somit absolut quantifiziert werden. Mit dieser

Kombination aus MRM und AQUA wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch der Einfluss der Zugabe des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien analysiert. Die entsprechenden Daten werden in Abschnitt 5.1.2.4 vorgestellt und diskutiert. Des Weiteren wird diese Methode im folgenden Kapitel 5.1.2.2 verwendet, um den Einfluss artifizieller *in vitro* Oxidation mittels Fenton-Reagenz (siehe Abschnitt 4.7) zu analysieren.

5.1.2.2 Einfluss artifizieller *in vitro* Oxidation mittels Fenton-Reagenz auf die Oxidation eines spezifischen Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina*

Bei der Analyse oxidativer Proteinmodifikationen ist es notwendig sicherzustellen, dass diese physiologischen Ursprungs sind und nicht artifiziell durch Probenhandhabung und -bearbeitung entstehen. Eine Positivkontrolle zeigt, ob die Proben durch die Einwirkung zusätzlichen oxidativen Stresses auch – wie zu erwarten wäre – eine erhöhte Menge oxidativer Modifikationen zeigen. Da bei der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospira anserina* die spezifische Oxidation des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK zu Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) nachgewiesen werden konnte (vgl. Abschnitt 5.1.2.1), wird eine *in vitro* Oxidation der Proben nach Manzanares *et al.* (2007)^[151] durchgeführt (siehe auch Kapitel 4.7). Diese konnten nach der Behandlung von *bovine lipid extract surfactant* (BLES) mit Fenton-Reagenz fluoreszenzspektroskopisch NFKyn und Kyn nachweisen. Die Bestätigung dieser Ergebnisse an Bacteriorhodopsin (BR) oder Rinderserumalbumin (BSA) war nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Obwohl ein fluoreszenzspektroskopischer Nachweis von NFKyn und Kyn nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C bei diesen beiden Probesubstanzen nicht möglich war, wird im Folgenden der Einfluss der Zugabe von Fenton-Reagenz bei der Solubilisierung von Membranproteinen aus Mitochondrien von *Podospira anserina* untersucht. Dafür werden die juvenilen Kulturen #33 und #40 sowie die seneszenten Kulturen #46 und #47 (siehe Tabelle 5.1.3) jeweils einmal mit regulärem und einmal mit Fenton-Reagenz-haltigem Solubilisierungspuffer (siehe Tabelle 4.7.4) solubilisiert, mittels blau-nativer Gelelektrophorese aufgetrennt und das resultierende Gel mit der nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Methode Coomassie-gefärbt (siehe Abschnitt 4.4.4.2). Im Vergleich zwischen oxidierten Probe und Kontrolle lassen sich bereits auf dem Gel Unterschiede feststellen (siehe Abbildung 5.1.34). Alle vier Kulturen zeigen nach der Behandlung mit Fenton-Reagenz eine Verringerung der Bande von Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$), während die Intensität der direkt darunter gelegenen Bande (rote Pfeile in Abbildung 5.1.34) im Vergleich mit den nicht-oxidierten Proben zugenommen hat. Es wird vermutet, dass es sich bei dieser Band um Superkomplex a (I_1III_2) handelt. Dieser wurde zwar bei der Quantifizierung der Atmungsketten-

komplexe und –superkomplexe (Kapitel 5.1.1) nicht identifiziert, allerdings wurden dort andere *Podospora*-Kulturen analysiert, die außerdem mit einem anderen Medium kultiviert wurden (vgl. Abschnitt 3.5.1). Es kann also angenommen werden, dass die Inkubation mit Fenton-Reagenz während der Solubilisierung zu einer teilweisen Abspaltung der Komplex IV-Kopie des Superkomplexes b und somit zu einem größeren Vorkommen von Superkomplex a führt. In Übereinstimmung damit ist außerdem eine im Vergleich zu den Kontroll-Proben erhöhte Menge an freiem Komplex IV zu erwarten. Zumindest für die beiden juvenilen Kulturen ist dies auch der Fall, hier kann eine größere Bandenintensität von Komplex IV₁ bei den oxidierten als bei den unbehandelten Proben festgestellt werden (gelbe Pfeile in Abbildung 5.1.34). Bei den beiden seneszenten Kulturen kann aufgrund der generell geringeren Bandenintensitäten keine Aussage zu einer veränderten Intensität dieser Bande getroffen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* Oxidation mit Fenton-Reagenz definitiv einen Einfluss auf die Probe hat – hier ganz konkret auf die Stabilität von Superkomplex b – geben jedoch keine Auskunft, inwiefern oxidative Modifikationen im Allgemeinen und die Kynurenylierung des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase

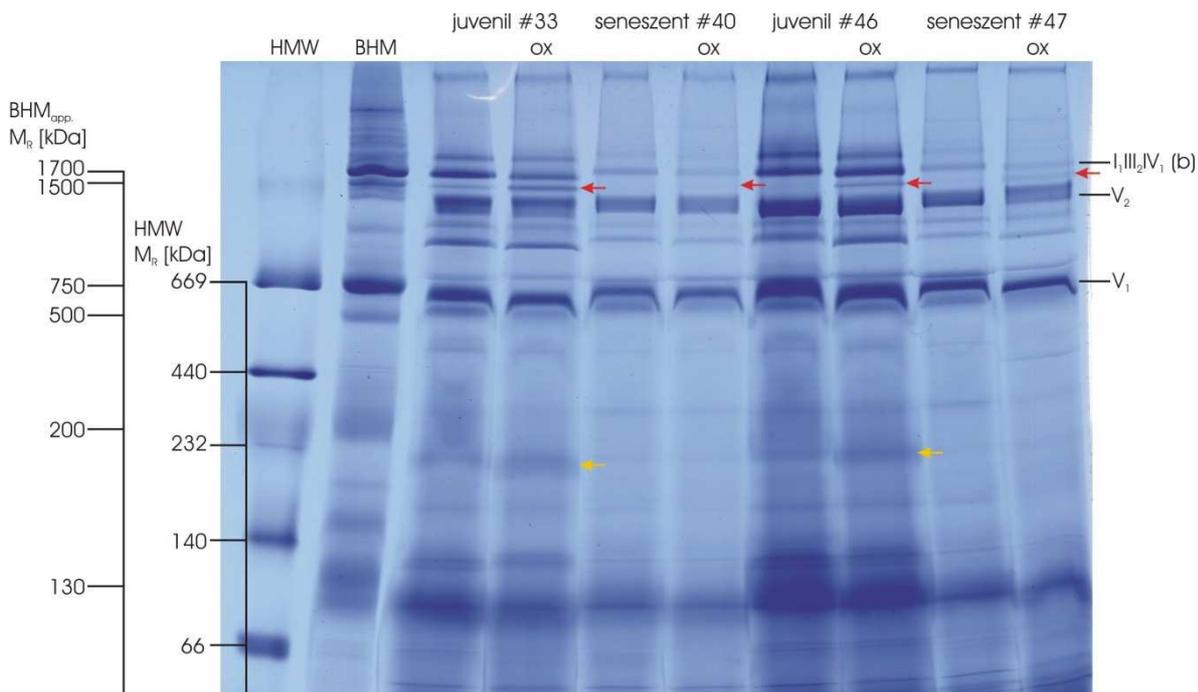


Abbildung 5.1.34 Mit der nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Methode Coomassie-gefärbtes BN-Gel. In den beiden linken Spuren sind 15 μ L HMW-Massenstandard sowie 70 μ g Rinderherzmitochondrien als Referenz aufgetragen. Es folgen je 250 μ g mit einem Digitonin/ Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilierte *Podospora anserina* Mitochondrien der juvenilen Kulturen #33 und #46 sowie der seneszenten Kulturen #40 und #47, die jeweils einmal mit regulärem und einmal mit Fenton-Reagenz-haltigem (ox) Solubilisierungspuffer solubiliert wurden. Die oxidierten Proben zeigen eine Abnahme der Bandenintensität für Superkomplex b ($I_1III_2IV_1$) und gleichzeitig eine verstärkte Intensität der direkt darunter gelegenen Bande (rote Pfeile), bei der es sich vermutlich um Superkomplex a (I_1III_2) handelt. In Übereinstimmung damit zeigt sich eine Zunahme der Komplex IV₁-Bande (gelbe Pfeile) bei den mit Fenton-Reagenz behandelten Proben – zumindest der juvenilen Kulturen. Bei den seneszenten Proben sind die Bandenintensitäten generell geringer, so dass bei diesen keine Aussage über eine veränderte Intensität der Komplex IV₁-Bande gemacht werden kann.

α -Untereinheit von *Podospora anserina* im Besonderen betroffen sind. Um dies zu analysieren werden die Banden des ATP-Synthase Monomers (V_1) und Dimers (V_2) ausgeschnitten und wie in Abschnitt 4.6.2.1 beschrieben für die massenspektrometrische Analyse mittels MRM (Abschnitt 4.6.3) vorbereitet. MS-Analyse und Auswertung der Messdaten wurden von Dr. Sascha Rexroth und Dr. Ansgar Poetsch im Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Bei den mit Fenton-Reagenz behandelten Proben kann eine größere Menge des Peptids ILQWEADFLSHLK, sowohl unmodifiziert als auch in Form von Hydroxy-Tryptophan, *N*-Formylkynurenin und Kynurenin, festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ob dies auf einen effektiveren Verdau, eine effektivere Solubilisierung oder einen anderen Grund zurückzuführen ist, kann nicht beantwortet werden. Die Menge an unmodifiziertem Peptid bleibt jedoch, unabhängig von der vorherigen *in vitro* Oxidation, innerhalb einer Kultur gleich (Daten nicht gezeigt), so dass die Methode nach Manzanares *et al.* (2007)^[151] bei Anwendung während der 30-minütigen Inkubationszeit der Solubilisierung keinen Effekt auf die Kynurenylierung – zumindest des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* – zu haben scheint.

5.1.2.3 Einfluss von SCAVEGRTM auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus *P. anserina*

Um aussagekräftige Daten über oxidative Modifizierungen von Proteinen im Alter zu erhalten, ist es wichtig, artifizielle Oxidationen, die bei der Probenhandhabung und –vorbereitung entstehen können, möglichst auszuschließen. Meist werden dazu Mischungen verschiedener Antioxidantien eingesetzt, die bei der Isolierung der Mitochondrien und/oder Solubilisierung der Membranproteine zugegeben werden. Brewer *et al.*^[136] konnten 2004 zeigen, dass die Zugabe des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGRTM (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.1.2) bei der Isolierung von Mitochondrien aus Rattenhirn zu einer Reduktion oxidiertes Lipide um 40% sowie einer Erhöhung der Respirations-Rate um 15% führt. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits isolierte Mitochondrien aus *Podospora anserina* zur Verfügung stehen, ist eine Untersuchung des Einflusses von SCAVEGRTM bei der Isolierung der Mitochondrien nicht möglich. Stattdessen wird überprüft, ob die Verwendung des Antioxidantien-Cocktails bei der Solubilisierung der Mitochondrien einen Einfluss hat. Da bereits festgestellt werden konnte, dass einer von drei Tryptophan-Resten der ATP-Synthase α -Untereinheit spezifisch oxidiert bzw. kynurenyliert wird (siehe Abschnitt 5.1.2.1), wird der Einfluss von SCAVEGRTM ebenfalls anhand dieser Tryptophan-Reste analysiert.

Analysiert werden die juvenile Kultur #33 sowie die seneszente Kultur #40 (siehe Tabelle 5.1.3). Die isolierten Mitochondrien beider Kulturen werden mittels Digitonin bei einem Detergens/Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilisiert und anschließend mittels BN-PAGE aufgetrennt. Dabei erfolgt die Solubilisierung sowohl der juvenilen als auch der seneszenten Probe einmal mit und einmal ohne Zusatz von 2% (v/v) SCAVEGR™ zum Solubilisierungspuffer (vgl. Tabelle 4.3.1). Zusätzlich werden als Referenz ebenfalls mit und ohne Zusatz von SCAVEGR™ solubilierte Rinderherzmitochondrien (BHM, von engl. *bovine heart mitochondria*) aufgetragen. Das resultierende, mit kolloidalem Coomassie gefärbte (siehe Abschnitt 4.4.4.1) BN-Gel ist in Abbildung 5.1.35 gezeigt. Die Probenvorbereitung für die LC-ESI-MS/MS-Analyse erfolgt wie in Kapitel 4.6.2.1 beschrieben. Die massenspektrometrische Analyse wird von Dr. Sascha Rexroth in der Arbeitsgruppe von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Analysiert werden jeweils Dimer, Monomer und freier F₁-Teil der ATP-Synthase aus den *Podospora anserina* Proben (siehe Abbildung 5.1.35). Die massenspektrometrischen Daten werden mittels der Software Xcalibur (Thermo Electron Corporation) und des BioworksBrowser von Thermo Fisher Scientific verarbeitet. Die Analyse der MS/MS-Spektren erfolgt mittels des Software-Algorithmus SEQUEST. Die monoiso-

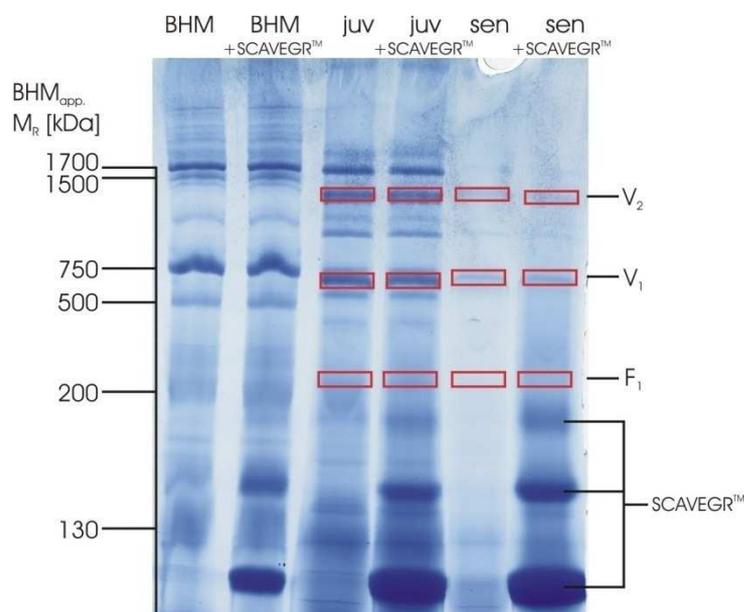
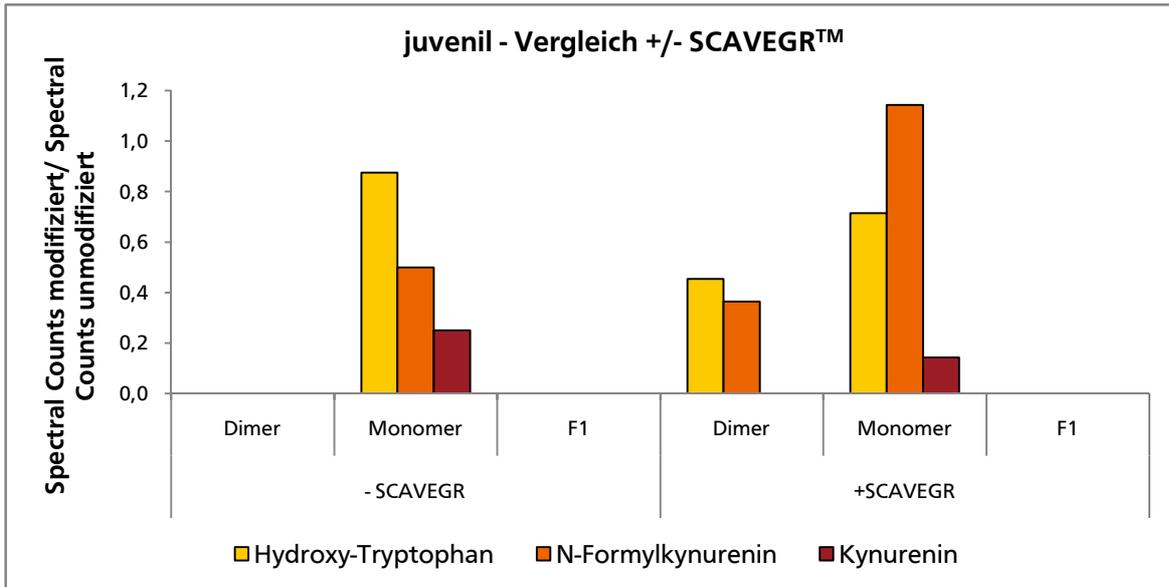


Abbildung 5.1.35 Mit Roti®-Blue gefärbtes BN-Gel. Aufgetragen sind je 70 µg mit und ohne Zugabe des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™ solubilierte Rinderherzmitochondrien (BHM) sowie je 250 µg Mitochondrien aus juvenilen (juv) bzw. seneszenten (sen) Kulturen von *Podospora anserina*, ebenfalls mit und ohne Zugabe von SCAVEGR™. Die Solubilisierung erfolgt in allen Fällen mit dem nichtionischen Detergens Digitonin und einem Protein/Detergens-Verhältnis von 1:4 (w/w). Angegeben ist die Proteinmenge vor Solubilisierung. Die juvenilen und seneszenten *Podospora*-Proben stammen aus den Kulturen #33 und #40 (siehe Tabelle 5.1.3). Die Rinderherzmitochondrien dienen als Massenstandard und zur Identifizierung der ausgewählten Banden in den Proben von *P. anserina*. Die durch Zugabe von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung zusätzlich vorhandenen, sehr stark ausgeprägten Banden, die durch Albumin und die weiteren Bestandteile (siehe hierzu Tabelle 4.1.2) des Antioxidantien-Cocktails verursacht werden sind beschriftet. Die für die massenspektrometrische Analyse ausgewählten Banden des ATP-Synthase Dimers (V₂), Monomers (V₁) und der freien F₁-Kopfguppe (F₁) sind ebenfalls beschriftet sowie durch rote Kästen markiert.

topischen und mittleren Massenabweichungen für Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) werden der Online-Datenbank „UNIMOD protein modifications for mass spectrometry“^[313] entnommen. Zusätzlich wird die Oxidation von Methionin berücksichtigt, da diese häufig als Artefakt bei der Probenhandhabung entsteht^[314]. Es werden die gleichen Filter für die Analyse der MS/MS-Spektren mittels des BioworksBrowser und SEQUEST verwendet, wie schon in Abschnitt 5.1.2.1 (siehe Tabelle 5.1.5). Wie ebenfalls bereits in Abschnitt 5.1.2.1, können auch bei der Analyse von *P. anserina* Mitochondrien mit und ohne Zugabe von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung die beiden Tryptophan-haltigen Peptide YSIVVAATASEAAPLQYLAPFTGASIGEWFR und ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit identifiziert werden. Der dritte Tryptophan-Rest dieser Untereinheit, der sich in der Sequenz KRWNSGNDETKK befindet^[316], wird abermals nicht identifiziert. TrpOH, NFKyn und Kyn können – wie bereits in Abschnitt 5.1.2.1 gezeigt – lediglich für das Peptid ILQWEADFLSHLK festgestellt werden. Mittels der Methode des *Spectral Counting* (vgl. Abschnitt 4.8.2.1) wird die Häufigkeit des Auftretens der drei Modifikationen im Bezug auf unmodifiziertes Tryptophan untersucht. Verglichen werden die Daten für Monomer, Dimer und freie F_1 -Kopfgruppe der ATP-Synthase juveniler und seneszenter *Podospora*-Kulturen mit und ohne Zugabe des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™. In Abbildung 5.1.36 A sind die *Spectral Counts* des modifizierten (TrpOH, NFKyn, Kyn), bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids ILQWEADFLSHLK für die juvenile *Podospora*-Kultur #33 mit und ohne Zugabe von SCAVEGR™ dargestellt. In Abbildung 5.1.36 B findet sich das entsprechende Diagramm für die seneszente Kultur #40. Bei der juvenilen Kultur kann für die freie F_1 -Kopfgruppe der ATP-Synthase weder mit noch ohne Zugabe von SCAVEGR™ oxidiertes Tryptophan identifiziert werden. Allerdings kann bei der Probe des F_1 -Teils der juvenilen Kultur mit SCAVEGR™ nur das Peptid IGLFGGAGVGK der ATP-Synthase identifiziert werden. Das im Rahmen dieser Analyse betrachtete Peptid ILQWEADFLSHLK wird weder mit oxidiertem noch mit unmodifiziertem Tryptophan-Rest detektiert. Da freier F_1 -Kopfteil der ATP-Synthase bei *Podospora anserina* nur in sehr geringer Menge vorkommt (vgl. Abschnitt 5.1.1.1 und hier insbesondere Abbildung 5.1.10), musste das Ausschneiden der entsprechenden Bande im BN-Gel (siehe Abbildung 5.1.35) anhand der ungefähren Position basierend auf der molaren Masse des F_1 -Teils geschehen, da keine Bande erkennbar war. Es können folglich auch nur wenige Peptide der ATP-Synthase in diesen Proben detektiert werden und die anhand der F_1 -Kopfgruppe erhaltenen Ergebnisse für den Einfluss von SCAVEGR™ auf die Oxidation des Tryptophan-Restes des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit müssen als nicht repräsentativ betrachtet werden. Vergleicht man die Ergebnisse für Monomer und Dimer der juve-

A



B

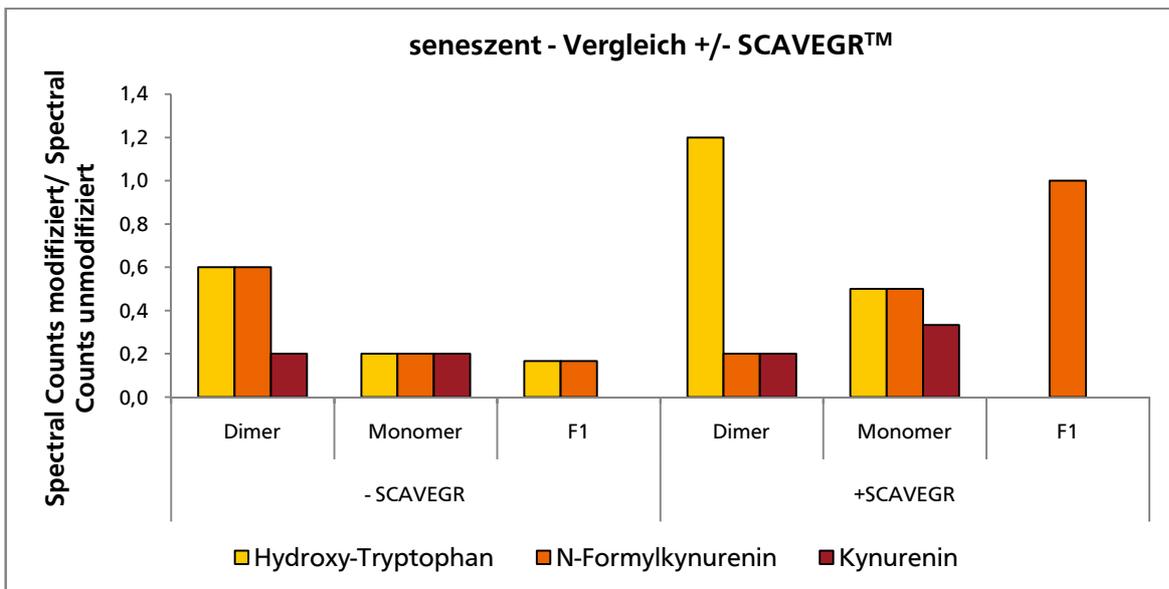


Abbildung 5.1.36 Altersabhängiger Vergleich der Häufigkeit der oxidativen Tryptophan-Modifikationen Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospira anserina* in Bezug auf unmodifiziertes Tryptophan. Aufgetragen sind die *Spectral Counts* des modifizierten (TrpOH, NFKyn, Kyn), bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids für die juvenile Kultur #33 (A) sowie die seneszente Kultur #40 (B), jeweils mit und ohne Zugabe des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™ bei der Solubilisierung. Die x-Achsenbeschriftung gibt an, ob es sich um eine Probe mit oder ohne Zusatz von SCAVEGR™ handelt und ob Monomer, Dimer oder freie F₁-Kopfgruppe (F₁) der ATP-Synthase analysiert wurden. (A) Beim F₁-Teil können keine modifizierten Tryptophan-Reste identifiziert werden, allerdings wurde das Peptid ILQWEADFLSHLK in der Probe ohne SCAVEGR™ gar nicht identifiziert. Dies ist höchstwahrscheinlich auf den sehr geringen Anteil von freier F₁-Kopfgruppe bei *P. anserina* (vgl. Abbildung 5.1.10) zurückzuführen. Das Dimer ist bei der Probe ohne Antioxidantien-Cocktail nicht modifiziert; bei Zugabe von SCAVEGR™ treten jedoch TrpOH und NFKyn auf. Beim Monomer ist die Menge an TrpOH bezogen auf unmodifiziertes Peptid bei der Probe mit SCAVEGR™ geringer, es kann jedoch wesentlich mehr NFKyn detektiert werden als bei der Probe ohne Antioxidantien. (B) Die Zugabe von SCAVEGR™ bewirkt beim Dimer eine Abnahme an NFKyn, allerdings kann wesentlich mehr TrpOH detektiert werden. Beim ATP-Synthase Monomer sind alle drei Modifikationen des Tryptophans bei der mit dem Antioxidantien-Cocktail behandelten Probe in größerer Menge vorhanden. Da die in der vorliegenden Arbeit analysierten *P. anserina* Proben nur sehr wenig freien F₁-Teil besitzen, sind die Daten für diesen nicht aussagekräftig und nur der Vollständigkeit halber dargestellt.

nilen Kultur mit und ohne Zugabe von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung (Abbildung 5.1.36 A), so fällt auf, dass das Dimer ohne Zugabe des Antioxidantien-Cocktails keine modifizierten Tryptophan-Reste enthält, obwohl das unmodifizierte Peptid ILQWEADFLSHLK 7-mal identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Das Monomer weist – unabhängig von der Zugabe von SCAVEGR™ – alle drei oxidativen Modifikationen des Tryptophans auf. Im Vergleich zur Probe ohne SCAVEGR™ zeigt die mit Zugabe des Antioxidantien-Cocktails eine Zunahme von NFKyn – der zweifach oxidierten Modifikation des Tryptophans – im Vergleich zum TrpOH. Kyn liegt in beiden Fällen nur in geringer Menge vor. Bei den seneszenten Proben mit und ohne SCAVEGR™ (Abbildung 5.1.36 B) sind die Ergebnisse für die freie F₁-Kopfgruppe der ATP-Synthase der Vollständigkeit halber ebenfalls dargestellt, müssen jedoch aus den gleichen Gründen wie schon bei der juvenilen Kultur als nicht repräsentativ eingestuft werden. Im Vergleich zwischen den Proben mit und ohne Zusatz des Antioxidantien-Cocktails ist ein vermehrtes Auftreten oxidiertes Peptide bei der Probe mit SCAVEGR™ zu erkennen. Beim Dimer bleibt die Menge an Kyn gleich und die Menge an NFKyn nimmt ab, allerdings kann wesentlich mehr TrpOH detektiert werden als bei der Probe ohne Antioxidantien. Beim ATP-Synthase Monomer treten alle drei Modifikationen des Tryptophans bei der mit SCAVEGR™ behandelten Probe in größerer Menge auf.

Um den Einfluss der SCAVEGR™-Zugabe bei der Solubilisierung auf die Oxidation des Tryptophan-Rests im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit besser bewerten zu können, sind in Abbildung 5.1.37 die addierten *Spectral Counts* für die oxidierten Formen des Tryptophans bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids für die juvenile und seneszente Kultur mit und ohne Zugabe von SCAVEGR™ dargestellt. Da die Daten für die freie F₁-Kopfgruppe, wie bereits früher erläutert, nicht repräsentativ sind, wird auf eine Darstellung verzichtet. Der Vergleich der Proben mit und ohne Verwendung des Antioxidantien-Cocktails bei der Solubilisierung zeigt deutlich, dass die Zugabe von SCAVEGR™ zu einem erhöhten Vorkommen von oxidierten Tryptophan-Resten führt. Das Dimer der juvenilen Probe zeigt ohne den Antioxidantien-Cocktail gar keine oxidierten Tryptophan-Reste; beim Monomer führt die SCAVEGR™-Zugabe zu einem um 23% erhöhten Vorkommen von TrpOH, NFKyn und Kyn. Bei der seneszenten Probe zeigt sich ein ähnliches Bild: Bei Verwendung des Antioxidantien-Cocktails liegen beim Dimer 14% und beim Monomer sogar 122% mehr oxidierte Tryptophan-Reste pro unmodifiziertem Peptid vor als ohne SCAVEGR™. Vom Einsatz bei der Solubilisierung kann somit nur abgeraten werden, da der Antioxidantien-Cocktail die artifizielle oxidative Modifikation – zumindest von Tryptophan – nicht unterbindet oder verringert, sondern sogar zu einem vermehrten Auftreten dieser führt. Dass SCAVEGR™ außerdem durch das Einbringen von zusätzlichen Proteinen (hauptsächlich BSA)

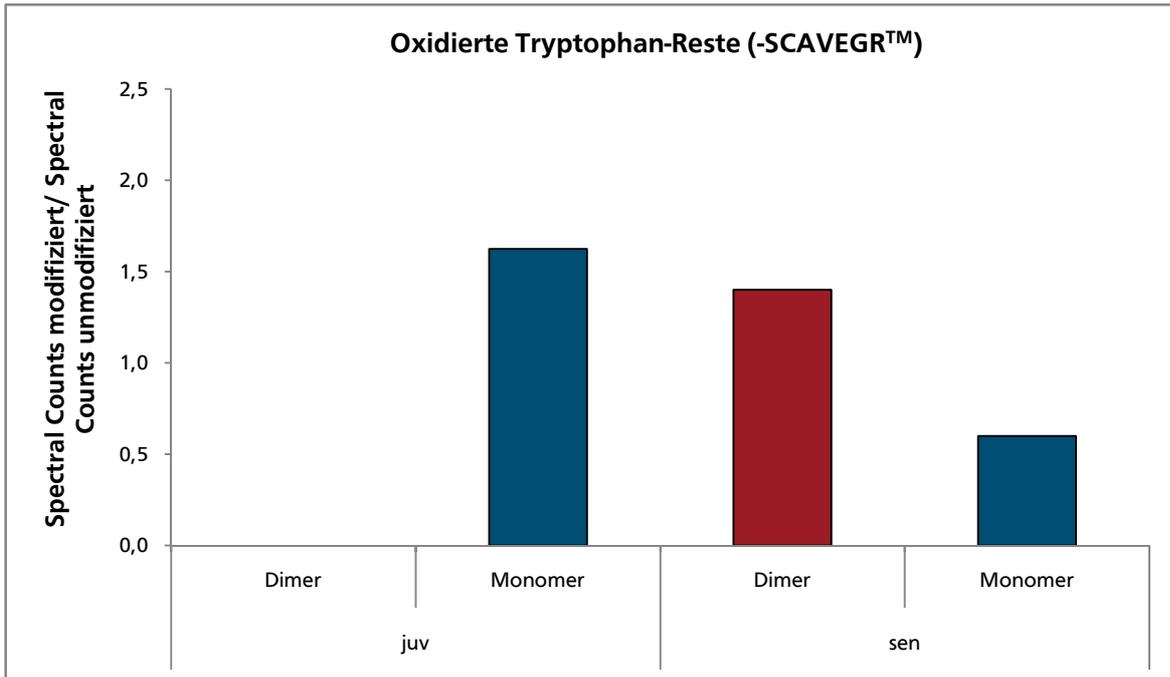
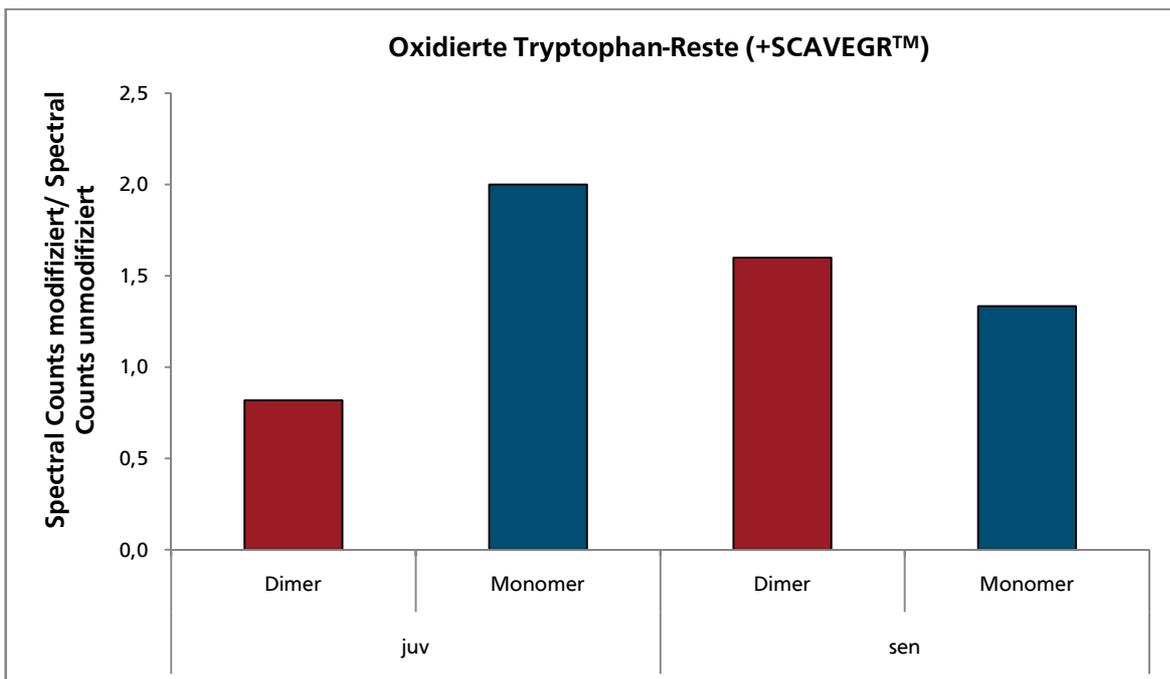
A**B**

Abbildung 5.1.37 Addierte *Spectral Counts* für die oxidierten Formen des Tryptophans (TrpOH, NFKyn, Kyn) bezogen auf die *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit einer juvenilen (#33) und einer seneszenten (#40) Kultur von *Podospira anserina* mit (B) und ohne (A) Zugabe von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung. Die x-Achsenbeschriftung gibt Alter der *Podospira*-Kultur und Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase an. Auf eine Darstellung der Daten für die freie F_1 -Kopfguppe wird verzichtet, da diese – wie bereits früher erläutert – nicht repräsentativ sind. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse für die Solubilisierung mit (B) und ohne (A) Zusatz von SCAVEGR™ zeigt deutlich, dass die Verwendung des Antioxidantien-Cocktails zu einem erhöhten Vorkommen von oxidierten Tryptophan-Resten führt. Das Dimer der juvenilen Probe zeigt ohne SCAVEGR™ gar keine oxidierten Tryptophan-Reste; beim Monomer führen die Antioxidantien zu einem um 23% erhöhten Vorkommen von TrpOH, NFKyn und Kyn. Bei der seneszenten Probe zeigt sich ein ähnliches Bild: Bei Verwendung von SCAVEGR™ liegen beim Dimer 14% und beim Monomer sogar 122% mehr oxidierte Tryptophan-Reste pro unmodifiziertem Peptid vor als ohne den Antioxidantien-Cocktail.

in die Probe, sehr markante Banden in der ersten (vgl. Abbildung 5.1.35) und zweiten Gel-dimension verursacht, die andere interessante Proteine überdecken können, und überdies recht kostspielig ist, sind zwei weitere Punkte, die eher gegen seinen Einsatz sprechen. In der Dissertation von Frenzel (2011)^[207] wurde der Einfluss von SCAVEGR™ bei der Isolierung von Mitochondrien aus Rattenhirngewebe untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Protein-Protein-Interaktionen durch die Verwendung von SCAVEGR™ bei der Isolierung stabiler sind, was an einer größeren Menge von ATP-Synthase Dimeren sowie der Superkomplexe III₂IV₁, I₁III₂ und I₁III₂IV₂ festgemacht wurde. Die spezifischen Enzymaktivitäten der Komplexe I und IV wurden von der Verwendung von SCAVEGR™ nicht beeinflusst. Die Inkubation der isolierten Mitochondrien mit H₂O₂ führte interessanterweise zu einer erhöhten Enzymaktivität von Komplex I in den Superkomplexen I₁III₂ und I₁III₂IV₂ bei der ohne SCAVEGR™ isolierten Probe, während die Probe mit Antioxidantien-Zusatz keine Veränderung zeigte. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zur Theorie der Freien Radikale^[293], kann aber mit der schon von Paracelsus formulierten Theorie der Hormesis^[320] in Einklang gebracht werden. Eine weitere Analyse des Einflusses von SCAVEGR™ wurde von Sandra Thilmany im Arbeitskreis von Prof. Dr. N. A. Dencher an der Technischen Universität Darmstadt durchgeführt (Ergebnisse noch unveröffentlicht). Dafür wurde der Einfluss der Verwendung von SCAVEGR™ bei der Isolierung und/oder Solubilisierung von Rinderherzmitochondrien untersucht. Die Quantifizierung der carbonylierten Proteine mittels OxyBlot identifizierte die Solubilisierung als kritischen Schritt, bei dem der Großteil der Proteinoxidation stattfindet. Ein Vergleich der Menge carbonylierter Proteine vor und nach Solubilisierung zeigte, dass Proteine, die unter Verwendung von SCAVEGR™ isoliert wurden, auch ohne erneute Zugabe des Antioxidantien-Cocktails bei der Solubilisierung kein erhöhtes Vorkommen carbonylierter Proteine aufweisen. Die Intensität des OxyBlot-Signals wurde durch Zugabe von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung nicht beeinflusst. Proben die ohne SCAVEGR™ isoliert wurden, zeigten eine größere Menge carbonylierter Proteine, wenn bei der Solubilisierung ebenfalls auf den Antioxidantien-Cocktail verzichtet wurde. Die Verwendung von SCAVEGR™ bei der Solubilisierung dieser Proben führte zur etwa gleichen Menge carbonylierter Proteine wie bei den Mitochondrien, die mit Antioxidantien isoliert wurden. In Übereinstimmung mit den LC-ESI-MS/MS-Daten für mit und ohne SCAVEGR™ solubilierte *Podospora anserina* Mitochondrien zeigen die Daten von Thilmany (noch unveröffentlicht), dass ein Einsatz des Antioxidantien-Cocktails bei der Solubilisierung nicht notwendig oder sogar nachteilig (vgl. Abbildung 5.1.37) ist. Die Verwendung bei der Isolierung der Mitochondrien scheint hingegen einen positiven Effekt zu haben^[136, 207]. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass SCAVEGR™ zusätzliche Proteine, insbesondere BSA (vgl. Tabelle 4.1.2), in die Probe ein-

bringt und somit die Bestimmung der Proteinkonzentration beeinflusst (Thilmany, Daten nicht veröffentlicht). Da eine möglichst genaue Kenntnis der Proteinkonzentration einer Probe jedoch für eine korrekte Berechnung des Protein/Detergens-Verhältnisses notwendig ist, sollte der Einsatz von SCAVEGR™ nie unüberlegt geschehen. Eine Protein-freie Alternative zum Antioxidantien-Cocktail SCAVEGR™ bietet beispielsweise der Eisenchelator Desferal. Durch die Chelatierung von Fe³⁺-Ionen wird die Entstehung von Fe²⁺-Ionen über die Haber-Weiss-Reaktion^[150] und damit die Entstehung hochreaktiver Hydroxylradikale bei der Fenton-Reaktion^[149] (vgl. Abschnitt 4.7) verhindert. Der Einfluss der Verwendung von Desferal bei der Isolierung von Mitochondrien aus *P. anserina* Kulturen wird in Kapitel 5.1.2.4 diskutiert.

5.1.2.4 Einfluss von Desferal auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus *P. anserina*

Da bei der Analyse oxidativer Modifikationen von Proteinen soweit möglich gewährleistet werden muss, dass durch Probenhandhabung und -bearbeitung keine zusätzlichen artifiziellen Oxidationen entstehen, um den tatsächlich in der Zelle vorliegenden Zustand zu analysieren, ist die Verwendung von Antioxidantien sinnvoll wenn nicht sogar notwendig. Da der Einsatz des kommerziell erhältlichen Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™ zumindest für die Analyse der Kynurenylierung des Tryptophan-Restes im Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* eher nachteilig zu sein scheint (vgl. Abschnitt 5.1.2.3), wird stattdessen der Einsatz des Eisenchelators Deferoxaminmesylat (Desferal) in Erwägung gezogen. Dieser soll direkt bei der Isolierung der Mitochondrien eingesetzt werden und durch die Chelatierung von Fe³⁺-Ionen die Haber-Weiss-^[150] und somit auch die Fenton-Reaktion^[149] verhindern, da durch letztere hochreaktive Hydroxylradikale gebildet werden. Um zu entscheiden, ob für zukünftige Analysen Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien aus Kulturen von *P. anserina* eingesetzt werden soll, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Osiewacz an der Goethe-Universität Frankfurt am Main Mitochondrien ein und derselben Kultur einmal mit und einmal ohne Zusatz von Desferal (Endkonzentration 100 μ M) isoliert (siehe Tabelle 5.1.4). Von diesen beiden Proben werden 2D-BN/SDS-Gele angefertigt, mit der nach Rexroth *et al.* (2003)^[138] modifizierten Methode Coomassie-gefärbt (siehe Abschnitt 4.4.4.2) und die α -Untereinheiten des Monomers und Dimers der ATP-Synthase ausgeschnitten und wie in Kapitel 4.6.2.1 beschrieben für die massenspektrometrische Analyse mittels MRM (Abschnitt 4.6.3) vorbereitet. MS-Analyse und Datenauswertung werden von Dr. Sascha Rexroth im Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Das unmodifizierte Peptid ILQWEADFLSHLK sowie seine Hydroxy-Tryptophan und Kynurenin-Analogons und das Referenzpeptid HSLVIFDDLK werden mit Hilfe von

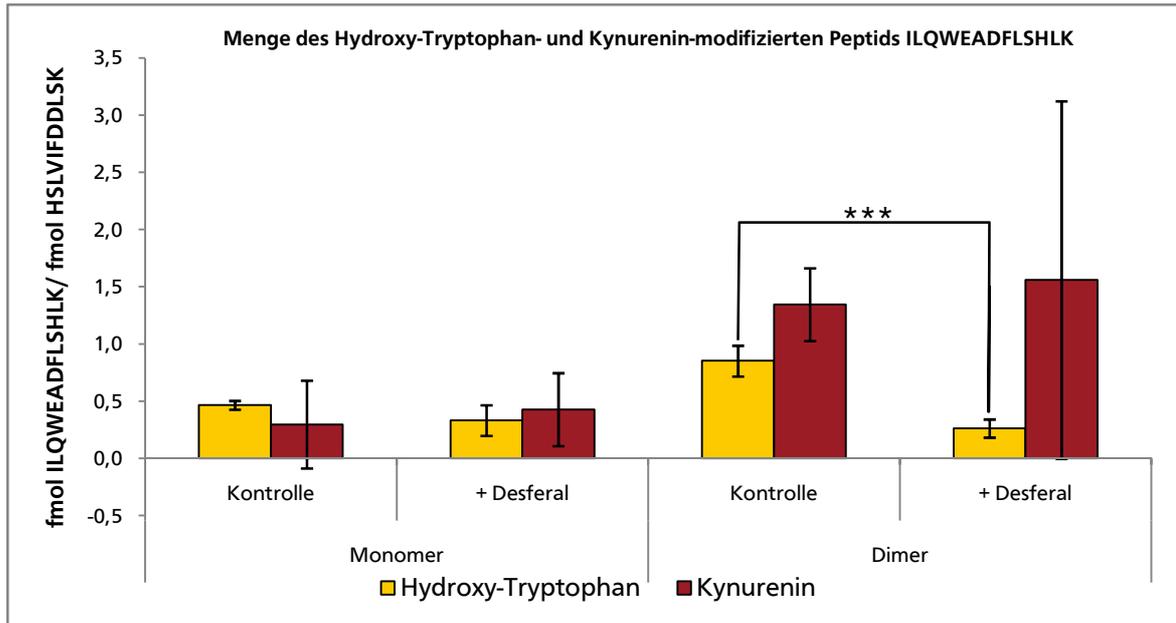
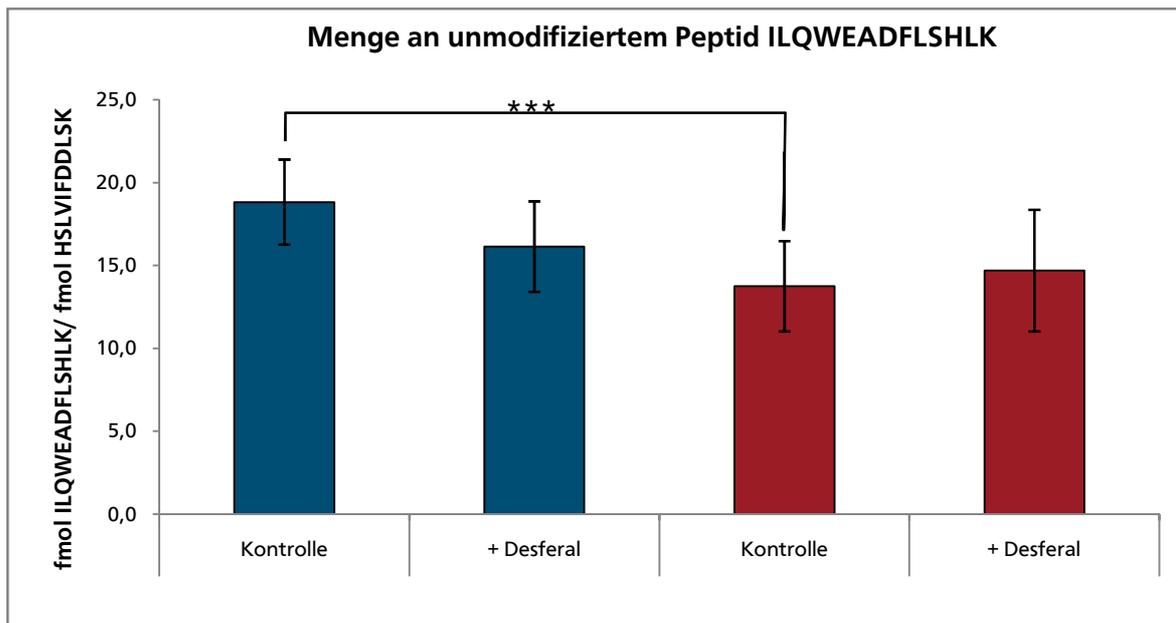
A**B**

Abbildung 5.1.38 Vergleich der oxidativen Modifizierungen des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospora anserina* für Monomer und Dimer der ATP-Synthase mit und ohne Verwendung des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien. Aufgetragen ist jeweils die mittels MRM und AQUA erhaltene Stoffmenge des Peptids ILQWEADFLSHLK bezogen auf die ebenfalls mittels MRM und AQUA ermittelte Stoffmenge des Referenzpeptids HSLVIFDDLK für das Hydroxy-Tryptophan (TrpOH) und Kynurenin (Kyn) enthaltende (A) sowie das unmodifizierte Peptid ILQWEADFLSHLK (B). Die x-Achsenbeschriftung gibt neben dem Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase an, ob Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien verwendet wurde oder nicht. (A) Das Dimer zeigt grundsätzlich mehr modifiziertes Peptid als das Monomer. Die Menge an Kynurenin wird durch die Verwendung von Desferal nicht beeinflusst, die von Hydroxy-Tryptophan lediglich beim ATP-Synthase Dimer, wo die mit Desferal isolierten Mitochondrien 69% weniger TrpOH aufweisen als die ohne den Eisenchelator gewonnenen. (B) Das Vorliegen von unmodifiziertem Peptid ILQWEADFLSHLK ist beim Dimer unabhängig von der Verwendung des Desferals, beim Monomer scheint es zu einer leichten Verringerung der Menge an unmodifiziertem Peptid durch Einsatz des Eisenchelators zu kommen (statistisch nicht signifikant). Bei den ohne Desferal isolierten Kontroll-Proben zeigt das Dimer eine statistisch signifikant verringerte Menge an unmodifiziertem Peptid gegenüber dem Monomer ($p = 0,0039$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Standardpeptiden absolut quantifiziert (AQUA, siehe Abschnitt 4.8.2.3). Dabei werden 8 fmol pro Standardpeptid eingesetzt und die Mengen an Hydroxy-Tryptophan, Kynurenin und unmodifiziertem Peptid ILQWEADFLSHLK können in fmol pro fmol Referenzpeptid HSLVIFDDLSK angegeben werden, wobei das Referenzpeptid als Marker für die Menge an ATP-Synthase dient. Da für das *N*-Formylkynurenin-modifizierte Peptid ILQWEADFLSHLK kein isopenmarkiertes Standardpeptid zur Verfügung steht (siehe Abschnitt 4.8.2.3), ist hier nur eine relative Quantifizierung basierend auf dem Verhältnis der Peakflächen von NFKyn-modifiziertem Peptid und Referenzpeptid HSLVIFDDLSK möglich. Abbildung 5.1.38 A zeigt die Mengen an Hydroxy-Tryptophan- und Kynurenin-modifiziertem Peptid ILQWEADFLSHLK in fmol pro fmol Referenzpeptid HSLVIFDDLSK. Die entsprechenden Ergebnisse für das unmodifizierte Peptid sind separat in Abbildung 5.1.38 B dargestellt, da von diesem in allen Proben eine erheblich größere Menge vorliegt als von den modifizierten Peptiden. Es kann festgestellt werden, dass das Dimer der ATP-Synthase grundsätzlich stärker oxidiert wird als das Monomer. Dies konnte auch schon bei der Analyse von *Podospira*-Mitochondrien, die ohne Zusatz von Desferal isoliert wurden, festgestellt werden (vgl. Abschnitt 5.1.2.1, insbesondere Abbildung 5.1.32) und wird besonders bei Betrachtung der Mengen an unmodifiziertem Peptid (Abbildung 5.1.38 B) deutlich, bei dem ein signifikanter Unterschied zwischen Monomer und Dimer der Kontroll-Proben festgestellt werden kann ($p = 0,0039$). Die Verwendung von Desferal bei der Mitochondrienisolierung hat keinen Einfluss auf die Menge an unmodifiziertem Peptid beim Dimer, wohingegen die mit Zusatz des Eisenchelators isolierten Mitochondrien beim ATP-Synthase Monomer eine geringfügig geringere Menge unmodifizierten Peptids zeigen (statistisch nicht signifikant). Die Mengen an Hydroxy-Tryptophan- und Kynurenin-modifiziertem Peptid ILQWEADFLSHLK (Abbildung 5.1.38 A) werden beim Monomer nicht von der Desferal-Zugabe beeinflusst. Beim Dimer verringert sich jedoch durch die Verwendung des Eisenchelators die Menge an Hydroxy-Tryptophan-haltigem Peptid um 69% ($p = 0,0039$) verglichen mit den ohne Desferal isolierten Proben. Die Kynurenin-Menge ist auch beim Dimer unabhängig von der Verwendung von Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien. Diese Ergebnisse werden auch von den für die *N*-Formylkynurenin-Modifizierung gewonnenen bestätigt (Abbildung 5.1.39). Ohne Verwendung von Desferal besitzt das Dimer 29% mehr NFKyn als das Monomer ($p = 0,0104$), mit Desferal kann beim Dimer 30% weniger NFKyn-modifiziertes Peptid gefunden werden als beim Monomer (statistisch nicht signifikant). Das Monomer zeigt bei NFKyn wie schon bei TrpOH und Kyn (vgl. Abbildung 5.1.38 A) keine Veränderung der Menge an modifiziertem Peptid durch den Einsatz des Eisenchelators. Beim Dimer lässt sich jedoch eine signifikante Abnahme der NFKyn-Menge um 50% durch die Verwendung von Desferal feststellen ($p = 0,0039$).

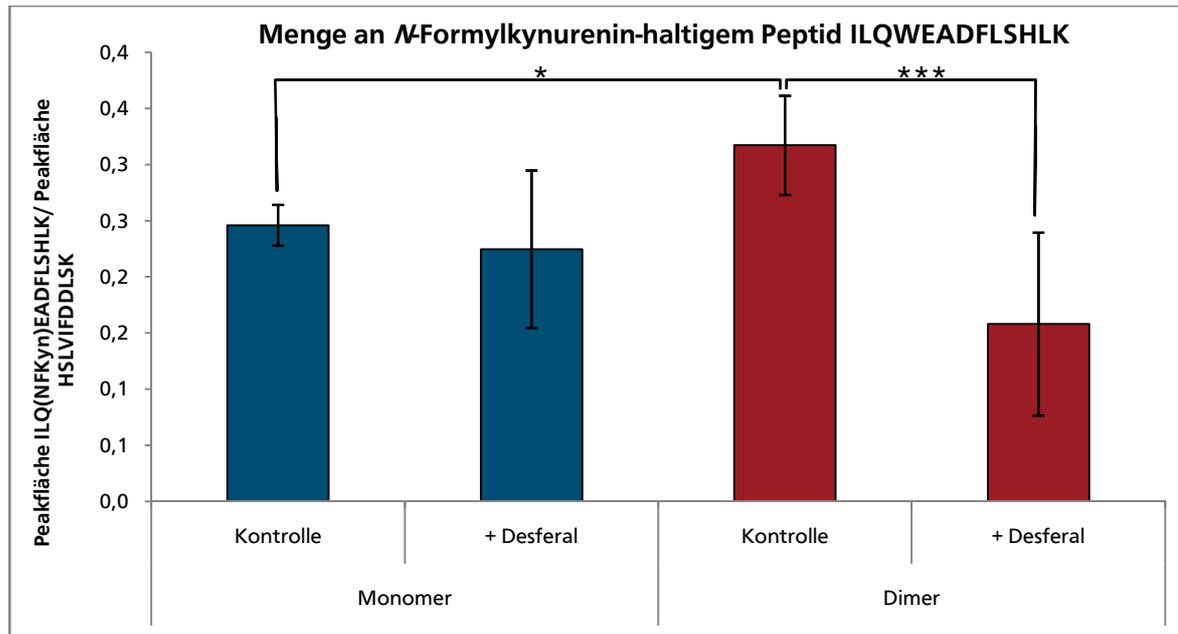


Abbildung 5.1.39 Vergleich der *N*-Formylkynurenin-Modifizierungen des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *Podospira anserina* für Monomer und Dimer der ATP-Synthase mit und ohne Verwendung des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien. Aufgetragen ist jeweils die mittels MRM erhaltene Peakfläche des Peptids ILQ(NFKyn)EADFLSHLK bezogen auf die ebenfalls mittels MRM ermittelte Peakfläche des Referenzpeptids HSLVIFDDLK. Die x-Achsenbeschriftung gibt neben dem Oligomerisierungsgrad der ATP-Synthase an, ob Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien verwendet wurde oder nicht. Ohne Verwendung von Desferal besitzt das Dimer 29% mehr NFKyn als das Monomer ($p = 0,0104$), mit Desferal kann beim Dimer 30% weniger NFKyn-modifiziertes Peptid gefunden werden als beim Monomer (statistisch nicht signifikant). Das Monomer zeigt bei NFKyn wie schon bei TrpOH und Kyn (vgl. Abbildung 5.1.38 A) keine Veränderung der Menge an modifiziertem Peptid durch den Einsatz des Eisenchelators. Beim Dimer lässt sich jedoch eine signifikante Abnahme der NFKyn-Menge um 50% durch die Verwendung von Desferal feststellen ($p = 0,0039$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Es kann geschlossen werden, dass die Verwendung des Eisenchelators Desferal bei der Isolierung von Mitochondrien aus *Podospira anserina* Kulturen die artifizielle Entstehung oxidativer Modifizierungen teilweise verringert. Die massenspektrometrische Analyse des Peptids ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina* zeigt keinen Einfluss des Desferals auf das ATP-Synthase Monomer, für das Dimer kann jedoch eine statistisch signifikante Abnahme der Mengen an Hydroxy-Tryptophan und *N*-Formylkynurenin bei Zusatz des Eisenchelators festgestellt werden (vgl. Abbildungen 5.1.38 und 5.1.39). Für zukünftige Analysen empfiehlt sich somit die Verwendung von Desferal bei der Isolierung der Mitochondrien.

5.1.2.5 Spezifische 4-Hydroxy-2-nonenal Modifikation eines Histidin-Restes der ATP-Synthase β -Untereinheit von *P. anserina*

Die *Podospora anserina* Kulturen #33 (juvenil) und #40 (seneszent, siehe Tabelle 5.1.3) werden zusätzlich zur Kynurenylierung auch auf die Modifikation durch das bei der Lipidperoxidation entstehende 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) analysiert. Probenvorbereitung und Datenanalyse erfolgen wie in 5.1.2.1 beschrieben. Die massenspektrometrische Analyse wird von Dr. Sascha Rexroth im Arbeitskreis von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Da HNE unter Bildung von Michael-Addukten mit Thiol- und Amino-Gruppen reagiert^[304], können potentiell Cystein-, Histidin- oder Lysin-Reste modifiziert werden, wobei die Reaktion mit Lysin jedoch reversibel ist^[306]. Es konnten bereits zahlreiche durch HNE modifizierte Protein nachgewiesen werden^[307], darunter auch die Komplexe IV^[308, 309] und II^[310] der Atmungskette. Mittels der Analyse einer seneszenten und einer juvenilen Kultur von *P. anserina* soll im Folgenden geklärt werden, ob auch die ATP-Synthase durch HNE modifiziert wird. Mittels LC-ESI-MS/MS können in den untersuchten Proben jeweils die α - und β -Untereinheit sowie weitere Untereinheiten der ATP-Synthase und teilweise einige zusätzliche Proteine identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Bis auf ϵ , 8 und 9 enthalten alle Untereinheiten der ATP-Synthase von *P. anserina* mindestens einen Cystein- oder Histidin-Rest^[315] und können somit potentiell durch HNE modifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch lediglich der Histidin-Rest des Peptids LPIHAEAPEFIEQSTTAEILVTGIK der ATP-Synthase β -Untereinheit als HNE-Michael-Addukt identifiziert, obwohl diese Untereinheit fünf weitere Histidin- sowie einen Cystein-Rest besitzt^[315]. Die nicht von der HNE-Modifikation betroffenen Histidin-Reste der ATP-Synthase β -Untereinheit können dabei alle mittels LC-ESI-MS/MS identifiziert werden, das Cystein-haltige Peptid CIAMDGTEGLVR^[315] jedoch nicht, obwohl es einen Instabilität-Index von 18,14^[317] besitzt. Das es trotzdem nicht identifiziert werden kann, ist eventuell auf eine schlechte Ionisierbarkeit des Peptids zurückzuführen. Außer der β -Untereinheit sind keine weiteren Untereinheiten der ATP-Synthase von HNE-Modifikationen betroffen. Es liegt also eine spezifische Modifikation des Histidin-Restes im Peptid LPIHAEAPEFIEQSTTAEILVTGIK der ATP-Synthase β -Untereinheit von *Podospora anserina* vor. In Abbildung 5.1.40 ist die Quantifizierung der Menge an HNE-modifiziertem Peptid bezogen auf unmodifiziertes Peptid mittels *Spectral Counting* (siehe Abschnitt 4.8.2.1) dargestellt. Analysiert werden jeweils Monomer, Dimer und freie F_1 -Kopfgruppe der juvenilen und seneszenten Kulturen #33 und #40 (siehe Tabelle 5.1.3). Da die Analyse der HNE-Modifikationen mit nur einem biologischen Replikat pro Altersstufe und auch nur anhand eines technischen Replikats durchgeführt wird, können keine Standardabweichungen berechnet werden und die quantitativen

Daten können lediglich als vorläufige Einschätzung betrachtet werden. Bei der juvenilen Probe lässt sich kein Unterschied in der Menge an HNE-modifiziertem Peptid zwischen den verschiedenen Formen der ATP-Synthase erkennen, während bei der seneszenten Kultur das Monomer stärker als das Dimer und die freie F₁-Kopfgruppe wiederum stärker als das Monomer modifiziert ist. Im Vergleich mit der juvenilen Probe zeigt das Monomer der seneszenten Kultur keine Veränderung; das Dimer ist weniger und der freie F₁-Teil stärker modifiziert als bei der juvenilen Probe. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis wäre ein verstärkter Abbau HNE-modifizierter ATP-Synthase in seneszenten Kulturen, so dass diese einerseits weniger modifiziertes ATP-Synthase Dimer, andererseits aber auch eine größere Menge modifizierten F₁-Teils aufweisen als juvenile Proben. Da die hier gewonnen quantitativen Ergebnisse der HNE-Modifizierung der ATP-Synthase von *Podospora anserina* aber, wie bereits erwähnt, nur auf je einem biologischen sowie technischen Replikat beruhen, ist eine eindeutige Aussage nicht möglich. Es kann jedoch festgehalten werden, dass lediglich ein einziger Histidin-Rest der ATP-Synthase β -Untereinheit von *Podospora anserina* spezifisch durch HNE modifiziert wird, während andere Histidin- oder Cystein-Reste der gleichen Untereinheit, sowie andere Untereinheiten der ATP-Synthase nicht betroffen sind.

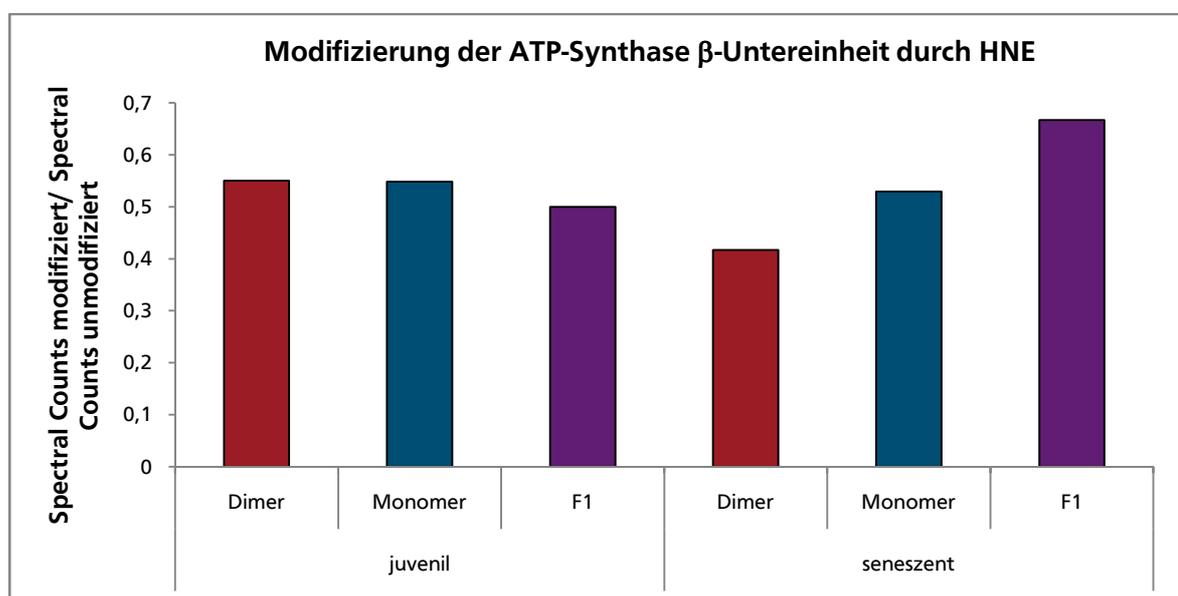


Abbildung 5.1.40 Vergleich der Menge an HNE-modifiziertem Histidin im Peptid LPIHAEAPEFIEQSTTAEILVTGIK der ATP-Synthase β -Untereinheit von *Podospora anserina* für Monomer, Dimer und freie F₁-Kopfgruppe (F1) der juvenilen und seneszenten Kulturen #33 und #40 (siehe Tabelle 5.1.3). Aufgetragen sind jeweils die mittels LC-ESI-MS/MS erhaltenen *Spectral Counts* des modifizierten Peptids bezogen auf die ebenfalls mittels LC-ESI-MS/MS ermittelten *Spectral Counts* des unmodifizierten Peptids. Die x-Achsenbeschriftung gibt neben dem Alter der Kultur außerdem an, ob es sich um Monomer, Dimer oder freien F₁-Teil der ATP-Synthase handelt. Die juvenile Kultur zeigt unabhängig davon, ob Monomer, Dimer oder freie F₁-Kopfgruppe betrachtet werden, die gleiche Menge an HNE-modifiziertem Peptid. Bei der seneszenten Probe ist hingegen das Monomer stärker modifiziert als das Dimer und der F₁-Teil weist nochmals mehr Modifikationen auf als das Monomer. Im Vergleich zwischen juveniler und seneszenter Kultur zeigt sich beim Monomer kein Unterschied; das Dimer der seneszenten Kultur ist jedoch weniger und der F₁-Teil stärker modifiziert als bei der juvenilen Probe.

5.1.2.6 Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine aus *P. anserina* mittels MudPIT

Mittels der in Abschnitt 4.6.2.3 beschriebenen multidimensionalen Proteinidentifikations-Technik (MudPIT, von engl. *multidimensional protein identification technology*) werden die im Verhältnis 1:1:1 gemischten seneszenten Kulturen #60, #61 und #62 von *Podospora anserina* (siehe Tabelle 5.1.1) auf das Vorhandensein posttranslationaler Modifikationen untersucht. Da dabei die isolierten Mitochondrien in ihrer Gesamtheit verdaut werden, umfasst diese Analyse potentiell alle in der Probe enthaltenen Proteine. Die Identifizierung weiterer posttranslationaler Modifikationen ist wichtig, um für weiterführende Studien vielversprechende Zielproteine zur Verfügung zu haben, deren intensivere Analyse für die Altersforschung von Bedeutung sein könnte. Die MudPIT-Analyse wird von Dr. Ansgar Poetsch in der Arbeitsgruppe von Prof. Rögner an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Die Datenanalyse erfolgt ebenfalls durch Dr. Ansgar Poetsch sowie durch freundliche Unterstützung von Dr. Christian Trötschel.

Neben weiteren Proteinen mit einer Kynurenin-Modifizierung können Proteine mit Allysin, acetyliertem Lysin und zu Glutamat-Semialdehyd (GluSA) umgesetztem Arginin identifiziert werden. Bei Allysin handelt es sich um ein Derivat des Lysins bei dem die Aminogruppe der Seitenkette durch eine oxidative Desaminierung zum Aldehyd umgesetzt wurde^[321]. In Tabelle 5.1.9 findet sich eine Übersicht der identifizierten Proteine mit diesen Modifikationen. Zusätzlich weist eine sehr große Anzahl von Proteinen oxidierte Prolin-Reste auf (Daten nicht gezeigt). Wie Tabelle 5.1.9 zeigt, können neben weiteren Proteinen der oxidativen Phosphorylierung unter anderem auch Histone, Transkriptionsfaktoren, Proteine aus Citratzyklus und Glycolyse sowie ein Protein der für Pilze charakteristischen Woronin-Körper identifiziert werden. Bei drei verschiedenen Histonen sind acetylierte Lysin-Reste vorhanden. Dabei handelt es sich jedoch um eine enzymatisch regulierte posttranslationale Modifikation, da bestimmte Lysin-Reste bei Histonen der Acetylierung und Deacetylierung durch Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen unterliegen, was der Regulierung der Transkription dient^[181]. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Acetylierung von Histonen für die normalen kognitiven Funktionen verantwortlich ist und eine Deregulierung womöglich an der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Krankheiten, wie beispielsweise Chorea Huntington und der Alzheimer- sowie Parkinson-Krankheit beteiligt ist^[322-324]. Eine Analyse der altersabhängigen Acetylierung von Histonen ist somit durchaus von Interesse, sollte jedoch aufgrund ihrer potentiellen Auswirkungen auf kognitive Fähigkeiten in Vertebraten und nicht in *Podospora anserina* untersucht werden. Von potentiell Interesse – auch für eine Analyse in *P. anserina* – sind weiterhin die Kynurenine bei der Cytochrom-c-Oxidase

(Komplex IV) sowie Enzymen des Citratzyklus, wie Isocitrat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase. Die im Rahmen der MudPIT-Analyse beispielsweise bei der ATP-Synthase, Komplex IV und einem Hitzeschockprotein identifizierte Oxidation von Lysin zu Allysin wurde unter anderem auch im Crystallin des menschlichen Auges gefunden und steht dort im Zusammenhang mit Altern und Diabetes^[325], so dass eine Analyse dieser Modifikation ebenfalls von Interesse sein könnte. Als ein möglicher Marker für das Altern kommt außerdem das Vorliegen von Glutamat-Semialdehyd (GluSA) in Frage, da Requena *et al.*^[326] bereits 2001 GluSA zusammen mit Allysin als Hauptprodukt Metall-katalysierter Proteinoxidation während des Alternsprozesses postulierten.

Die mittels der MudPIT-Analyse gewonnenen Daten über posttranslationale Modifikationen von Proteinen seneszenten *Podospira anserina* Kulturen liefern Zielproteine für die zukünftige Analyse altersabhängiger Veränderungen des (mitochondrialen) Proteoms dieses Modellorganismus und Anregungen für die Suche nach ebensolchen Modifikationen bei anderen Organismen wie beispielsweise Ratte oder auch in menschlichen Zellkulturen.

Tabelle 5.1.9 Mittels MudPIT-Analyse der Mitochondrien aus drei im Verhältnis 1:1:1 gemischten seneszenten *Podospira anserina* Kulturen identifizierte, posttranslational modifizierte Proteine. Angegeben sind jeweils das Protein mit dem dazugehörigen Peptid, das die Modifikation trägt sowie Art und Position der Modifikation. Mittels der CDS-Nummer kann auf die Sequenz-Information des entsprechenden Proteins zugegriffen werden^[315]. GluSA: Glutamat-Semialdehyd, Kyn: Kynurenin.

CDS	Protein Peptid	Modifikation
Oxidative Phosphorylierung		
Pa_7_570	Putative cytochrome c oxidase polypeptide IV TMADYVKPEYW	Kyn W11
Pa_6_5480	cytochrome c oxidase polypeptide 5 encoded by the cox5 gene AFAKPAPATMTKEWQEATNEYLK	Allysin K4
Pa_2_12970	Putative Cytochrome b-c1 complex subunit 7 QMGLKADDLISEENADVLKALGR	Allysin K5+K19
Pa_3_8090	Putative mitochondrial ATP synthase subunit 5 precursor DPKLVGILEAPTLAADKSAIVSELTK	Allysin K3
Pa_6_5610	Putative Mitochondrial precursor of ATP synthase subunit beta GAKAVDTGAPITIPVGPATLGR	Allysin K3

Tabelle 5.1.9 Fortsetzung.

CDS	Protein Peptid	Modifikation
Citratzyklus und Glycolyse		
Pa_5_5370	Putative dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase QEESKPAASAPPPK	Allysin K5
Pa_3_2310	Putative mitochondrial dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex precursor MPALSPTMTAGNIGAWNK	Kyn W16
Pa_6_2730	Putative Isocitrate dehydrogenase .NAD. subunit 2 TPISWEPINVDPILKDGK	Kyn W5
Pa_3_6780	citrate synthase mitochondrial precursor encoded by the cit1 gene APGGSEPLPEGLFWLLLTGEVPTQQVR DLSADWAAR	Kyn W14 Kyn W6
Pa_3_9290	Putative ATP-citrate synthase subunit 1 GQELLYAGMPISDVFREDIGIGGVMSLLWFRRR VKSRNNPDLRVELVK	GluSA R31+R32+R33 GluSA R10
Histone		
Pa_5_5410	Histone H2B KPANKAPATASKAPEK DAGKKTAASGEK	Acetyl K1+K5+K12 Acetyl K4+K5
Pa_7_2550	Putative histone H4 GKGGKGLGKGGAKR	Acetyl K2+K5+K9+K13
Pa_6_5350	Putative Histone H3 YQKSTELLIR	Acetyl K3
Chaperone		
Pa_6_2570	Putative Mitochondrial of precursor Heat shock protein SSC1 KDSNIDLTGDRMAIQR	Allysin K1
Transporter		
Pa_3_9000	Putative Protein transport protein SEC31 DVGAWNDLPESMAAK	Kyn W5
Aminosäure-Metabolismus		
Pa_1_14630	Putative mitochondrial protein arg-6 precursor .Contains. N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphate reductase. ATSVAIHHPGDLQKELFTDSGAGTLIR	Allysin K14
Transkription und Translation		
Pa_6_2660	Putative cytosolic translation elongation factor 2 .eEF2. VLADDFGWDVTDAR IWAFGPDGNGANLLVDQTK	Kyn W8 Kyn W12
Pa_1_19720	Cytosolic translation elongation factor 1 subunit A .eEF1A. encoded by the AS4 gene FNEIIKETSNIK	Allysin K6+K13

Tabelle 5.1.9 Fortsetzung.

CDS	Protein Peptid	Modifikation
Transkription und Translation - Fortsetzung		
n/a	Putative translation initiation factor RDPTNYRPRINKASSHSSWR	Kyn W19
Pa_5_4340	Putative eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9 SFAQQDTPAGPDGEAK	Allysin K16
Pa_1_14470	Putative nascent polypeptide-associated complex subunit beta KLNVPQIQAIIEEVMFKSDGNVIHFAAPK	Allysin K1+K17+K29
Pa_1_610	Putative cytosolic 60S ribosomal protein Rpl23 LNRLPAGGVGDMVMATVK	Allysin K18
Pa_2_2360	Putative cytosolic 60S ribosomal protein Rpl36 isoform 1 RTAFVRDLVKEVAGLAPYER	GluSA R6+R20
Pa_3_9410	Putative PAB1-binding protein KQADAARHSKARVDK	Allysin K1+K10+K15 GluSA R12
Pa_6_6670	Putative Bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase SALKKAEKAAMAAQK	Allysin K8+K11+K16
Pa_1_20630	Ami1 nuclear positioning protein encoded by the ami1 gene MLQDARDEVEKLRSDPHAPKK	Allysin K11 GluSA R6+R13
Pa_7_6470	Pamus-53 DNA ligase 4 encoded by the Pamus-53 gene VKEEEKER FRKLRLDK	GluSA R8 GluSA R2+R5
Andere Proteine		
Pa_1_17000	Putative Woronin body major protein precursor HEX1 QNLPVIDQSSLWNR	Kyn W12
Pa_3_10800	Putative Sulfide.quinone oxidoreductase. mitochondrial precursor NVWSAGDASSLPTSK RAFYHLKKDFFPWVYYK	Kyn W3 Allysin K7+K8
Pa_1_13340	mtHMG1 mitochondrial protein encoded by the mthmg1 gene NDAALINWITTYPVETIEAANLAR	Kyn W8
Pa_6_5220	Putative Vesicular-fusion protein SEC18 TLIARQIGKMLNAREPK	Allysin K17 GluSA R5
Pa_1_23950	Guanine nucleotide-binding protein alpha subunit encoded by the mod-D gene SNKIDRDLEEDSKRLR	GluSA R6+R14
Pa_6_3140	Putative Syntaxin-binding protein 2 RQVENRQRIIVFVAGGATYSEAR	GluSA R1+R8+R23

5.2 *Caenorhabditis elegans*

5.2.1 Einfluss des Alterns auf das mitochondriale Proteom des *C. elegans* Wildtyps N2 und die Mutante *daf-2*(e1370)

Das *daf-2*-Gen von *Caenorhabditis elegans* codiert für den einzigen in diesem Fadenwurm exprimierten Insulin/IGF-1 Rezeptor^[87] und Mutationen dieses Gens führen zu einer gravierenden Verlängerung der Lebensspanne um bis zu 150%^[75, 88, 89]. Anhand der in Tabelle 3.5.4 aufgelisteten Proben von je 2 oder 8 Tage alten Tieren des *C. elegans* Wildtyps N2 und einer langlebigen *daf-2*-Mutante (*daf-2*(e1370)) sollen altersabhängige Veränderungen des mitochondrialen Proteoms – insbesondere der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung – vergleichend untersucht werden. Die Proben wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jacques R. Vanfleteren, Universität Gent, Belgien, zur Verfügung gestellt. Die *daf-2*(e1370) Tiere besitzen einen im Vergleich zum Wildtyp veränderten Metabolismus, der teilweise Ähnlichkeiten mit dem Dauer-Stadium aufweist^[2]. Das Dauer-Stadium ist ein Entwicklungsstadium, das auf das langzeitige Überleben des Organismus ohne Nährstoffzufuhr ausgelegt ist und führt zu einer Verringerung des Stoffwechsels und dem Übergang zu einer teilweise anaeroben Lebensweise^[65-67]. Erwachsene *daf-2*(e1370) Tiere nehmen erheblich weniger Futter auf und verbrauchen weniger CO₂ als der Wildtyp^[90]. Bei der Analyse der Mitochondrien aus *C. elegans* muss weiterhin beachtet werden, dass dieser mehrere Isoformen des Vitellogenins exprimiert^[327], das ein Vorläufer-Protein für das wichtigste Eidotterprotein Vitellin ist^[328]. Vitellogenin kommt in nahezu allen Weibchen oviparer Organismen vor^[329], in geringeren Mengen auch bei männlichen und noch nicht geschlechtsreifen Tieren^[330, 331]. Die eigentliche Aufgabe des Vitellogenins ist es, als Energiereserve bei der Entwicklung des Embryos zur Verfügung zu stehen. Neuere Studien zeigen jedoch, dass es darüber hinaus noch weitere Funktionen zu besitzen scheint^[329]. Für *C. elegans* konnte beispielsweise eine antioxidative und damit lebensverlängernde Wirkung des Vitellogenins festgestellt werden^[332]. Da das Vitellogenin bei der Gewinnung der Mitochondrien nur schwer abzutrennen ist, muss immer damit gerechnet werden, dass es zu einem gewissen Anteil in den Proben von *C. elegans* vorliegt und bei der gelelektrophoretischen Analyse eventuell andere Proteine überdeckt. Auch bei der Bestimmung der Proteinkonzentration könnte es sich negativ auswirken, da bei einem hohen Vitellogenin-Gehalt wesentlich weniger andere Proteine in der Probe enthalten sind als in einer Probe mit identischer Proteinkonzentration aber geringerem Vitellogenin-Gehalt.

Tabelle 5.2.1 Für die in Abbildung 5.2.1 dargestellten 2D-BN/SDS-Gele von *Caenorhabditis elegans* solubilisierte Proteinmengen unter Angabe von Stamm und Alter.

Stamm	Alter [d]	solubilisierte Proteinmenge [μ g]
N2	2	303,3
	8	447,7
<i>daf2(e1370)</i>	2	236,5
	8	199,2

In Abbildung 5.2.1 sind 2D-BN/SDS-Gele der vier verschiedenen Proben von *Caenorhabditis elegans* dargestellt. Untersucht werden Veränderungen zwischen dem Wildtyp (N2) und der Mutanten *daf-2(e1370)* (*daf-2*) von jeweils 2 und 8 Tage alten Tieren. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die 2D-BN/SDS-Gele auf der Solubilisierung unterschiedlicher Proteinmengen beruhen (siehe Tabelle 5.2.1). Während das 2D-BN/SDS-Gel des 8 Tage alten Wildtyps – obwohl hier die größte Proteinmenge aufgetragen ist – eine starke allgemeine Abnahme der Menge an Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung und eine starke Zunahme der Vitellogenin-Menge verglichen mit dem 2 Tage alten Wildtyp zeigt, ist bei der *daf-2*-Mutanten generell weniger Vitellogenin vorhanden – bei alten Tieren sogar eher weniger als bei jungen – und der altersabhängige Rückgang der Menge an Atmungskettenkomplexen und –superkomplexen ist wesentlich geringer. Berücksichtigt man, dass auf dem 2D-BN/SDS-Gel der 8 Tage alten *daf-2*-Mutanten sogar etwas weniger Protein aufgetragen ist als bei den 2 Tage alten, so kann sogar ein kompletter Erhalt der Proteinmenge angenommen werden. Individueller Komplex I kann bei keiner der Proben detektiert werden und individueller Komplex IV liegt jeweils nur in sehr geringer Menge vor (gelbe Pfeile). Bei der Probe des 8 Tage alten Wildtyps ist eine Identifizierung von Komplex IV aufgrund der enormen Vitellogenin-Menge gar nicht möglich. Auch individuelles Komplex III Homodimer (III_2) kommt in allen Proben nur in geringer Menge vor (grüne Pfeile). Die Gesamtmenge von Komplex I und jeweils der Hauptteil der Komplexe III_2 und IV liegt in Form von Superkomplexen vor. Identifiziert werden können nur Superkomplexe, die Komplex I und III_2 enthalten (rote Pfeile), also die Zusammensetzung $I_1III_2IV_{0-n}$ aufweisen. Es kann weder der Superkomplex III_2IV_1 , der aus diversen Organismen bekannt ist^[1, 4, 134, 197, 268], noch I_1IV_1 identifiziert werden. Letzterer konnte bisher jedoch auch nur in Rinderherzmitochondrien^[3-5], dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*^[6, 7] und der Hefe *Yarrowia lipolytica*^[8] gefunden werden und wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig auch im Türkisen Prachtgrundkärpfling *Nothobranchius furzeri* nachgewiesen (siehe Kapitel 5.4.2). Da die hier verwendete Silberfärbung keinen linearen Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Färbeintensität aufweist und den 2D-BN/SDS-Gelen außerdem unterschiedliche Proteinmengen zugrunde liegen (siehe Tabelle 5.2.1), sind qualitative Aussagen schwierig. Jedoch scheinen bei den

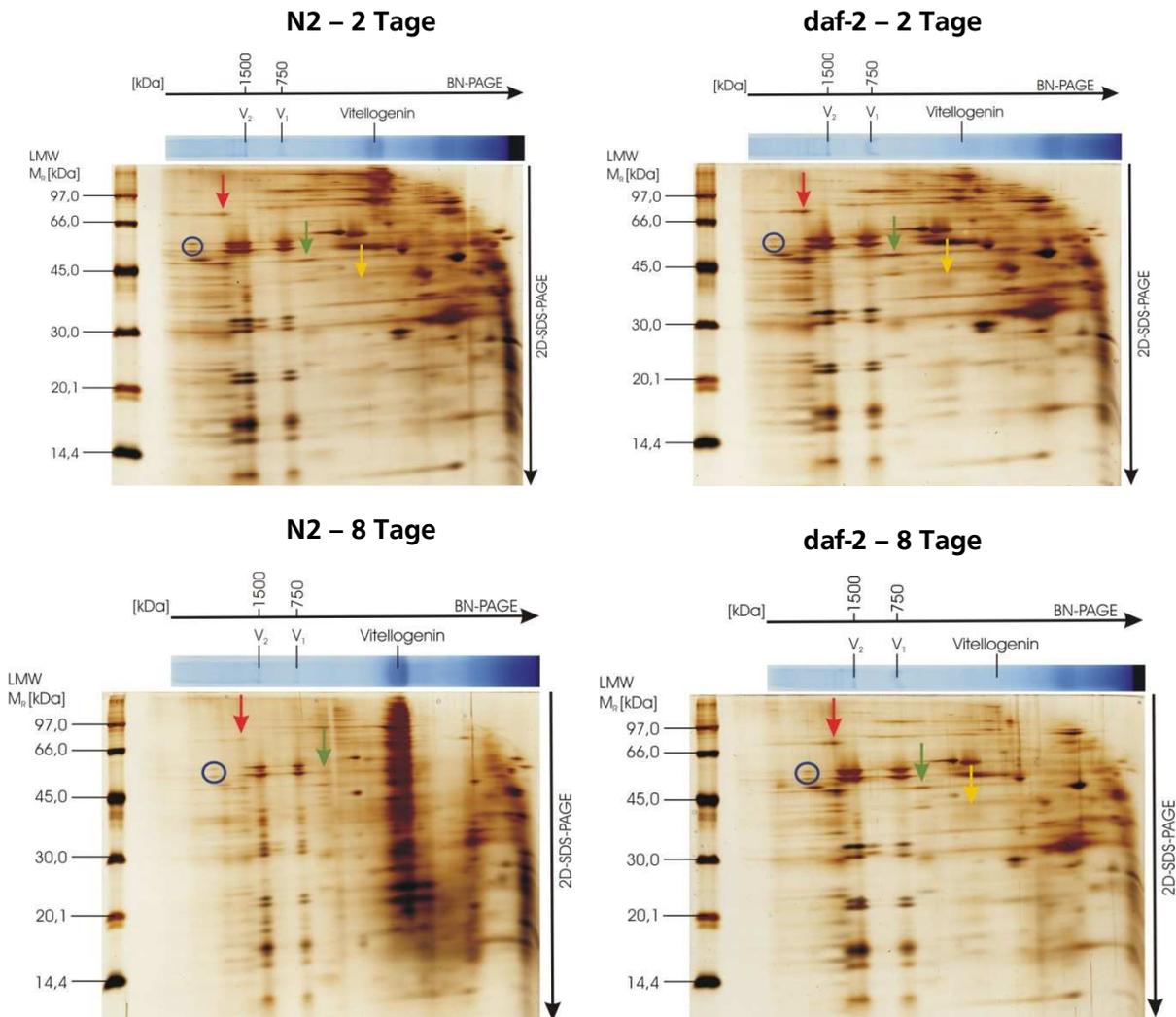


Abbildung 5.2.1 Silbergefärbte 2D-BN/SDS-Gele der *Caenorhabditis elegans* Proben aus Tabelle 3.5.4. Für die erste Dimension werden die in Tabelle 5.2.1 aufgeführten Proteinmengen mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilisiert. Links sind jeweils 2 μ l des LMW-Massenstandards aufgetragen. Über jedes 2D-BN/SDS-Gel ist ein ungefärbter Gelstreifen derselben Probe in der ersten Dimension gelegt, um die Migration der denaturierten Komplexe und Superkomplexe in ihre Untereinheiten zu visualisieren. α - und β -Untereinheit des mutmaßlichen ATP-Synthase Tetramers (V_4) sind durch einen blauen Kreis gekennzeichnet. Die gelben Pfeile weisen auf individuellen Komplex IV, die grünen auf individuellen Komplex III_2 und die roten auf die Superkomplexe $I_1III_2IV_{0-n}$ hin. Während der Wildtyp (N2) eine starke generelle Abnahme der Proteinmenge mit dem Alter zeigt, ist dies bei der *daf-2*-Mutanten nicht der Fall, obwohl beim 8 Tage alten Wildtyp 447,7 μ g und bei der gleich alten Mutante nur 199,2 μ g Protein aufgetragen sind. Die Vitellogenin-Menge ist beim Wildtyp generell höher als bei der *daf-2*-Mutanten und nimmt bei diesem mit dem Alter enorm zu, während auf dem Gel der 8 Tage alten *daf-2*-Mutante tendenziell eher weniger Vitellogenin vorhanden ist als auf dem der 2 Tage alten. Individueller Komplex I kann auf keinem der vier Gele detektiert werden, und auch die Komplexe III_2 (grüne Pfeile) und IV (gelbe Pfeile) liegen nur in sehr geringer Menge als individuelle Komplexe vor. Beim 8 Tage alten Wildtyp kann aufgrund der enormen Vitellogenin-Menge gar kein individueller Komplex IV detektiert werden. Somit liegen die Gesamtmenge von Komplex I und die Hauptmengen der Komplexe III_2 und IV in Form von Superkomplexen vor. Dabei können nur Superkomplexe mit der Beteiligung von Komplex I und III_2 , also der Zusammensetzung $I_1III_2IV_{0-n}$ identifiziert werden. Soweit eine solche Aussage anhand silbergefärbter Gele möglich ist, liegen bei der 2 Tage alten *daf-2*-Mutante geringfügig mehr Superkomplexe vor als beim gleich alten Wildtyp. Kaum noch Superkomplexe sind – trotz der hohen aufgetragenen Proteinmenge (vgl. Tabelle 5.2.1) – auf dem 2D-BN/SDS-Gel des 8 Tage alten Wildtyps zu erkennen, während bei der gleich alten *daf-2*-Mutante die Menge erheblich größer ist und in etwa der des 2 Tage alten Wildtyps zu entsprechen scheint. Die ATP-Synthase kann auf allen vier Gelen in ihrer monomeren (V_1) und dimeren (V_2) Form detektiert werden, wobei das Verhältnis dieser beiden Formen unabhängig vom Alter sowohl beim Wildtyp als auch bei der *daf-2*-Mutante etwa 1:1 beträgt. Ebenfalls bei allen Proben identifiziert werden kann ein höheres Oligomer der ATP-Synthase, vermutlich das Tetramer (V_4 , blaue Kreise), welches beim 2 Tage alten Wildtyp in etwas größerer Menge vorzuliegen scheint als bei der gleich alten Mutante.

2 Tage alten *daf-2*-Mutanten – trotz geringerer aufgetragener Proteinmenge – mehr Superkomplexe vorzuliegen als beim gleich alten Wildtyp. Da die Menge der Atmungskettenkomplexe mit dem Alter generell abnimmt – bei der *daf-2*-Mutante allerdings in wesentlich geringerem Maße als beim Wildtyp – ist dies auch für die Superkomplexe der Fall. Doch während der 8 Tage alte Wildtyp nur noch eine sehr geringe Menge von Superkomplexen besitzt, scheinen es bei der gleich alten Mutante nur geringfügig weniger zu sein, als beim 2 Tage alten Wildtyp. Die ATP-Synthase kann in allen vier Proben als Monomer (V_1) und Dimer (V_2) detektiert werden, wobei das Verhältnis dieser beiden Formen – soweit dies anhand silbergefärbter Gele abgeschätzt werden kann – etwa 1:1 beträgt. Das Monomer-Dimer-Verhältnis scheint sich dabei, unabhängig vom Alter sowohl beim Wildtyp als auch bei der *daf-2*-Mutante, nicht zu verändern. Neben monomerer und dimerer ATP-Synthase können im höheren Massenbereich aller Proben ein weiteres Mal die charakteristischen Banden der α - und β -Untereinheit detektiert werden (blauer Kreis). Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das Tetramer (V_4) der ATP-Synthase. Bei den Proben 2 Tage alter *C. elegans* scheint der Wildtyp eine geringfügig größere Menge V_4 zu besitzen als die *daf-2*-Mutante, während es sich bei den 8 Tage alten Proben umgekehrt verhält. Allerdings ist beim 2 Tage alten Wildtyp auch eine größere Proteinmenge aufgetragen als bei der gleich alten *daf-2*-Mutante und beim alternden Wildtyp nimmt die Gesamtproteinmenge generell stärker ab. Das Ergebnis einer beträchtlichen altersabhängigen Abnahme wichtiger Proteinkomplexe beim Wildtyp, die in der *daf-2*-Mutanten erheblich abgemildert wird, stimmt auch mit den Erkenntnissen von Brys *et al.* (2010)^[2] überein, die an den gleichen Proben wie in dieser Arbeit gewonnen wurden. In derselben Studie konnte außerdem festgestellt werden, dass die *daf-2*-Mutante unabhängig vom Alter stets eine geringere Anzahl Kopien für die mitochondriale DNA aufweist. Trotzdem kommt es, verursacht durch den auch in der vorliegenden Arbeit festgestellten, enormen Rückgang der Menge von Atmungskettenkomplexen und –superkomplexen zu einer stark verringerten Energieproduktion in alten Wildtyp Tieren. Dieser Effekt tritt bei der Mutante in stark abgemilderter Form auf, da die Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung bei dieser wesentlich geringer ist. Alte *daf-2* Tiere weisen weiterhin ein höheres Membranpotential sowie eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf, was jedoch nur zu geringen Schäden an mitochondrialen Proteinen und mtDNA führt^[2]. Die in der vorliegenden Arbeit festgestellten Unterschiede zwischen 2 und 8 Tage alten *C. elegans* des Wildtyps N2 sowie der Mutanten *daf-2*(e1370) gehen konform mit der von Brys *et al.* (2010)^[2] formulierten Schlussfolgerung, dass die verringerte *daf-2*-Funktion der *daf-2*-Mutanten den Alternsprozess von *C. elegans* durch einen indirekten Schutzeffekt für die mitochondriale Funktion beeinflusst, dessen Mechanismus jedoch noch ungeklärt ist.

5.2.2 Identifizierung von Proteinen aus *Caenorhabditis elegans* mittels Peptide Mass Fingerprinting

Da die Analyse von Mitochondrien des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans* noch nicht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dencher an der Technischen Universität Darmstadt etabliert ist und im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig erfolgt, ist die Identifizierung möglichst vieler Proteine auf einem typischen 2D-BN/SDS-Gel dieses Organismus sinnvoll. Dazu wird die in Kapitel 4.6.1 beschriebene Technik des Peptide Mass Fingerprinting (PMF) verwendet. Da *C. elegans* der erste Vielzeller ist, dessen Genom sequenziert wurde^[69], ist er auch sehr gut in der verwendeten MASCOT-Datenbank annotiert. Trotzdem werden teilweise zusätzlich die BLAST-Suchen (für engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)^[333] sowie der WormBase^[334] verwendet, um unklare Ergebnisse zu verifizieren. Auf den in Abbildung 5.2.2 dargestellten 2D-BN/SDS-Gelen sind die mittels PMF erfolgreich identifizierten Proteine markiert und in Tabelle 5.2.2 findet sich eine detaillierte Auflistung dieser.

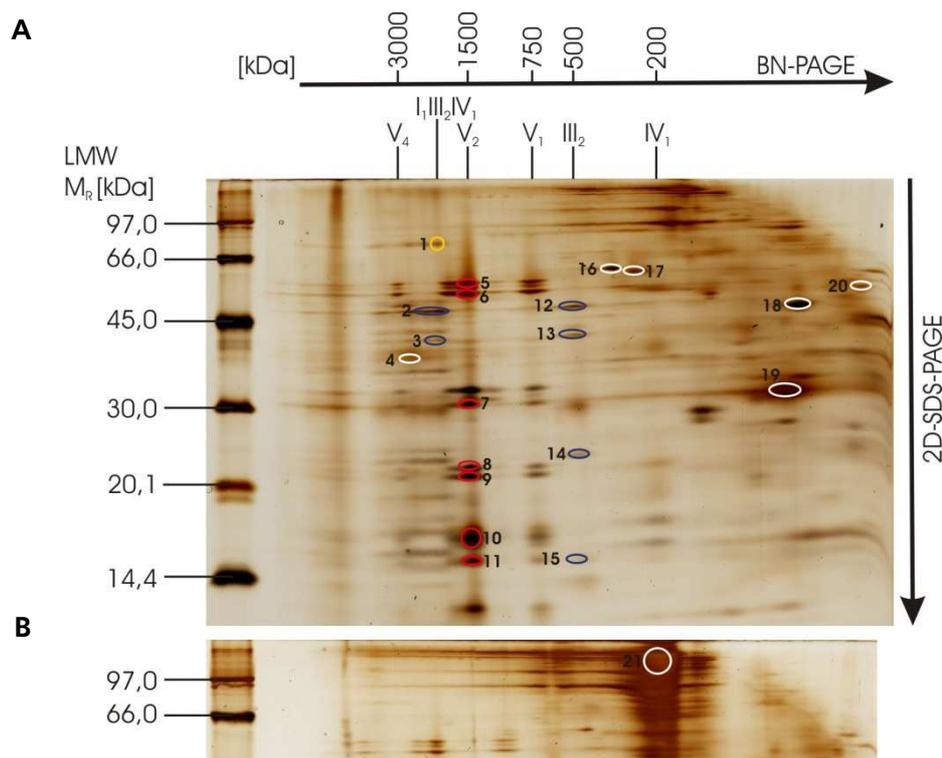


Abbildung 5.2.2 (A) Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel der 8 Tage alten *daf-2(e1370)*-Mutanten von *Caenorhabditis elegans* (Isolierung der Mitochondrien im Februar 2007, Probe *daf-2_8d_alt* in Tabelle 3.5.4). (B) Ausschnitt aus einem silbergefärbten 2D-BN/SDS-Gel des 8 Tage alten Wildtyps N2 von *Caenorhabditis elegans* (Isolierung der Mitochondrien im Februar 2007, Probe *N2_8d_alt* in Tabelle 3.5.4). Für die erste Dimension wurden 205 µg (A) bzw. 248 µg (B) Protein mit einem Digitonin/ Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilisiert. Links sind jeweils 2 µL des LMW-Massenstandards aufgetragen. Proteine die mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifiziert werden konnten sind nummeriert und durch farbige Kreise gekennzeichnet (gelb: Komplex I, blau: Komplex III₂, rot: ATP-Synthase, weiß: sonstige Proteine). In Tabelle 5.2.2 findet sich eine detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine.

Tabelle 5.2.2 Mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifizierte Untereinheiten der Komplexe I und III₂ der oxidativen Phosphorylierung von *Caenorhabditis elegans*. Die Nummerierung bezieht sich auf die in Abbildung 5.2.2 dargestellten 2D-BN/SDS-Gele. Ergebnisse mit einem Score größer 57 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Nr.	Protein	NCBI nr	Score	M _R [kDa]	pI
NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)					
1	NADH Ubiquinone Oxidoreductase family member (nuo-5) BLAST Suche (SIB): NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit	17565758	58	79307	6,29
Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III₂)					
2	Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1	17553678	84	51704	6,07
3	Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-2.1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex protein 2.3 Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-2.1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex protein 2.3	17570205	30	42742	7,79
		32566323	30	44408	8,79
12	Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 1	17553678	110	51704	6,07
13	Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-2.1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex protein 2.3 Ubiquinol-Cytochrome c oxidoReductase complex family member (ucr-2.1) BLAST Suche (SIB): Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex protein 2.3	17570205	68	42742	7,79
		32566323	67	44408	8,79
14	Iron-Sulfur Protein family member (isp-1) BLAST Suche (WormBase): Ubiquinol cytochrome c reductase, subunit RIP1	17540418	73	29691	8,81
15	T02H6.11 BLAST Suche (WormBase): Ubiquinol cytochrome c reductase, subunit QCR7	17535957	91	15111	7,98

Tabelle 5.2.2 Fortsetzung. Mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase von *Caenorhabditis elegans*. Die Nummerierung bezieht sich auf die in Abbildung 5.2.2 dargestellten 2D-BN/SDS-Gele. Ergebnisse mit einem Score größer 57 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Nr.	Protein	NCBINr	Score	M _R [kDa]	pI
ATP-Synthase (Komplex V)					
5	H28O16.1d BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	71988080	160	54986	8,25
	H28O16.1a BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	71988063	160	57752	8,98
	H28O16.1c BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	71988074	136	54121	9,10
6	ATP synthase subunit family member (atp-2) BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit beta, mitochondrial	25144756	174	57491	5,52
7	Y69A2AR.18b BLAST Suche (WormBase): F0F1-type ATP synthase, gamma subunit	17544028	90	34580	9,29
	Y69A2AR.18a BLAST Suche (WormBase): F0F1-type ATP synthase, gamma subunit	17544026	78	32362	9,10
	Y69A2AR.18c BLAST Suche (WormBase): F0F1-type ATP synthase, gamma subunit	32565975	68	21374	10,31
8	ATP synthase subunit family member (atp-5) BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit d/ATP7	17557712	74	21784	6,67
9	ATP synthase subunit family member (atp-3) BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit OSCP/ATP5	71984710	32	22376	9,82
	ATP synthase subunit family member (atp-3) BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit OSCP/ATP5	71984717	32	24932	9,84
10	R53.4 BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit f	17535649	68	18738	10,04
11	ATP Synthase G homolog family member (asg-2) BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial F1F0-ATP synthase, subunit g/ATP20	17551134	72	14825	9,73

Tabelle 5.2.2 Fortsetzung. Weitere mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifizierte Proteine von *Caenorhabditis elegans*. Die Nummerierung bezieht sich auf die in Abbildung 5.2.2 dargestellten 2D-BN/SDS-Gele. Ergebnisse mit einem Score größer 57 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Nr.	Protein	NCBI nr	Score	M _R [kDa]	pI
Sonstige Proteine					
4	gaLECTin family member (lec-5) BLAST Suche (SIB): Galectin LEC-5	1753511921	83	35415	7,74
16	Heat Shock Protein family member (hsp-60)	17555558	53	60064	5,31
17	ZK829.4 BLAST Suche (WormBase): putative glutamate dehydrogenase	17544676	209	58758	6,90
18	CiTrate Synthase family member (cts-1) BLAST Suche (WormBase): citrate synthase, predicted to be mitochondrial	17555174	65	51507	7,68
19	Temporarily Assigned Gene name family member (tag-61) BLAST Suche (WormBase): Mitochondrial ADP/ATP carrier proteins	71991728	52	33023	9,74
	ADP/ATP translocase	735952	51	33190	9,82
20	CalReTiculin family member (crt-1) BLAST Suche (WormBase): Calreticulin	17565428	69	45588	4,59
21	Vitellogenin structural genes (yolk protein genes) protein 2, isoform b	152001234	51	180809	7,30
	Vitellogenin-2 precursor	1722702	50	187951	6,42
	vitellogenin:ISOTYPE=2	227988	50	187953	6,42
	C42D8.2 BLAST Suche (WormBase): vitellogenin homolog	17570195	50	187604	6,24
	YP170				

Der in Tabelle 5.2.2 angegebene „Score“ errechnet sich mittels $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Übereinstimmung ist. Ergebnisse mit einem Score über 57 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)^[335]. Zum Teil werden auch Proteine mit einem geringeren Score in die Tabelle aufgenommen. Dies ist immer dann der Fall, wenn weitere Indizien auf eine korrekte Identifizierung hinweisen. Ein Beispiel dafür sind die verschiedenen bei Nr. 21 (für die Nummerierung vgl. Abbildung 5.2.2) identifizierten Isoformen des Vitellogenins, für die zwar nur Scores von 50 oder 51 erzielt werden konnten, deren Position auf dem 2D-BN/SDS-Gel aber bereits im Vorfeld bekannt war und die auf dem Gel des 8 Tage alten Wildtyps zusätzlich in enorm großer Menge vorliegen. Es können sieben verschiedene Untereinheiten der ATP-Synthase (α , β , γ , d, OSCP, f und g) sowie vier Untereinheiten von

Komplex III₂ (Core Protein 1 und 2, RIP1 und QCR7) identifiziert werden. Core Protein 1 und 2 von Komplex III₂ werden nicht nur an der Position des individuellen Komplexes (Nr. 12 und 13) sondern auch im höheren Massenbereich des zugrunde liegenden BN-Gels (Nr. 2 und 3) identifiziert. Hier kann auch die 75 kDa Untereinheit von Komplex I (Nr. 1) identifiziert werden, was für das tatsächliche Vorliegen eines Superkomplexes der Stöchiometrie I₁III₂IV_{0-n} spricht. Untereinheiten von Komplex IV der oxidativen Phosphorylierung konnten nicht identifiziert werden. Neben diesen Untereinheiten von Komplexen der oxidativen Phosphorylierung und mehreren Vitellogenin-Isoformen können noch einige weitere Proteine identifiziert werden. Darunter das 60 kDa Hitzeschockprotein (HSP60, Nr. 16), die Citrat-Synthase des Krebs-Zyklus (Nr. 18), die für den Stickstoffmetabolismus wichtige Glutamatdehydrogenase (Nr. 17) und ein mitochondriales ADP/ATP Carrier-Protein (Nr. 19). Bei dem in Nr. 20 identifizierten Calreticulin handelt es sich um ein Calcium-bindendes Chaperon des endoplasmatischen Retikulums^[328] und das in Nr. 4 identifizierte Protein gehört zur Familie der Galectine, die Kohlenhydrate, insbesondere β-Galactoside, binden^[336].

5.3 *Drosophila melanogaster*

5.3.1 Identifizierung von Proteinen aus *Drosophila melanogaster* mittels Peptide Mass Fingerprinting

Da die 2D-BN/SDS-Gele von *Drosophila melanogaster* ein von anderen Organismen abweichendes Proteinmuster zeigen, das insbesondere im Bereich der ATP-Synthase auffällig ist, für die wesentlich mehr Banden erkennbar sind als erwartet (siehe Abbildung 5.3.1) und die Analyse von Mitochondrien dieser Taufliege noch nicht in der Arbeitsgruppe von Prof. Dencher an der Technischen Universität Darmstadt etabliert ist sondern im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig erfolgt, ist die Identifizierung möglichst vieler Proteine auf einem typischen 2D-BN/SDS-Gel dieses Organismus sinnvoll. Dazu wird die in Kapitel 4.6.1 beschriebene Technik des Peptide Mass Fingerprinting (PMF) verwendet. Da die Sequenzierung des Genoms von *D. melanogaster* bereits im Jahr 2000 abgeschlossen wurde^[91], ist sie auch sehr gut in der verwendeten MASCOT-Datenbank annotiert. Trotzdem wird teilweise zusätzlich die BLAST-Suche des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)^[333] verwendet, um unklare Ergebnisse zu verifizieren. Auf dem in Abbildung 5.3.1 dargestellten 2D-BN/SDS-Gel sind die mittels PMF erfolgreich identifizierten Proteine markiert und in Tabelle 5.3.1 findet sich eine detaillierte Auflistung dieser.

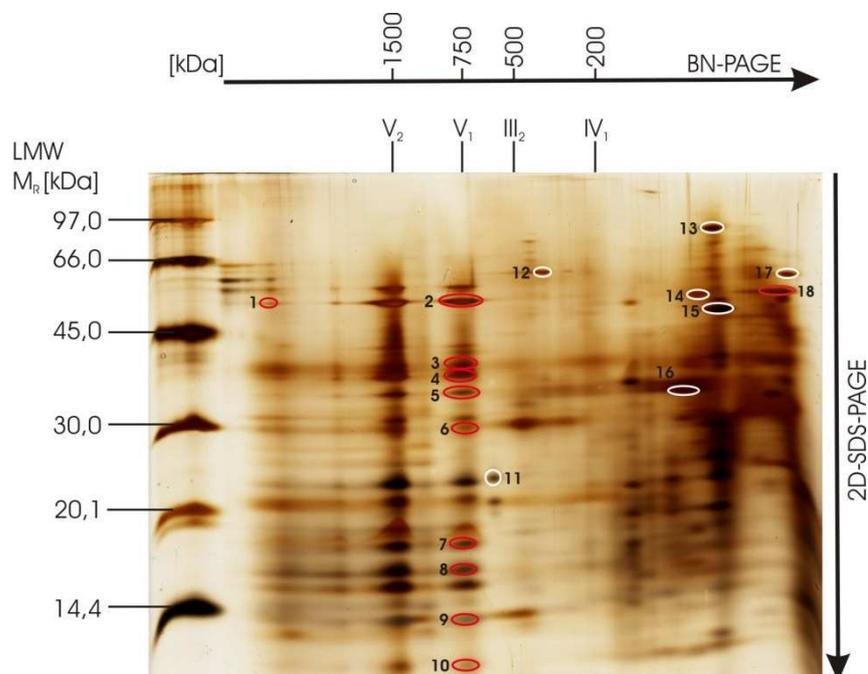


Abbildung 5.3.1 Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel der einen Tag alten Hsp22-Überexpressionsmutanten von *Drosophila melanogaster* (siehe Tabelle 3.5.5). Für die erste Dimension wurden 206 µg Protein mit einem Digitonin/ Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilisiert. Links auf dem Gel sind 2 µL des LMW-Massenstandards aufgetragen. Proteine die mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifiziert werden konnten sind nummeriert und durch farbige Kreise gekennzeichnet (rot: ATP-Synthase, weiß: sonstige Proteine). In Tabelle 5.3.1 findet sich eine detaillierte Auflistung der identifizierten Proteine.

Tabelle 5.3.1 Mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifizierte Untereinheiten der ATP-Synthase von *Drosophila melanogaster*. Die Nummerierung bezieht sich auf das in Abbildung 5.3.1 dargestellte 2D-BN/SDS-Gel. Ergebnisse mit einem Score größer 60 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Nr.	Protein	NCBI Nr	Score	M _R [kDa]	pI
ATP-Synthase (Komplex V)					
1	ATP synthase beta subunit	287945	43	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	43	54074	5,14
2	ATP synthase beta subunit	287945	55	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	54	54074	5,14
3	bellwether CG3612-PA				
	BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	24658560	122	59384	9,09
	ATP synthase beta subunit	287945	89	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	189	54074	5,14
4	ATP synthase beta subunit	287945	111	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	110	54074	5,14
5	ATP synthase beta subunit	287945	114	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	113	54074	5,14
6	ATP synthase-gamma chain CG7610-PA, isoform A	24651125	82	32850	9,28
7	bellwether CG3612-PA				
	BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	24658560	106	59384	9,09
8	bellwether CG3612-PA				
	BLAST Suche (SIB): ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor	24658560	110	59384	9,09
9	CG4692 CG4692-PB, isoform B				
	BLAST Suche (SIB): Putative ATP synthase subunit f, mitochondrial	19922916	68	12475	10,09
10	lethal (2) 06225 CG6105-PA, isoform A				
	BLAST Suche (SIB): mitochondrial proton-transporting ATP synthase complex, coupling factor F(o)	21356001	66	10865	9,78
18	ATP synthase beta subunit	287945	110	53487	5,19
	ATP synthase-beta CG11154-PA, isoform A	24638766	109	54074	5,14

Tabelle 5.3.1 Fortsetzung. Weitere mittels Peptide Mass Fingerprinting (PMF) identifizierte Proteine von *Drosophila melanogaster*. Die Nummerierung bezieht sich auf das in Abbildung 5.3.1 dargestellte 2D-BN/SDS-Gel. Ergebnisse mit einem Score größer 60 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$).

Nr.	Protein	NCBI nr	Score	M _R [kDa]	pI
Sonstige Proteine					
11	Ferritin 2 light chain homologue CG1469-PA, isoform A	24651364	98	25227	5,90
	ferritin 2 light chain homolog	6409191	98	25255	5,90
	ferritin 2 light chain homolog	6409185	98	25261	5,90
12	SD06594p				
	BLAST Suche (SIB): 60 kDa heat shock protein, mitochondrial	33636453	125	60758	5,38
	Heat shock protein 60 CG12101-PA, isoform A	24641191	108	60771	5,38
	heat shock protein 60	3757828	67	60871	5,56
13	Aconitase CG9244-PB, isoform B	17864292	78	84345	8,49
14	CG7430 CG7430-PA				
	BLAST Suche (SIB): Dihydrolipoyl dehydrogenase	21358499	74	53052	6,41
15	knockdown CG3861-PA, isoform A				
	BLAST Suche (SIB): Probable citrate synthase, mitochondrial	24640126	119	51542	8,89
	knockdown CG3861-PB, isoform B				
	BLAST Suche (SIB): Isoform B of Probable citrate synthase	24640124	112	58180	9,10
16	CG7998 CG7998-PA				
	BLAST Suche (SIB): L-malate dehydrogenase activity	24647881	128	35296	9,20
17	Protein disulfide isomerase CG6988-PA, isoform A	17647799	70	55746	4,72

Der in Tabelle 5.3.1 angegebene „Score“ errechnet sich mittels $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit für eine zufällige Übereinstimmung ist. Ergebnisse mit einem Score über 60 sind statistisch signifikant ($p < 0,05$)^[335]. Zum Teil werden auch Proteine mit einem geringeren Score in die Tabelle aufgenommen. Dies ist immer dann der Fall, wenn weitere Indizien auf eine korrekte Identifizierung hinweisen. Bei der Analyse der Ergebnisse der PMF-Analyse von *Drosophila melanogaster* fällt auf, dass α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase sehr oft identifiziert werden können. Die Identifizierung der β -Untereinheit bei Nr. 2 (vgl. Abbildung 5.3.1) ist nicht überraschend, da sie hier als Bestandteil des ATP-Synthase Monomers zu erwarten war und auch bei Nr. 1 ist ihr Vorhandensein nicht ungewöhnlich, da es sich hierbei um das Tetramer oder eventuell ein noch höheres Oligomer der ATP-Synthase handeln könnte. Selbst die Identifizierung der β -Untereinheit der ATP-Synthase bei Nr. 18, im extrem niedrigen Massenbereich der ersten Dimension ist nicht außergewöhnlich, da dies auch im Rattenherz und für die α -Untereinheit in Rattenmuskel beobachtet werden konnte^[272]. Dies ist

höchstwahrscheinlich auf das Vorliegen von freier β - bzw. α -Untereinheit in der ersten Geldimension zurückzuführen. Ungewöhnlich sind hingegen die Identifizierungen der ATP-Synthase β -Untereinheit bei Nr. 3, 4 und 5 sowie der α -Untereinheit bei Nr. 3, 7 und 8, die alle statistisch signifikant sind. Nach Rücksprache mit der Arbeitsgruppe von Prof. Tanguay, Université Laval, Québec City, Kanada, von der die Proben stammen, wurde klar, dass diese Identifizierungen und auch das im Vergleich mit anderen Organismen veränderte Proteinstmuster auf den 2D-BN/SDS-Gelen von *Drosophila melanogaster* auf eine recht hohe Kontamination der Mitochondrien-Proben mit ca. 25% Lysosomen zurückzuführen sind. Lysosomen sind vesikuläre Organellen tierischer Zellen, die sich eine Vielzahl hydrolytische Enzyme enthalten, die sowohl Proteine als auch Lipide, Nucleinsäuren und Polysaccharide abbauen können^[204]. Eine Kontamination mit Lysosomen führt somit zu einer teilweisen Proteolyse der in der Probe enthaltenen Proteine. Somit finden sich verschiedene Produkte des proteolytischen Abbaus auf dem 2D-BN/SDS-Gel, was zu den zusätzlichen Proteinbanden und der massenspektrometrischen Identifizierung von α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase im geringeren Massenbereich führt. Durch die starke Kontamination mit Lysosomen und die daraus resultierende partielle Proteolyse erscheint eine Analyse altersabhängiger Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von Wildtyp und Hsp22-Überexpressionsmutanten mit diesen Proben nicht sinnvoll.

Es können jedoch auch die Untereinheiten γ (Nr. 6) und f (Nr. 9) sowie ein „*coupling factor*“ (Nr. 10) der ATP-Synthase sowie weitere Proteine, darunter drei Enzyme des Citrat-Zyklus – Aconitase (Nr. 13), Citrat-Synthase (Nr. 15) und Malatdehydrogenase (Nr. 16) – identifiziert werden. Nr. 12 konnte dem 60 kDa Hitzeschockprotein und Nr. 11 dem Eisenspeicher-Protein Ferritin zugordnet werden. Die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (Nr. 14) spielt eine Rolle beim Metabolismus reaktiver Stickstoffspezies (RNS, von engl. *reactive nitrogen species*)^[337, 338], während die Protein-Disulfid-Isomerase (Nr. 17) – ein im endoplasmatischen Retikulum vorliegendes Chaperon – die Bildung, Isomerisierung und Reduktion von Disulfidbrücken katalysiert^[339].

5.4 *Nothobranchius furzeri*

5.4.1 Optimierung der Isolierung von Mitochondrien aus *N. furzeri*

Die Isolierung von Mitochondrien aus dem letzten Stück Muskel vor der Schwanzflosse des Türkisen Prachtgrundkärpflings *Nothobranchius furzeri* erfolgt wie in Abschnitt 4.1.1 beschrieben in Anlehnung an Radák et al. (2000)^[135] und Reifschneider (2006)^[134]. Im Gegensatz zu Muskelgewebe aus Ratte besitzt das verwendete Gewebe von *N. furzeri* Haut und Gräte, die bei der Isolierung der Mitochondrien stören können. Um die Methode diesen Gegebenheiten anzupassen werden die in Tabelle 5.4.1 aufgeführten Proben, die von Dr. Alessandro Cellerino vom Leibniz-Institut für Alternsforschung in Jena zur Verfügung gestellt wurden, unterschiedlich für die Homogenisierung vorbereitet. Alle zur Verfügung stehenden Individuen waren zum Zeitpunkt ihrer Tötung 10 Wochen alt und unterlagen entweder einer lebenslangen (CR) oder kurzzeitigen Kalorienrestriktion für zwei Wochen (SCR). Die CR-Individuen werden in drei Gruppen eingeteilt und unterschiedlich für die Homogenisierung vorbereitet. Während bei Probe 1 Haut und Gräte entfernt werden, wird das Gewebe für Probe 2 so wie es ist zerkleinert und bei Probe 3 wird lediglich die Haut entfernt. Probe 4 umfasst die vier zur Verfügung stehenden SCR-Individuen; bei diesen wird ebenfalls lediglich die Haut entfernt. Auf den Einfluss der Kalorienreduktion auf das mitochondriale Proteom von *N. furzeri* wird in Kapitel 5.4.3 eingegangen.

Tabelle 5.4.1 Für die Optimierung der Isolierung von Mitochondrien aus *Nothobranchius furzeri* verwendete Proben unter Angabe von Probennummer, Individuenanzahl, Geschlecht, Ernährungsstatus sowie der Probenbehandlung für die Homogenisierung.

Probe	Anzahl Individuen	Geschlecht	Ernährungsstatus	Probenbehandlung
1	1	vermutl. ♂	CR	- Haut, - Gräte
2	1	vermutl. ♂	CR	
3	3	vermutl. alle ♀	CR	- Haut
4	4	vermutl. 2x ♂ + 2x ♀	SCR	- Haut

Nach Isolierung der Mitochondrien aller vier Proben und Bestimmung der Proteinkonzentration wie in den Abschnitten 4.1.1 und 4.2 beschrieben, werden je 100 μg Probe mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 1:8 (w/w) solubilisiert und mittels blau-nativer Gelelektrophorese aufgetrennt. Das resultierende, mit Roti[®]-Blue Coomassie-gefärbte Gel ist in Abbildung 5.4.1 dargestellt. Probe 1, bei der Haut und Gräte vor der Homogenisierung entfernt wurden, zeigt wesentlich weniger Banden als die anderen Proben, vor allem im hohen Massenbereich. Probe 2, bei der weder Haut noch Gräte entfernt wurden, zeigt ein mit Probe 3, bei der lediglich die Haut entfernt wurde, vergleichbares Bandenmuster jedoch mit

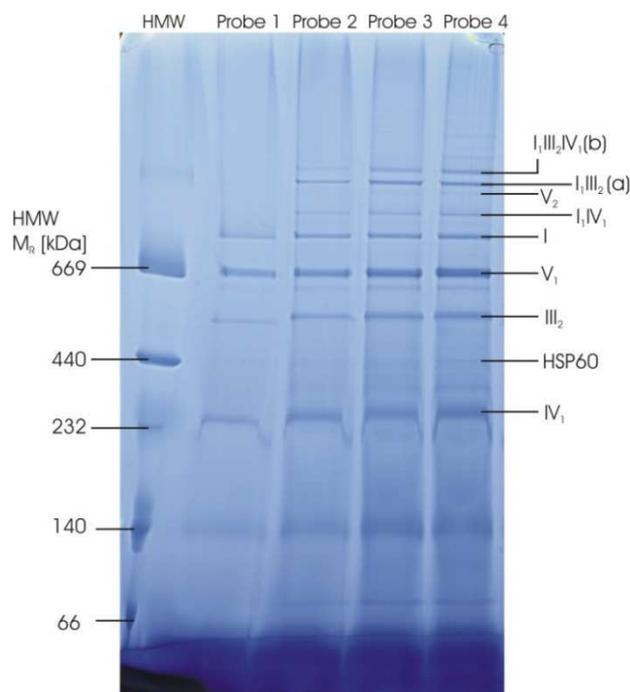


Abbildung 5.4.1 Mit Roti[®]-Blue gefärbtes BN-Gel der in Tabelle 5.4.1 aufgeführten Proben von *Nothobranchius furzeri*. Die Solubilisierung erfolgt mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w), aufgetragen sind je 100 µg Protein (vor Solubilisierung). In der linken Spur sind zusätzlich 15 µL des HMW-Massenstandards aufgetragen. Probe 1, bei der Haut und Gräte vor der Solubilisierung entfernt wurden, zeigt wesentlich weniger Banden als die anderen Proben, vor allem im hohen Massenbereich. Probe 2, bei der weder Haut noch Gräte entfernt wurden zeigt ein mit Probe 3, bei der lediglich die Haut entfernt wurde, vergleichbares Bandenmuster jedoch etwas geringere Intensitäten. Probe 4, die im Gegensatz zu den anderen drei Proben aus Individuen mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion stammt und bei der ebenfalls lediglich die Haut entfernt wurde, zeigt wie Probe 3 ein sehr deutliches Bandenmuster und auch viele Banden im hohen Massenbereich, wo die Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung zu finden sind. Die Zuordnung der markierten Banden zu den Komplexen und Superkomplexen der oxidativen Phosphorylierung sowie dem Hitzeschockprotein HSP60 erfolgt mit Hilfe des in Abbildung 5.4.2 dargestellten 2D-BN/SDS-Gels von Probe 4. Die ATP-Synthase kann hauptsächlich in Form des Monomers (V_1) detektiert werden, die Bande des Dimers (V_2) ist in allen Proben sehr schwach und bei Probe 1 gar nicht zu erkennen. Ebenfalls identifiziert werden können die individuellen Atmungskettenkomplexe I, III_2 und IV_1 sowie die Superkomplexe a (I_1III_2) und b ($I_1III_2IV_1$) und weitere Banden im höheren Massenbereich, die vermutlich weitere Superkomplex-Spezies darstellen. Interessanterweise kann außerdem der Superkomplex I_1IV_1 ohne Beteiligung des Komplex III_2 Homodimers identifiziert werden.

etwas geringeren Intensitäten. Probe 4, die im Gegensatz zu den anderen drei Proben aus Individuen mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion stammt und bei der ebenfalls lediglich die Haut entfernt wurde, zeigt wie Probe 3 ein sehr deutliches Bandenmuster und auch viele Banden im hohen Massenbereich, wo die Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung zu finden sind. Für die Isolierung von Mitochondrien aus *Nothobranchius furzeri* Muskelgewebe scheint somit die Entfernung von Haut und Gräte (Probe 1) nicht sinnvoll zu sein, da vor allem die Atmungskettensuperkomplexe dadurch verloren zu gehen scheinen. Diese Art der Probenpräparation ist außerdem verhältnismäßig zeitaufwendig und mit einem recht großen Verlust von Material verbunden, da nicht das gesamte Muskelgewebe von der Gräte zu trennen ist. Die Entfernung der Haut scheint hingegen eher einen positiven Effekt zu haben (vgl. Probe 2 mit und Probe 3 ohne Haut) und ist außerdem – vor allem bei männlichen Tieren – recht einfach. Im Gegensatz zum Entfernen der Gräte ist das Entfernen der Haut

auch mit weniger Materialverlust verbunden. Wird die Haut nicht entfernt, kommt es nach der Homogenisierung außerdem recht häufig zur Verstopfung der Pipette durch kleine Hautstücke, was die Probenhandhabung beeinträchtigt. Die Gräte hat hingegen keine störenden Auswirkungen auf die Homogenisierung und wird im anschließenden Zentrifugationsschritt abgetrennt. Aus diesen Gründen werden alle weiteren im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Proben von *N. furzeri* durch Entfernen der Haut aber ohne Entfernen der Gräte gewonnen.

5.4.2 Identifizierung des Superkomplexes I₁IV₁ in *Nothobranchius furzeri*

Um die für die Optimierung der Mitochondrienisolierung verwendeten Proben aus Tabelle 5.4.1 weitergehend zu untersuchen und die Banden auf dem BN-Gel in Abbildung 5.4.1 den Komplexen und Superkomplexen der Atmungskette zuordnen zu können, werden 2D-BN/SDS-Gele angefertigt. In Abbildung 5.4.2 ist exemplarisch das silbergefärbte 2D-BN/SDS-Gel von Probe 4 (SCR) dargestellt. Es ist wiederum deutlich zu erkennen, dass die ATP-Synthase fast ausschließlich als Monomer vorliegt. Die Auswertung des in Abbildung 5.4.1 dargestellten BN-Gels mittels QuantityOne ergibt ein Monomer/Dimer-Verhältnis von 8:1 für Probe 4. Neben den individuellen Atmungskettenkomplexen I, III₂ und IV₁ können auch verschiedene Superkomplexe identifiziert werden. Sehr deutlich zu erkennen sind die Superkomplexe a (I₁III₂) und b (I₁III₂IV₁) und etwas schwächer auch Superkomplex c mit einer zweiten Kopie von Komplex IV. Der Superkomplex III₂IV₁, der beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommt, die keinen Komplex I besitzt^[9-11], so dass dieser dort zusammen mit III₂IV₂ den Hauptteil an Superkomplex ausmacht^[4], kann bei den Proben 1 bis 4 von *N. furzeri* (siehe Tabelle 5.4.1) nicht detektiert werden. Anstatt dessen ist interessanterweise Superkomplex I₁IV₁ ohne Beteiligung des Komplex III₂ Homodimers vorhanden, der bisher nur in Rinderherzmitochondrien^[3-5], dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*^[6, 7] und der Hefe *Yarrowia lipolytica*^[8] identifiziert werden konnte und eine direkte Interaktion der Komplexe I und IV der oxidativen Phosphorylierung beweist. Auch in der Diplomarbeit von Bloeck (2011)^[133], in der altersabhängige Veränderungen des mitochondrialen Proteoms von *N. furzeri* untersucht wurden, konnte dieser Superkomplex nicht identifiziert werden. Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass bei Bloeck (2011)^[133] allgemein keine Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung detektiert werden konnten, was vermutlich auf die mangelhafte Qualität des neueren Probenmaterials zurückzuführen ist. Bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen kann der Superkomplex I₁IV₁ ebenfalls nur bei *Nothobranchius furzeri*, nicht aber bei *Podospora anserina*, *Caenorhabditis elegans* oder *Drosophila melanogaster* identifiziert werden.

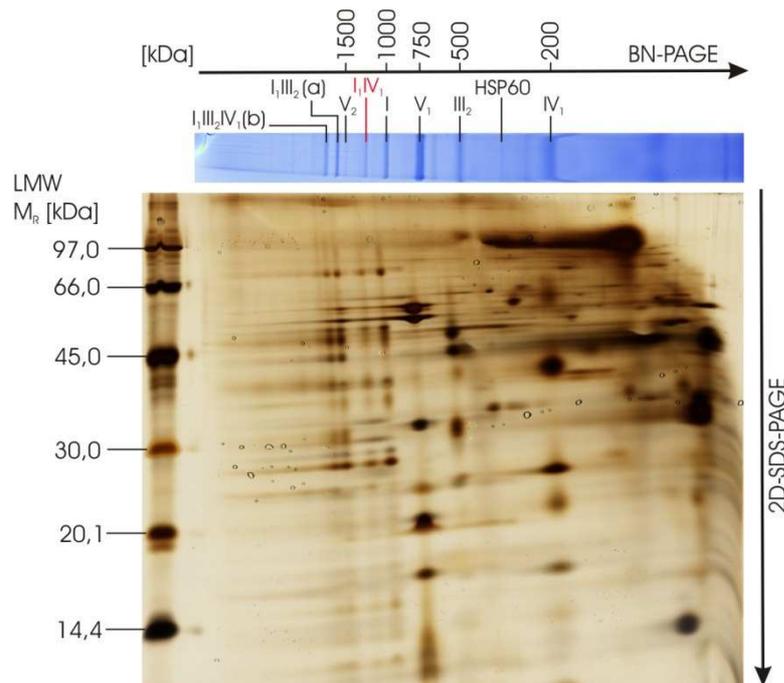


Abbildung 5.4.2 Silbergefärbtes 2D-BN/SDS-Gel der *Nothobranchius furzeri* Probe 4 aus Tabelle 5.4.1. Für die erste Dimension wurden 100 µg Protein mit einem Digitonin/ Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w) solubilisiert. Auf dem 2D-BN/SDS-Gel sind links 2 µL des LMW-Massenstandards aufgetragen. Ein mit Roti[®]-Blue Coomassie-gefärbter Gelstreifen der gleichen Probe in der ersten Dimension ist über das 2D-BN/SDS-Gel gelegt, um die Migration der denaturierten Komplexe und Superkomplexe in ihre Untereinheiten zu visualisieren. Es lässt sich deutlich erkennen, dass die Hauptmenge der ATP-Synthase als Monomer (V_1) vorliegt. Dimer (V_2) ist zwar auch vorhanden, jedoch ergab die Quantifizierung aus der ersten Dimension (Abbildung 5.4.1) ein Monomer/ Dimer-Verhältnis von 8:1 (w/w). Ebenfalls identifiziert werden können die individuellen Atmungskettenkomplexe I, III_2 und IV_1 sowie die Superkomplexe a (I_1III_2) und b ($I_1III_2IV_1$) und in geringerem Maße auch Superkomplex c ($I_1III_2IV_2$, nicht beschriftet). Interessanterweise kann neben diesen aus vielen Organismen bekannten Superkomplexen auch der Superkomplex I_1IV_1 ohne Beteiligung des Komplex III Homodimers identifiziert werden, der eine direkte Wechselwirkung der Komplexe I und IV beweist und bisher nur in Rinderherzmitochondrien^[3-5], dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*^[6, 7] sowie der Hefe *Yarrowia lipolytica*^[8] nachgewiesen werden konnte.

5.4.3 Einfluss von Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom von *N. furzeri*

Erste Hinweise auf eine Lebensverlängerung durch Verringerung der Kalorienaufnahme konnten bereits 1917 von Osborne *et al.*^[126] an Ratten gefunden werden und wurden 1935 von MacCay *et al.*^[46] – ebenfalls an Ratten – untermauert. Seitdem konnte die lebensverlängernde Wirkung einer verminderten Kalorienzufuhr – ohne dass dabei eine Mangelernährung auftritt – bei vielen verschiedenen Organismen nachgewiesen werden, darunter neben Mäusen^[45] und Ratten^[46, 126] auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen *Podospora anserina*^[41-44], *Caenorhabditis elegans*^[47-50] und *Drosophila melanogaster*^[51-53]. Auch für *Nothobranchius furzeri* wurde der Einfluss von Kalorienrestriktion bereits analysiert, wobei ein Laborstamm und ein direkt aus dem Habitat entnommener Stamm verglichen wurden und unterschiedliche Reaktionen zeigten^[54]. Zwar wurde die maximale Lebensspanne bei beiden Stämmen durch die Kalorienrestriktion verlängert, beim Laborstamm jedoch stärker als bei dem direkt aus dem Habitat entnommenen. Bei letzterem kam es weiterhin zu einer erhöhten Sterbewahrscheinlichkeit im jungen Alter^[54].

Die Auswirkungen der Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom von *Nothobranchius furzeri* sind jedoch nicht bekannt und werden im Rahmen dieser Arbeit anhand der in Tabelle 3.5.7. aufgelisteten Proben untersucht. Neben Individuen mit lebenslanger (CR) und kurzzeitiger Kalorienrestriktion (für zwei Wochen, SCR) steht auch eine *ad libitum* ernährte Kontroll-Gruppe (Ctrl) zur Verfügung. Da die Probenmenge limitiert ist, werden für die erste Dimension Gele mit einem Außenmaß von 10,5 x 10 cm² (H x B) anstatt der üblichen 16 x 18 cm² (H x B) verwendet, was jedoch auch zu einer geringeren Trennschärfe, vor allem im hochmolekularen Bereich, führt. Das gleiche gilt für die Gele der zweiten Dimension, die in der Größe 8,2 x 10 cm² (Außenmaß, H x B) angefertigt werden.

In Abbildung 5.4.3 sind auf einem BN-Gel die Proben von *N. furzeri* mit lebenslanger (CR) und kurzzeitiger Kalorienrestriktion (SCR) sowie die *ad libitum* ernährte Kontroll-Gruppe (Ctrl) verglichen. Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Bandenmuster und in den Bandenintensitäten. Während zwischen den einer kurzzeitigen Kalorienrestriktion unterzogenen (SCR) und den *ad libitum* ernährten (Ctrl) Fischen noch eine gewisse Gemeinsamkeit erkannt werden kann, zeigt insbesondere die Probe der einer lebenslangen Kalorienrestriktion unterworfenen Tiere (CR) ein signifikant verändertes Bandenmuster. Während die Intensitäten der Banden für individuellen Komplex I und III₂ mit denen der anderen beiden Proben vergleichbar sind, scheint die Menge des ATP-Synthase Monomers (V₁) in gravierendem Maße abgenommen zu haben und eine Bande für das Dimer kann in dieser Probe gar nicht identifiziert werden. Vergleicht man die mittels der Software QuantityOne ermittelten Bandenintensitäten für das ATP-Synthase Monomer, so liegt bei der CR Probe nur noch 13% der Menge von Kontroll- bzw. SCR Probe vor. Da die ATP-Synthase einen Großteil der benötigten Energie für eine Zelle bereitstellt, sollte anzunehmen sein, dass eine solch enorme Reduzierung der Menge an ATP-Synthase schwerwiegende negative Konsequenzen für den Organismus nach sich zieht. In der Studie von Terzibasi *et al.* (2009)^[54], wo ebenfalls die Auswirkung lebenslanger Kalorienrestriktion bei *N. furzeri* untersucht wird, konnte jedoch kein solcher Effekt festgestellt werden. Ein grober Fehler bei der Bestimmung der Proteinkonzentration, der in einer zu geringen Proteinmenge für die CR Probe auf dem BN-Gel resultieren würde, ist zwar nicht auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich, da die Bandenintensitäten für die Komplexe I und III₂ bei allen drei Proben vergleichbar sind. Auch die Superkomplexe a (I₁III₂) und b (I₁III₂IV₁) zeigen bei der CR Probe nur unwesentlich geringere Intensitäten als die der Kontroll- und SCR Probe. Es muss also davon ausgegangen werden, dass eine lebenslange Kalorienrestriktion im Muskelgewebe von *Nothobranchius furzeri* zu einer drastischen Abnahme der ATP-Synthase Menge und einem völligen Verlust dimerer ATP-Synthase führt. Dieses Ergebnis bedarf jedoch noch der weiteren Verifizierung durch zusätzliche Experimente.

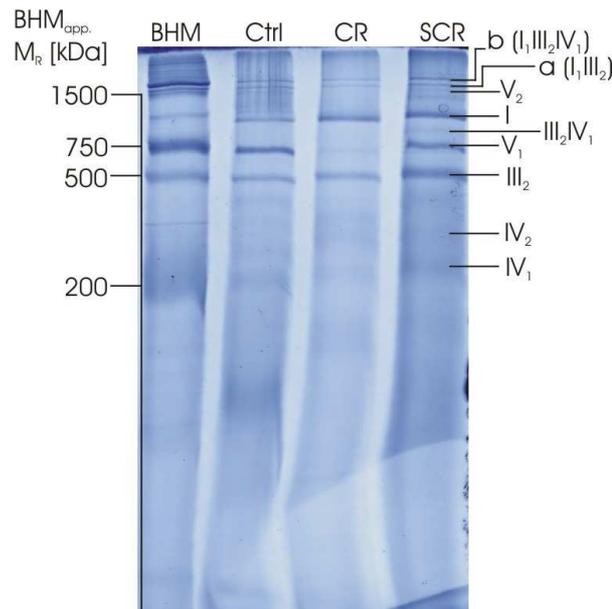


Abbildung 5.4.3 Mit Roti[®]-Blue gefärbtes BN-Gel der in Tabelle 3.5.7 aufgeführten Proben von *Nothobranchius furzeri*. Die Solubilisierung erfolgt mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w), aufgetragen sind je 20 µg Protein (vor Solubilisierung). In der linken Spur sind zusätzlich 20 µg Rinderherzmitochondrien als Massenstandard aufgetragen. Während zwischen der Kontroll-Probe (Ctrl) und der Probe von Individuen mit kurzzeitiger Kalorienrestriktion (SCR) noch eine gewisse Gemeinsamkeit erkannt werden kann, zeigt die Probe der Fische mit lebenslanger Kalorienrestriktion (CR) ein signifikant verändertes Bandenmuster. Die Intensitäten für die Banden der individuellen Atmungskettenkomplexe I und III₂ zeigen ähnliche Intensitäten wie bei der Kontroll- und SCR Probe, die Bande des ATP-Synthase Monomers (V₁) zeigt jedoch eine drastische Abnahme der Bandenintensität. Die Quantifizierung dieser Bande für alle drei Proben mit der Software QuantityOne zeigt, dass bei der CR Probe nur noch 13% der Menge an ATP-Synthase Monomer von Kontroll- bzw. SCR Probe vorliegt. Wie bereits erwähnt, zeigen Kontroll- und SCR Probe ein ähnliches Bandenmuster mit ebenfalls ähnlichen Intensitäten, jedoch kann der Superkomplex III₂IV₁ nur in der SCR Probe identifiziert werden. Der Superkomplex I₁IV₁, der bei den Proben aus Tabelle 3.5.6 sowohl bei CR als auch bei SCR Individuen detektiert werden konnte, kann hier in keiner der drei Proben gefunden werden. Neben monomerem Komplex IV (IV₁) kann bei den CR und SCR Proben auch das Dimer (IV₂) dieses Komplexes identifiziert werden. Deutlicher wird dies auf den in Abbildung 5.4.4 gezeigten 2D-BN/SDS-Gelen, die auch für die Zuordnung der Banden der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung in der ersten Dimension herangezogen wurden.

Wie bereits erwähnt zeigen die Proben von Fischen mit *ad libitum* Fütterung (Ctrl) und kurzzeitiger Kalorienrestriktion (SCR) zwar größere Gemeinsamkeiten jedoch kann der Superkomplex III₂IV₁ nur bei der SCR Probe identifiziert werden. Superkomplex I₁IV₁, der bei den Proben aus Tabelle 3.5.6 sowohl bei CR als auch bei SCR Individuen detektiert werden konnte (vgl. hierzu auch Abbildung 5.4.2), kann hier in keiner der drei analysierten Proben gefunden werden. Dass der Superkomplex III₂IV₁ nur in der SCR Probe identifiziert werden kann, könnte auf einen Zerfall von Superkomplex a (I₁III₂IV₁) in individuellen Komplex I und Superkomplex III₂IV₁ zurückzuführen sein. Untermauert wird diese Hypothese von der Tatsache, dass die Menge von individuellem Komplex I in der SCR Probe gegenüber der Kontroll-Probe um 134% höher ist. Allerdings zeigt die SCR Probe generell leicht höhere Intensitäten als die Kontrolle und auch eine größere Menge von Superkomplex a, so dass nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob der Superkomplex III₂IV₁ aus dem Zerfall von Superkomplex a resultiert. In den beiden Proben von Individuen, die einer kalorien-

reduzierten Ernährung unterworfen waren, kann weiterhin neben dem Komplex IV Monomer (IV_1) auch das Dimer (IV_2) identifiziert werden. Dies wird auf den in Abbildung 5.4.4 gezeigten 2D-BN/SDS-Gelen deutlicher (rote Pfeile). Interessanterweise scheint bei der CR Probe das Komplex IV Monomer und bei der SCR Probe das Komplex IV Dimer zu überwiegen. Auf den 2D-BN/SDS-Gelen lässt sich weiterhin nochmals der enorme Rückgang der ATP-Synthase Menge bei der Probe von Individuen mit lebenslanger Kalorienrestriktion (CR) erkennen. α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers – bei der Kontroll- und SCR-Probe auch des Dimers – sind durch einen weißen Kreis markiert. Während bei der Kontrollprobe und der Probe von Fischen mit nur kurzzeitiger Kalorienrestriktion (SCR) beide Untereinheiten deutlich zu erkennen sind, zeigt die CR Probe hier nur sehr geringe Intensitäten und auch dies nur für das Monomer der ATP-Synthase. Bei der Kontroll-Probe scheint das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase etwas geringer zu sein als bei der SCR Probe, da für die Silberfärbung jedoch kein linearer Zusammenhang zwischen Färbeintensität und Proteinmenge besteht, kann dies nicht mit Sicherheit gesagt werden. Die Bestimmung des Monomer-Dimer-Verhältnisses aus der ersten Dimension ergibt einen Wert von 2,2 für die Kontrolle und von 1,6 für die SCR Probe, steht somit also der Abschätzung aus dem 2D-BN/SDS-Gel entgegen. Da insbesondere die Gelspur der Kontrolle im oberen Massenbereich der ersten Dimension einige Schlieren aufweist (vgl. Abbildung 5.4.3), kann nicht von einer akkuraten Quantifizierung ausgegangen werden. Auf dem 2D-BN/SDS-Gel der CR Probe sind zusätzlich die zum Superkomplex III_2IV_1 gehörenden Core Protein 1 und 2 Untereinheiten von Komplex III_2 durch einen blauen Kreis gekennzeichnet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die lebenslange Kalorienrestriktion im Muskelgewebe von *Nothobranchius furzeri* zu einer erheblichen Abnahme der ATP-Synthase Menge und einem vollständigen Vorliegen dieser als Monomer zu führen scheint. Auch die kurzzeitige Kalorienrestriktion (SCR) scheint eine Veränderung in Menge und Zusammensetzung der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung zu bewirken, da sich das Monomer-Dimer-Verhältnis im Vergleich zur *ad libitum* ernährten Kontrolle verändert und die SCR Probe außerdem als einzige den Superkomplex III_2IV_1 besitzt. Auch lassen sich nur bei den 2D-BN/SDS-Gelen der CR und SCR Probe Komplex IV Monomer (IV_1) und Dimer (IV_2) unterscheiden, wobei bei der CR Probe das Monomer und bei der SCR Probe das Dimer zu überwiegen scheint (vgl. Abbildung 5.4.4). Da diese Ergebnisse jedoch nur anhand einer Probe pro Ernährungszustand gewonnen wurden und für die CR und SCR Probe außerdem Gewebe männlicher und weiblicher Tiere in unterschiedlichem Verhältnis verwendet wurden, während als Kontrolle nur Gewebe eines einzigen weiblichen Fisches zur Verfügung stand, sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um verlässlichere Daten zu gewinnen.

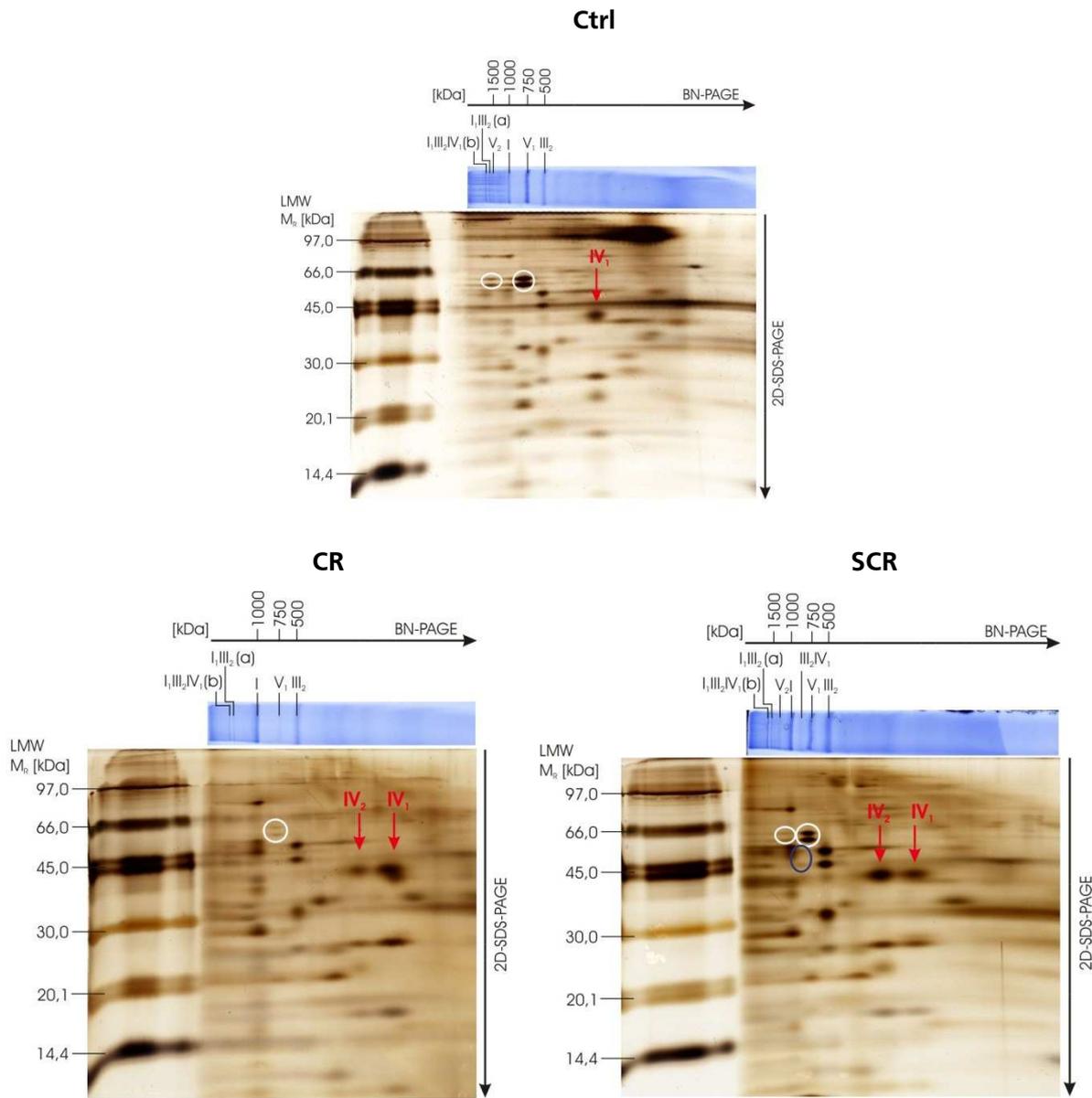


Abbildung 5.4.4 Silbergefärbte 2D-BN/SDS-Gele der *Nothobranchius furzeri* Proben aus Tabelle 3.5.7. Für die erste Dimension werden 40 µg Protein mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w) solubilisiert. Links auf jedem Gel ist jeweils 1 µL des LMW-Massenstandards aufgetragen. Über jedes 2D-BN/SDS-Gel ist ein mit Roti®-Blue Coomassie-gefärbter Gelstreifen der gleichen Probe in der ersten Dimension gelegt, um die Migration der denaturierten Komplexe und Superkomplexe in ihre Untereinheiten zu visualisieren. Im Gegensatz zur Kontroll-Probe können bei den Proben von *N. furzeri* Individuen mit lebenslanger (CR) oder kurzzeitiger Kalorienrestriktion (SCR) Monomer (IV₁) und Dimer (IV₂) von Komplex IV deutlich unterschieden werden (rote Pfeile). Interessanterweise scheint dabei bei der CR Probe das Monomer und bei der SCR Probe das Dimer von Komplex IV zu überwiegen. Deutlich zu erkennen ist weiterhin, dass in der CR Probe einerseits kein ATP-Synthase Dimer vorhanden ist und andererseits auch die Menge des Monomers im Vergleich mit den beiden anderen Proben wesentlich geringer ist (weiße Kreise; jeweils α- und β-Untereinheit). Das Verhältnis von ATP-Synthase Monomer und Dimer scheint bei der Kontroll-Probe etwas geringer zu sein als bei der SCR Probe, aufgrund der hier verwendeten, nicht quantitativen Silberfärbung kann dies jedoch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Der Superkomplex III₂IV₁ kann nur in der SCR Probe identifiziert werden. Auf dem entsprechenden 2D-BN/SDS-Gel sind die zu diesem Superkomplex gehörenden Core Protein 1 und 2 Untereinheiten von Komplex III₂ durch ein blaues Oval gekennzeichnet.

5.4.4 Einfluss des Antioxidans Resveratrol auf das mitochondriale Proteom von *N. furzeri*

Das Antioxidans Resveratrol gehört zu den Phytoalexinen und kommt in verschiedenen Pflanzen^[340], unter anderem in Schale und Kernen der roten Weinbeere^[128] vor und wird bei Pilzbefall gebildet^[340-342]. Es existieren zwei Konformationsisomere – *cis*- und *trans*-Resveratrol (siehe Abbildung 5.4.5) – von denen nur das *trans*-Isomer biologisch aktiv ist^[115]. Im Weiteren ist, wenn von „Resveratrol“ die Rede ist, immer das *trans*-Isomer gemeint. In das Licht der wissenschaftlichen Öffentlichkeit rückte Resveratrol durch das sogenannte „Französische Paradox“, das die Tatsache beschreibt, dass Franzosen trotz einer eher fettreichen Ernährung und dem vermehrten Konsum von Rotwein ein geringes Vorkommen kardiovaskulärer Erkrankungen zeigen und dies eventuell auf im Rotwein vorkommende sekundäre Pflanzenstoffe zurückzuführen ist^[343]. Resveratrol ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, da es bei verschiedenen Organismen, darunter auch *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*^[114] und *Nothobranchius furzeri*^[111, 116], Effekte, die eigentlich durch eine Kalorienrestriktion auftreten, imitiert und somit zu einer Verlängerung der Lebensspanne führt^[115]. In *N. furzeri* konnte eine Verlängerung der mittleren und maximalen Lebensspanne um 56% bzw. 59% bei einer Verabreichung von Resveratrol in einer Dosis von 600 µg pro Gramm Futter für erwachsene Tiere festgestellt werden^[116]. Weitere Effekte, die in *N. furzeri* durch Resveratrol hervorgerufen wurden, sind der Erhalt der lokomotorischen Funktion sowie eine verminderte Neurodegeneration bei 9 Wochen alten Fischen im Vergleich mit einer nicht behandelten Kontrollgruppe^[116]. Anhand der in Tabelle 3.5.8 aufgeführten Proben von *N. furzeri* Individuen, denen ab einem Alter von 5 Wochen über das Futter Resveratrol verabreicht wurde und einer Kontrollgruppe, die Resveratrol-freies Futter bekam, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit der Einfluss dieses Antioxidans auf das mitochondriale Proteom, insbesondere die Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung, untersucht werden. Wie schon bei der Analyse des Einflusses von Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom von *N. furzeri* (Abschnitt 5.4.3) ist auch hier die Probenmenge limitiert und es werden Gele mit einem Außenmaß von 10,5 x 10 cm² (H x B) für die erste und mit einem Außenmaß von 8,2 x 10 cm² (H x B) für die zweite Dimension angefertigt.

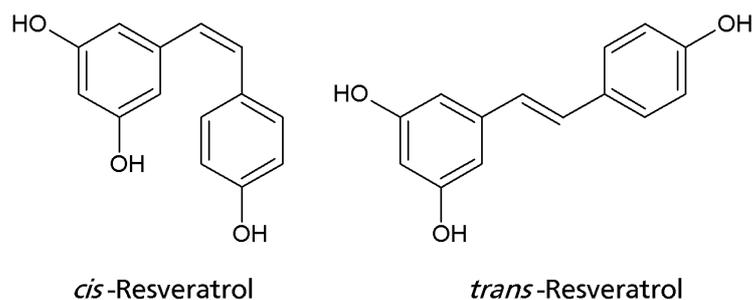


Abbildung 5.4.5 Strukturformeln des biologisch inaktiven *cis*- und des aktiven *trans*-Resveratrols.

In Abbildung 5.4.6 sind die Proben der mit Resveratrol behandelten Tiere (Resv.) und der Kontrollgruppe (Ctrl) auf einem BN-Gel verglichen. Bandenmuster und -intensitäten sind bei beiden Proben vergleichbar, es sind keine ausgeprägten Unterschiede erkennbar. Bei beiden Proben können die individuellen Atmungskettenkomplexe I, III₂ und IV₂ sowie die ATP-Synthase in monomerer (V₁) und dimerer (V₂) Form identifiziert werden und es sind Banden für die Superkomplexe III₂IV₁, I₁IV₁ und a-c (I₁III₂IV_{0,2}) erkennbar. Auch die charakteristische, sehr schmale Bande für das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) kann in beiden Proben identifiziert werden. Um eventuelle Unterschiede zwischen der Probe der mit Resveratrol behandelten Individuen von *N. furzeri* und der Kontrollgruppe besser sichtbar zu machen, wird von beiden Proben ein 2D-BN/SDS-Gel angefertigt (Abbildung 5.4.7). Auch hier zeigt sich für

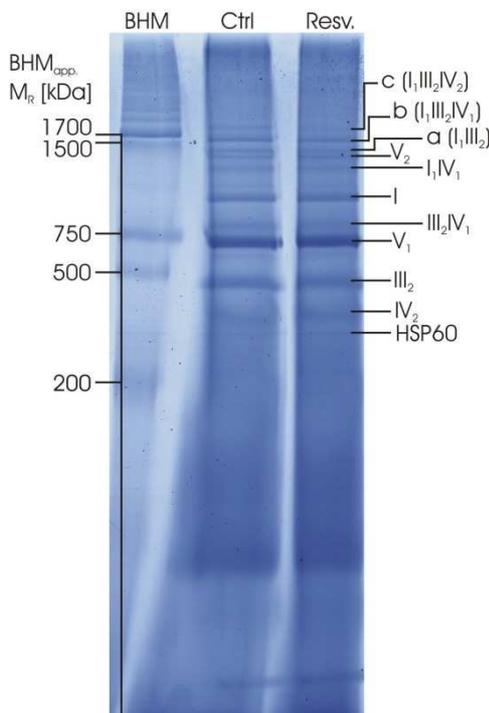


Abbildung 5.4.6 Mit Roti®-Blue gefärbtes BN-Gel der in Tabelle 3.5.8 aufgeführten Proben von *Nothobranchius furzeri*. Die Solubilisierung erfolgt mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w), aufgetragen sind je 80 µg Protein (vor Solubilisierung). In der linken Spur sind zusätzlich 20 µg Rinderherzmitochondrien als Massenstandard aufgetragen. Ausgeprägte Unterschiede zwischen den mit Resveratrol behandelten Tieren (Resv.) und der Kontrollgruppe (Ctrl) sind nicht erkennbar. Beide Proben zeigen ein vergleichbares Bandenmuster und ebenfalls vergleichbare Bandenintensitäten. Es können jeweils die individuellen Atmungskettenkomplexe I, III₂, IV₂ sowie Monomer (V₁) und Dimer (V₂) der ATP-Synthase identifiziert werden. Auch Banden für die Superkomplexe III₂IV₁, I₁IV₁ und a-c (I₁III₂IV_{0,2}) sowie das Hitzeschockprotein 60 (HSP60) sind erkennbar.

beide Proben zunächst ein vergleichbares Bild, einige Unterschiede lassen sich aber dennoch erkennen. So scheint die Resveratrol-Probe weniger individuellen Komplex IV₁ (blauer Pfeil) und eine etwas größere Menge an ATP-Synthase Dimer (V₂) zu besitzen als die Kontrollprobe. Auch die trimere (V₃) und tetramere (V₄) Form der ATP-Synthase – die beide auf dem BN-Gel noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten – scheinen in der Resveratrol-Probe in größerer Menge vorzuliegen. Bei dieser Interpretation muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei der Färbung mit Silber kein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Färbeintensität besteht, so dass quantitative Aussagen nur in einem sehr beschränkten Maße möglich sind.

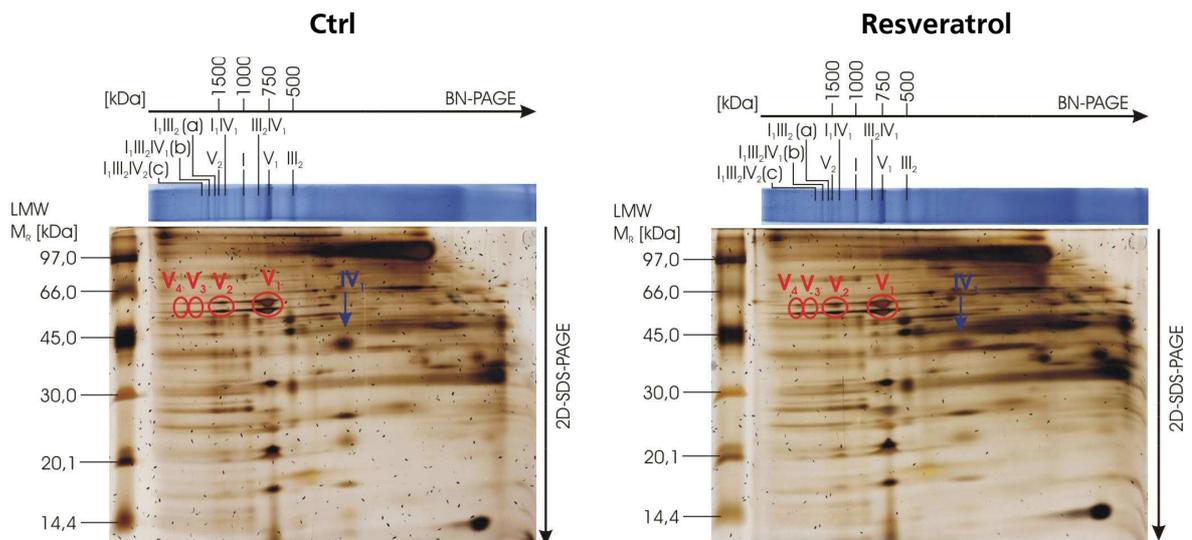


Abbildung 5.4.7 Silbergefärbte 2D-BN/SDS-Gele der *Nothobranchius furzeri* Proben aus Tabelle 3.5.8. Für die erste Dimension wurden 100 µg Protein mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 8:1 (w/w) solubilisiert. Auf jedem 2D-BN/SDS-Gel ist links 1 µL des LMW-Massenstandards aufgetragen. Ein mit Roti®-Blue Coomassiegefärbter Gelstreifen der gleichen Probe in der ersten Dimension ist über beide 2D-BN/SDS-Gele gelegt, um die Migration der denaturierten Komplexe und Superkomplexe in ihre Untereinheiten zu visualisieren. Die α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (V_1), Dimers (V_2), Trimers (V_3) und Tetramers (V_4) sind in rot gekennzeichnet. Die Gele der mit Resveratrol behandelten Tiere und der Kontrollgruppe (Ctrl) weisen zunächst ein vergleichbares Bild auf, es lassen sich jedoch kleinere Unterschiede feststellen. So scheint in der Resveratrol-Probe weniger individueller Komplex IV_1 (blaue Pfeile) und eine etwas größere Menge dimerer ATP-Synthase (V_2) vorhanden zu sein als bei der Kontroll-Gruppe. Auch die trimere (V_3) und tetramere (V_4) Form der ATP-Synthase – die beide auf dem BN-Gel noch nicht eindeutig identifiziert werden konnten – scheinen in der Resveratrol-Probe in größerer Menge vorzuliegen. Bei dieser Interpretation muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei der Färbung mit Silber kein linearer Zusammenhang zwischen Proteinmenge und Färbeintensität besteht, so dass quantitative Aussagen nur in einem sehr beschränkten Maße möglich sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass erste Hinweise auf eine Veränderung des mitochondrialen Proteoms im Muskelgewebe von *Nothobranchius furzeri* durch die Verabreichung von Resveratrol gefunden werden konnten. Diese scheinen sich insbesondere auf die Oligomerisierung der ATP-Synthase sowie das Vorliegen von individuellem Komplex IV_1 auszuwirken. Um verlässliche Aussagen über die Auswirkungen von Resveratrol in diesem Kontext treffen zu können sind jedoch noch weiterführende Analysen notwendig. Zusätzlich kann festgehalten werden, dass in den untersuchten Proben von Tieren mit und ohne Verabreichung von Resveratrol ebenso wie bei den in Abschnitt 5.4.1 und 5.4.2 untersuchten Proben der Superkomplex I_1IV_1 identifiziert werden konnte, der bislang nur aus Rinderherzmitochondrien^[3-5], dem filamentösen Pilz *Neurospora crassa*^[6, 7] und der Hefe *Yarrowia lipolytica*^[8] bekannt ist und eine direkte Interaktion der Komplexe I und IV der oxidativen Phosphorylierung beweist. Bei den in Abschnitt 5.4.3 untersuchten, unabhängigen Proben von *Nothobranchius furzeri* konnte dieser Superkomplex jedoch nicht gefunden werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

1D	erste Dimension
2D	zweite Dimension
AK	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AOX	<u>a</u> lternative <u>O</u> xidase
app.	<u>a</u> pparent
AQUA	<u>a</u> bsolute <u>Q</u> uantifizierung (von Proteinen mittels interner Standards)
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
B	Breite
BHM	Rinderherzmitochondrien (von engl. <i>bovine heart mitochondria</i>)
bidest.	zweifach entionisiert (<u>b</u> idestilliert)
BLAST	engl. <i>B</i> asic <i>L</i> ocal <i>A</i> lignment <i>S</i> earch <i>T</i> ool
BN	<u>b</u> lau- <u>n</u> ativ
BR	<u>B</u> acterio <u>r</u> hodopsin
BSA	Rinderserumalbumin (von engl. <i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Vernetzungsgrad (von engl. <i>crosslinker concentration</i>)
CDS	engl. <i>C</i> oding <i>S</i> equences
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CID	engl. <i>c</i> ollision- <i>i</i> nduced <i>d</i> issociation
CN	farblos-nativ (von engl. <i>colorless-</i> oder <i>clear-native</i>)
CR	Kalorienrestriktion (von engl. <i>calorie restriction</i>)
Ctrl	Kontrolle (von engl. <i>control</i>)
daf-2	<i>daf-2(e1370)</i>
DDM	<i>n</i> - <u>D</u> odecyl- β - <u>D</u> - <u>m</u> altosid
dest.	entionisiert (<u>d</u> estilliert)
DIGE	engl. <i>d</i> ifference <i>g</i> el <i>e</i> lectrophoresis
DMSO	<u>D</u> imethylsulf <u>o</u> xid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (von engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
<i>Drosophila</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
ECL	engl. <i>e</i> nhanced <i>c</i> hemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (von engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
engl.	Englisch
ESI	<u>E</u> lektrospray- <u>I</u> onisation
g	Erdschwerebeschleunigung ($1\text{ g} = 9,81\text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
GluSA	<u>G</u> lutamat- <u>S</u> emialdehyd

GRZ	<u>G</u> ona <u>R</u> e <u>Z</u> hou (ein Nationalpark in Zimbabwe aus dem der gleichnamige Stamm von <i>Nothobranchius furzeri</i> stammt)
GU	Grauwerteinheiten (von engl. <i>gray-units</i>)
H	Höhe
H ₀	Nullhypothese
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMW	engl. <i>high molecular weight</i>
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (von engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (von engl. <i>horse radish peroxidase</i>)
Hsp22	<u>22</u> kDa <u>H</u> itze <u>s</u> chock <u>p</u> rotein
Hsp23	<u>23</u> kDa <u>H</u> itze <u>s</u> chock <u>p</u> rotein
Hsp27	<u>27</u> kDa <u>H</u> itze <u>s</u> chock <u>p</u> rotein
HSP60	<u>60</u> kDa <u>H</u> itze <u>s</u> chock <u>p</u> rotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
II	I Instabilitäts-Index
juv	Juvenil
kbp	Kilobasenpaare
KE	Kollisionsenergie
Kyn	Kynurenin
LC	Flüssigkeitschromatographie (von engl. <i>liquid chromatography</i>)
LMW	engl. <i>low molecular weight</i>
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (von engl. <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>)
mtDNA	mitochondriale DNA
MilliQ-Wasser	gereinigtes, zweifach entionisiertes Wasser, Widerstand 18 MΩ, frei von Partikeln > 0,22 µm
M _R	Molekularmasse
MRM	engl. <i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MudPIT	multidimensionalen Proteinidentifikations-Technik (von engl. <i>multidimensional protein identification technology</i>)
NFKyn	<u>N</u> - <u>F</u> ormyl <u>k</u> ynurenin
<i>N. furzeri</i>	<i>Nothobranchius furzeri</i>
NPAF	engl. <i>normalized protein abundance factor</i>
OD	optische Dichte
OE	Überexpression (von engl. <i>overexpression</i>)
OSCP	engl. <i>Oligomycin sensitivity conferral protein</i>

OxPhos	<u>O</u> xidative <u>P</u> hosphorylierung
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit, Signifikanzwert (engl. <i>p-value</i> von <i>probability</i>)
PAF	engl. <i>protein abundance factor</i>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
<i>P. anserina</i>	<i>Podospora anserina</i>
PIC	<u>P</u> rotease <u>I</u> nhibitor <u>C</u> ocktail
pIDNA	<u>p</u> lasmide- <u>l</u> ike DNA
PMF	engl. <i>peptide mass fingerprinting</i>
PTMs	<u>p</u> ost <u>t</u> ranslationale <u>M</u> odifikationen
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylidendi <u>f</u> luorid
Q1	<u>Q</u> uadrupol <u>1</u>
Q2	<u>Q</u> uadrupol <u>2</u>
Q3	<u>Q</u> uadrupol <u>3</u>
Resv.	Resveratrol
RNAi	RNA-Interferenz
RNS	reaktive Stickstoffspezies (von engl. <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (von engl. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	<u>R</u> otationen <u>p</u> ro <u>M</u> inute
SAM	<u>S</u> - <u>A</u> denosyl <u>m</u> ethionin
SAM-OMT	SAM-abhängige <u>O</u> - <u>M</u> ethyl <u>t</u> ransferase
SCR	Kurzzeit-Kalorienrestriktion (von engl. <i>short-term calorie restriction</i>)
SCX	starke Kationenaustausch-Chromatographie (SCX, von engl. <i>strong cation exchange</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (von engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sen	<u>S</u> eneszent
sHsps	kleine Hitzeschockproteine (von engl. <i>small heat shock proteins</i>)
SIB	<u>S</u> wiss <u>I</u> nstitute for <u>B</u> ioinformatics
SOD	<u>S</u> uper <u>o</u> xid <u>d</u> ismutase
SRM	engl. <i>selected reaction monitoring</i>
T	<u>T</u> otalacrylamidkonzentration
TOF	Flugzeit (von engl. <i>time-of-flight</i>)
Trp	Tryptophan
TrpOH	Hydroxy-Tryptophan
UE	<u>U</u> nter <u>e</u> inheit
VDAC	engl. <i>voltage-dependent anion channel</i>
vgl.	Vergleiche
WT	<u>W</u> ildtyp

7 Literatur

- [1] Krause, F. (2004). "Biochemische Charakterisierung der supramolekularen Organisation der mitochondrialen OXPHOS-Komplexe von Säugern, Pilzen und Pflanzen." Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [2] Brys, K., Castelein, N., Matthijssens, F., Vanfleteren, J.R. & Braeckman, B.P. (2010). "Disruption of insulin signalling preserves bioenergetic competence of mitochondria in ageing *Caenorhabditis elegans*." *BMC Biol* **8** 91.
- [3] Krause, F. (2006). "Detection and analysis of protein-protein interactions in organellar and prokaryotic proteomes by native gel electrophoresis: (Membrane) protein complexes and supercomplexes." *Electrophoresis* **27** (13): 2759-2781.
- [4] Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2000). "Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria." *Embo J* **19** (8): 1777-1783.
- [5] Krause, F., Reifschneider, N.H., Goto, S. & Dencher, N.A. (2005). "Active oligomeric ATP synthases in mammalian mitochondria." *Biochem Biophys Res Commun* **329** (2): 583-590.
- [6] Marques, I., Dencher, N.A., Videira, A. & Krause, F. (2007). "Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria." *Eukaryot Cell* **6** (12): 2391-2405.
- [7] Duarte, M. & Videira, A. (2009). "Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*." *Mol Microbiol* **72** (1): 246-258.
- [8] Nübel, E., Wittig, I., Kerscher, S., Brandt, U. & Schägger, H. (2009). "Two-dimensional native electrophoretic analysis of respiratory supercomplexes from *Yarrowia lipolytica*." *Proteomics* **9** (9): 2408-2418.
- [9] De Vries, S., Van Witzenburg, R., Grivell, L.A. & Marres, C.A. (1992). "Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*." *Eur J Biochem* **203** (3): 587-592.
- [10] Luttik, M.A., Overkamp, K.M., Kotter, P., de Vries, S., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (1998). "The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH." *J Biol Chem* **273** (38): 24529-24534.
- [11] Small, W.C. & McAlister-Henn, L. (1998). "Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **180** (16): 4051-4055.
- [12] Skladal, D., Halliday, J. & Thorburn, D.R. (2003). "Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children." *Brain* **126** (Pt 8): 1905-1912.
- [13] Loeffen, J.L., Smeitink, J.A., Trijbels, J.M., Janssen, A.J., Triepels, R.H., Sengers, R.C. & van den Heuvel, L.P. (2000). "Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects." *Hum Mutat* **15** (2): 123-134.
- [14] Kim, S.K. (2007). "Common aging pathways in worms, flies, mice and humans." *J Exp Biol* **210** (Pt 9): 1607-1612.
- [15] Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., De Vreese, A., Van Eygen, S. & Vanfleteren, J.R. (2005). "DAF-2 pathway mutations and food restriction in aging *Caenorhabditis elegans* differentially affect metabolism." *Neurobiol Aging* **26** (5): 689-696.
- [16] Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H.T. & Larsson, N.G. (2004). "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase." *Nature* **429** (6990): 417-423.
- [17] King, R.C. (1974). "Handbook of Genetics: Volume 1: Bacteria, Bacteriophages, and Fungi." 1st Edition, Springer, New York.
- [18] Osiewacz, H.D. (2002). "Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*." *Mech Ageing Dev* **123** (7): 755-764.

-
- [19] Osiewacz, H.D. & Borghouts, C. (2000). "Mitochondrial oxidative stress and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *Ann N Y Acad Sci* **908** 31-39.
- [20] Osiewacz, H.D. (2007). "Was ein Pilz über das Altern verrät." *Biologie in unserer Zeit* **3** (37): 164-172.
- [21] Rizet, G. (1953). "[Impossibility of obtaining uninterrupted and unlimited multiplication of the ascomycete *Podospora anserina*]." *C R Hebd Seances Acad Sci* **237** (15): 838-840.
- [22] Scheckhuber, C.Q. & Osiewacz, H.D. (2008). "*Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing." *Mol Genet Genomics* **280** (5): 365-374.
- [23] Thimann, K.V. (1980). "*Senescence in Plants*." CRC Press, Boca Raton.
- [24] Delay, C. (1963). "Observations inframicroscopiques sur le mycelium "senescent" du *Podospora anserina* " *CR Acad Sci Paris* **256** (22): 4721-&.
- [25] Borghouts, C. & Osiewacz, H.D. (1998). "*GRISEA*, a copper-modulated transcription factor from *Podospora anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of *MAC1* in *Saccharomyces cerevisiae*." *Mol Gen Genet* **260** (5): 492-502.
- [26] Osiewacz, H.D. & Nuber, U. (1996). "*GRISEA*, a putative copper-activated transcription factor from *Podospora anserina* involved in differentiation and senescence." *Mol Gen Genet* **252** (1-2): 115-124.
- [27] Borghouts, C., Scheckhuber, C.Q., Werner, A. & Osiewacz, H.D. (2002). "Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan." *Biogerontology* **3** (3): 143-153.
- [28] Osiewacz, H.D. & Stumpferl, S.W. (2001). "Metabolism and aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *Arch Gerontol Geriatr* **32** (3): 185-197.
- [29] Muller, F. (2000). "The Nature and Mechanism of Superoxide Production by the Electron Transport Chain: Its Relevance to Aging." *J Amer Aging Assoc* **23** 227-253.
- [30] Barja, G. (1999). "Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity." *J Bioenerg Biomembr* **31** (4): 347-366.
- [31] Votyakova, T.V. & Reynolds, I.J. (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria." *J Neurochem* **79** (2): 266-277.
- [32] Osiewacz, H.D. & Esser, K. (1984). "The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: a mobile intron of a mitochondrial gene." *Curr Genet* **8** (4): 299-305.
- [33] Belcour, L., Begel, O., Mossé, M.O. & Vierny, C. (1981). "Mitochondrial DNA amplification in senescent cultures of *Podospora anserina*: variability between the retained, amplified genes." *Curr Genet* **3** (1): 13-21.
- [34] Kück, U., Stahl, U. & Esser, K. (1981). "Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*." *Curr Genet* **3** (2): 151-156.
- [35] Kück, U., Osiewacz, H.D., Schmidt, U., Kappelhoff, B., Schulte, E., Stahl, U. & Esser, K. (1985). "The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*." *Curr Genet* **9** (5): 373-382.
- [36] Cummings, D.J., Belcour, L. & Grandchamp, C. (1979). "Mitochondrial-DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures." *Molecular & General Genetics* **171** (3): 239-250.
- [37] Stahl, U., Lemke, P.A., Tudzynski, P., Kuck, U. & Esser, K. (1978). "Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*." *Molecular & General Genetics* **162** (3): 341-343.
- [38] Borghouts, C., Kimpel, E. & Osiewacz, H.D. (1997). "Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94** (20): 10768-10773.
- [39] Borghouts, C., Werner, A., Elthon, T. & Osiewacz, H.D. (2001). "Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *Molecular and Cellular Biology* **21** (2): 390-399.

- [40] Dufour, E., Boulay, J., Rincheval, V. & Sainsard-Chanet, A. (2000). "A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97** (8): 4138-4143.
- [41] van Diepeningen, A.D., Debets, A.J., Slakhorst, S.M. & Hoekstra, R.F. (2008). "Mitochondrial *pAL2-1* plasmid homologs are senescence factors in *Podospora anserina* independent of intrinsic senescence." *Biotechnol J* **3** (6): 791-802.
- [42] Boivin, A., Gaumer, S. & Sainsard-Chanet, A. (2008). "Life span extension by dietary restriction is reduced but not abolished by loss of both *SIR2* and *HST2* in *Podospora anserina*." *Mech Ageing Dev* **129** (12): 714-721.
- [43] van Diepeningen, A.D., Maas, M.F., Huberts, D.H., Goedbloed, D.J., Engelmoer, D.J., Slakhorst, S.M., Koopmanschap, A.B., Krause, F., Dencher, N.A., Sellem, C.H., Sainsard-Chanet, A., Hoekstra, R.F. & Debets, A.J. (2010). "Calorie restriction causes healthy life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *Mech Ageing Dev* **131** (1): 60-68.
- [44] Maas, M.F., de Boer, H.J., Debets, A.J. & Hoekstra, R.F. (2004). "The mitochondrial plasmid *pAL2-1* reduces calorie restriction mediated life span extension in the filamentous fungus *Podospora anserina*." *Fungal Genet Biol* **41** (9): 865-871.
- [45] Weindruch, R., Walford, R.L., Fligiel, S. & Guthrie, D. (1986). "The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake." *J Nutr* **116** (4): 641-654.
- [46] McCay, C.M., Crowell, M.F. & Maynard, L.A. (1935). "The effect of retarded growth upon the length of life span and upon the ultimate body size. ." *J Nutr* **10** (1): 63-79.
- [47] Houthoofd, K. & Vanfleteren, J.R. (2006). "The longevity effect of dietary restriction in *Caenorhabditis elegans*." *Exp Gerontol* **41** (10): 1026-1031.
- [48] Klass, M.R. (1977). "Aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*: major biological and environmental factors influencing life span." *Mech Ageing Dev* **6** (6): 413-429.
- [49] Houthoofd, K., Gems, D., Johnson, T.E. & Vanfleteren, J.R. (2007). "Dietary restriction in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Interdiscip Top Gerontol* **35** 98-114.
- [50] Braeckman, B.P., Demetrius, L. & Vanfleteren, J.R. (2006). "The dietary restriction effect in *C. elegans* and humans: is the worm a one-millimeter human?" *Biogerontology* **7** (3): 127-133.
- [51] Good, T.P. & Tatar, M. (2001). "Age-specific mortality and reproduction respond to adult dietary restriction in *Drosophila melanogaster*." *J Insect Physiol* **47** (12): 1467-1473.
- [52] Pletcher, S.D., Macdonald, S.J., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S.C., Goldstein, D.B. & Partridge, L. (2002). "Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*." *Curr Biol* **12** (9): 712-723.
- [53] Chippindale, A.K., Leroi, A.M., Kim, S.B. & Rose, M.R. (1993). "Phenotypic Plasticity and Selection in *Drosophila* Life-History Evolution .1. Nutrition and the Cost of Reproduction." *Journal of Evolutionary Biology* **6** (2): 171-193.
- [54] Terzibasi, E., Lefrancois, C., Domenici, P., Hartmann, N., Graf, M. & Cellerino, A. (2009). "Effects of dietary restriction on mortality and age-related phenotypes in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*." *Aging Cell* **8** (2): 88-99.
- [55] Groebe, K., Krause, F., Kunstmann, B., Unterluggauer, H., Reifschneider, N.H., Scheckhuber, C.Q., Sastri, C., Stegmann, W., Wozny, W., Schwall, G.P., Poznanovic, S., Dencher, N.A., Jansen-Durr, 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** (9): 887-898.
- [56] Braeckman, B.P. & Vanfleteren, J.R. (2007). "Genetic control of longevity in *C. elegans*." *Exp Gerontol* **42** (1-2): 90-98.
- [57] Klass, M. & Hirsh, D. (1976). "Non-ageing developmental variant of *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **260** (5551): 523-525.

- [58] Houthoofd, K. & Vanfleteren, J.R. (2007). "Public and private mechanisms of life extension in *Caenorhabditis elegans*." *Mol Genet Genomics* **277** (6): 601-617.
- [59] Kurz, C.L. & Tan, M.W. (2004). "Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*." *Aging Cell* **3** (4): 185-193.
- [60] D. Zarkower
"WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.84.1, <http://www.wormbook.org> ", 2006-02-10.
- [61] Maduro, M.F. "Cell fate specification in the *C. elegans* embryo." *Dev Dyn* **239** (5): 1315-1329.
- [62] Sulston, J.E., Schierenberg, E., White, J.G. & Thomson, J.N. (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **100** (1): 64-119.
- [63] Strange, K. (2003). "From genes to integrative physiology: ion channel and transporter biology in *Caenorhabditis elegans*." *Physiol Rev* **83** (2): 377-415.
- [64] Atlas Of *C. elegans* Anatomy - an illustrated handbook
"<http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/anatomyintro/anatomyintro.htm>", 2009-07-31.
- [65] Burnell, A.M., Houthoofd, K., O'Hanlon, K. & Vanfleteren, J.R. (2005). "Alternate metabolism during the dauer stage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Exp Gerontol* **40** (11): 850-856.
- [66] McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thomas, J.H. & Gems, D. (2004). "Shared transcriptional signature in *Caenorhabditis elegans* Dauer larvae and long-lived *daf-2* mutants implicates detoxification system in longevity assurance." *J Biol Chem* **279** (43): 44533-44543.
- [67] McElwee, J.J., Schuster, E., Blanc, E., Thornton, J. & Gems, D. (2006). "Diapause-associated metabolic traits reiterated in long-lived *daf-2* mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Mech Ageing Dev* **127** (5): 458-472.
- [68] Cassada, R.C. & Russell, R.L. (1975). "The dauerlarva, a post-embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **46** (2): 326-342.
- [69] *C. elegans* Sequencing Consortium (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." *Science* **282** (5396): 2012-2018.
- [70] Vanfleteren, J.R., De Vreese, A. & Braeckman, B.P. (1998). "Two-parameter logistic and Weibull equations provide better fits to survival data from isogenic populations of *Caenorhabditis elegans* in axenic culture than does the Gompertz model." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **53** (6): B393-403; discussion B404-398.
- [71] Johnson, T.E. (1990). "Increased life-span of *age-1* mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging." *Science* **249** (4971): 908-912.
- [72] Brooks, A., Lithgow, G.J. & Johnson, T.E. (1994). "Mortality rates in a genetically heterogeneous population of *Caenorhabditis elegans*." *Science* **263** (5147): 668-671.
- [73] Vaupel, J.W., Johnson, T.E. & Lithgow, G.J. (1994). "Rates of mortality in populations of *Caenorhabditis elegans*." *Science* **266** (5186): 826; author reply 828.
- [74] Herndon, L.A., Schmeissner, P.J., Dudaronek, J.M., Brown, P.A., Listner, K.M., Sakano, Y., Paupard, M.C., Hall, D.H. & Driscoll, M. (2002). "Stochastic and genetic factors influence tissue-specific decline in ageing *C. elegans*." *Nature* **419** (6909): 808-814.
- [75] Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A. & Tabtiang, R. (1993). "A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." *Nature* **366** (6454): 461-464.
- [76] Duhon, S.A. & Johnson, T.E. (1995). "Movement as an index of vitality: comparing wild type and the *age-1* mutant of *Caenorhabditis elegans*." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **50** (5): B254-261.
- [77] Russell, R.L. & Seppa, R.I. (1987). "Genetic and environmental manipulation of aging in *Caenorhabditis elegans*." *Basic Life Sci* **42** 35-48.

- [78] Bolanowski, M.A., Russell, R.L. & Jacobson, L.A. (1981). "Quantitative measures of aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. I. Population and longitudinal studies of two behavioral parameters." *Mech Ageing Dev* **15** (3): 279-295.
- [79] Johnson, T.E. (1987). "Aging can be genetically dissected into component processes using long-lived lines of *Caenorhabditis elegans*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84** (11): 3777-3781.
- [80] Hosono, R. (1978). "Age dependent changes in the behavior of *Caenorhabditis elegans* on attraction to *Escherichia coli*." *Exp Gerontol* **13** (1-2): 31-36.
- [81] Croll, N.A., Smith, J.M. & Zuckerman, B.M. (1977). "The aging process of the nematode *Caenorhabditis elegans* in bacterial and axenic culture." *Exp Aging Res* **3** (3): 175-189.
- [82] Melov, S., Lithgow, G.J., Fischer, D.R., Tedesco, P.M. & Johnson, T.E. (1995). "Increased frequency of deletions in the mitochondrial genome with age of *Caenorhabditis elegans*." *Nucleic Acids Res* **23** (8): 1419-1425.
- [83] Melov, S., Hertz, G.Z., Stormo, G.D. & Johnson, T.E. (1994). "Detection of deletions in the mitochondrial genome of *Caenorhabditis elegans*." *Nucleic Acids Res* **22** (6): 1075-1078.
- [84] Lakowski, B. & Hekimi, S. (1996). "Determination of life-span in *Caenorhabditis elegans* by four clock genes." *Science* **272** (5264): 1010-1013.
- [85] Kenyon, C. (2005). "The plasticity of aging: insights from long-lived mutants." *Cell* **120** (4): 449-460.
- [86] Tatar, M., Bartke, A. & Antebi, A. (2003). "The endocrine regulation of aging by insulin-like signals." *Science* **299** (5611): 1346-1351.
- [87] Kimura, K.D., Tissenbaum, H.A., Liu, Y. & Ruvkun, G. (1997). "*daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **277** (5328): 942-946.
- [88] Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M.L., Larsen, P.L. & Riddle, D.L. (1998). "Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **150** (1): 129-155.
- [89] Dorman, J.B., Albinder, B., Shroyer, T. & Kenyon, C. (1995). "The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **141** (4): 1399-1406.
- [90] Van Voorhies, W.A. & Ward, S. (1999). "Genetic and environmental conditions that increase longevity in *Caenorhabditis elegans* decrease metabolic rate." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (20): 11399-11403.
- [91] Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.H., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A., An, H.J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R.M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P.V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Busam, D.A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J.M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L.B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A.D., Dew, I., Dietz, S.M., Dodson, K., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Garg, N.S., Gelbart, W.M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G.H., Ke, Z., Kennison, J.A., Ketchum, K.A., Kimmel, B.E., Kodira, C.D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N.V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S.M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D.M., Nelson, D.L., Nelson, K.A., Nixon, K., Nusskern, D.R., Pacleb, J.M., Palazzolo, M., Pittman, G.S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A.C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskaas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A.H., Wang, X., Wang, Z.Y., Wassarman, D.A., Weinstock, G.M., Weissenbach, J., Williams, S.M., Woodage, T., Worley, K.C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q.A., Ye, J., Yeh, R.F., Zaveri, J.S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X.H., Zhong, F.N., Zhong, W., Zhou, X.,

- Zhu, S., Zhu, X., Smith, H.O., Gibbs, R.A., Myers, E.W., Rubin, G.M. & Venter, J.C. (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* **287** (5461): 2185-2195.
- [92] Helfand, S.L. & Rogina, B. (2003). "Genetics of aging in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*." *Annu Rev Genet* **37** 329-348.
- [93] Helfand, S.L. & Rogina, B. (2003). "From genes to aging in *Drosophila*." *Adv Genet* **49** 67-109.
- [94] Johnson, T.E., Lithgow, G.J. & Murakami, S. (1996). "Hypothesis: interventions that increase the response to stress offer the potential for effective life prolongation and increased health." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **51** (6): B392-395.
- [95] Arking, R. (2006). "Biology of Aging: Observations and Principles." 3rd Edition, Oxford University Press, Oxford, New York.
- [96] Helfand, S.L. & Rogina, B. (2003). "Molecular genetics of aging in the fly: is this the end of the beginning?" *Bioessays* **25** (2): 134-141.
- [97] Loeb, J. & Northrop, J.H. (1916). "Is There a Temperature Coefficient for the Duration of Life?" *Proc Natl Acad Sci U S A* **2** (8): 456-457.
- [98] Miquel, J., Lundgren, P.R., Bensch, K.G. & Atlan, H. (1976). "Effects of temperature on the life span, vitality and fine structure of *Drosophila melanogaster*." *Mech Ageing Dev* **5** (5): 347-370.
- [99] Morrow, G., Samson, M., Michaud, S. & Tanguay, R.M. (2004). "Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress." *FASEB J* **18** (3): 598-599.
- [100] Morrow, G., Inaguma, Y., Kato, K. & Tanguay, R.M. (2000). "The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization." *J Biol Chem* **275** (40): 31204-31210.
- [101] Wheeler, J.C., Bieschke, E.T. & Tower, J. (1995). "Muscle-specific expression of *Drosophila hsp70* in response to aging and oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** (22): 10408-10412.
- [102] King, V. & Tower, J. (1999). "Aging-specific expression of *Drosophila hsp22*." *Dev Biol* **207** (1): 107-118.
- [103] Informationsdienst Wissenschaft
"http://idw-online.de/pages/de/news281266", 2008-10-02.
- [104] Terzibasi, E., Valenzano, D.R., Benedetti, M., Roncaglia, P., Cattaneo, A., Domenici, L. & Cellerino, A. (2008). "Large differences in aging phenotype between strains of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*." *PLoS One* **3** (12): e3866.
- [105] Genade, T., Benedetti, M., Terzibasi, E., Roncaglia, P., Valenzano, D.R., Cattaneo, A. & Cellerino, A. (2005). "Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research." *Aging Cell* **4** (5): 223-233.
- [106] Seegers, L. (1997). "Aqualog: Killifishes of the World: Old World Killis II." Germany: Mörfelden-Walldorf.
- [107] Murphy, W.J. & Collier, G.E. (1999). "Phylogenetic Relationships of African Killifishes in the Genera *Aphyosemion* and *Fundulopanchax* Inferred from Mitochondrial DNA Sequences." *Mol Phy Evol* **11** (3): 351-360.
- [108] Hrbek, T. & Larson, A. (1999). "The evolution of diapause in the killifish Family Rivulidae (*Atherinomorpha*, *Cyprinodontiformes*): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective." *Evolution* **53** 1200-1216.
- [109] Nothobranchius.de
"http://www.nothobranchius.de/html/furzeri-populationen.html", 2008-10-31.
- [110] Seluanov, A., Chen, Z., Hine, C., Sasahara, T.H., Ribeiro, A.A., Catania, K.C., Presgraves, D.C. & Gorbunova, V. (2007). "Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan." *Aging Cell* **6** (1): 45-52.
- [111] Valenzano, D.R. & Cellerino, A. (2006). "Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule." *Cell Cycle* **5** (10): 1027-1032.

- [112] Terzibasi, E., Valenzano, D.R. & Cellerino, A. (2007). "*The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies.*" *Exp Gerontol* **42** (1-2): 81-89.
- [113] Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L. & Cellerino, A. (2006). "*Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*.*" *Aging Cell* **5** (3): 275-278.
- [114] Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. & Sinclair, D. (2004). "*Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans.*" *Nature* **430** (7000): 686-689.
- [115] Anekonda, T.S. (2006). "*Resveratrol - a boon for treating Alzheimer's disease?*" *Brain Res Rev* **52** (2): 316-326.
- [116] Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. & Cellerino, A. (2006). "*Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate.*" *Curr Biol* **16** (3): 296-300.
- [117] Medvedev, Z.A. (1990). "*An attempt at a rational classification of theories of ageing.*" *Biol Rev Camb Philos Soc* **65** (3): 375-398.
- [118] Promislow, D.E. (1994). "*DNA repair and the evolution of longevity: a critical analysis.*" *J Theor Biol* **170** (3): 291-300.
- [119] Kim, S., Kaminker, P. & Campisi, J. (2002). "*Telomeres, aging and cancer: In search of a happy ending.*" *Oncogene* **21** (4): 503-511.
- [120] Kirkwood, T.B., Boys, R.J., Gillespie, C.S., Proctor, C.J., Shanley, D.P. & Wilkinson, D.J. (2003). "*Towards an e-biology of ageing: integrating theory and data.*" *Nat Rev Mol Cell Biol* **4** (3): 243-249.
- [121] Wallace, D.C. (1999). "*Mitochondrial diseases in man and mouse.*" *Science* **283** (5407): 1482-1488.
- [122] Sohal, R.S. & Weindruch, R. (1996). "*Oxidative stress, caloric restriction, and aging.*" *Science* **273** (5271): 59-63.
- [123] Muller, F. (2000). "*The Nature and Mechanism of Superoxide Production by the Electron Transport Chain: Its Relevance to Aging.*" *J Amer Aging Assoc* **23** 227-253.
- [124] LeDoux, S.P., Wilson, G.L., Beecham, E.J., Stevensner, T., Wassermann, K. & Bohr, V.A. (1992). "*Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells.*" *Carcinogenesis* **13** (11): 1967-1973.
- [125] Thyagarajan, B., Padua, R.A. & Campbell, C. (1996). "*Mammalian mitochondria possess homologous DNA recombination activity.*" *J Biol Chem* **271** (44): 27536-27543.
- [126] Osborne, T.B., Mendel, L.B. & Ferry, E.L. (1917). "*The Effect of Retardation of Growth Upon the Breeding Period and Duration of Life of Rats.*" *Science* **45** (1160): 294-295.
- [127] Lane, M.A., Roth, G.S. & Ingram, D.K. (2007). "*Caloric restriction mimetics: a novel approach for biogerontology.*" *Methods Mol Biol* **371** 143-149.
- [128] Langcake, P. & Pryce, R.J. (1977). "*A new class of phytoalexins from grapevines.*" *Experientia* **33** (2): 151-152.
- [129] Saager, M. (2010). "*Abhängigkeit des Lipidmusters in biologischen Membranen vom physiologischen Zustand.*" Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [130] Gredilla, R., Grief, J. & Osiewacz, H.D. (2006). "*Mitochondrial free radical generation and lifespan control in the fungal aging model *Podospira anserina*.*" *Exp Gerontol* **41** (4): 439-447.
- [131] 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.
- [132] Schäfer, E.R. (2007). "*Vergleich des mitochondrialen Rattenhirnproteoms verschiedener Altersstufen mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie.*" Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.

- [133] Bloeck, F. (2011). "Age-Associated Changes in the Mitochondrial Proteome of the Annual Killifish *Nothobranchius furzeri*." Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [134] Reifschneider, N.H. (2006). "Elektrophoretische und massenspektrometrische Analyse des mitochondrialen Proteoms von Eukaryonten." Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [135] Radák, Z., Sasvari, M., Nyakas, C., Taylor, A.W., Ohno, H., Nakamoto, H. & Goto, S. (2000). "Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle." *Arch Biochem Biophys* **383** (1): 114-118.
- [136] Brewer, G.J., Jones, T.T., Wallimann, T. & Schlattner, U. (2004). "Higher respiratory rates and improved creatine stimulation in brain mitochondria isolated with anti-oxidants." *Mitochondrion* **4** (1): 49-57.
- [137] Heidrich, N.G. (2011). "Isolierung, Charakterisierung und strukturelle Untersuchung von Membranproteinkomplexen aus verschiedenen Organismen." Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- [138] Rexroth, S., Meyer zu Tittingdorf, J.M., Krause, F., Dencher, N.A. & Seelert, H. (2003). "Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome." *Electrophoresis* **24** (16): 2814-2823.
- [139] Blum, H., Beier, H. & Gross, H.J. (1987). "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **8** 93-99.
- [140] Rabilloud, T., Carpentier, G. & Tarroux, P. (1988). "Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite." *Electrophoresis* **9** (6): 288-291.
- [141] Haan, C. & Behrmann, I. (2007). "A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background." *J Immunol Methods* **318** (1-2): 11-19.
- [142] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* **68** (5): 850-858.
- [143] Wolters, D.A., Washburn, M.P. & Yates, J.R., 3rd (2001). "An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics." *Anal Chem* **73** (23): 5683-5690.
- [144] Washburn, M.P., Wolters, D. & Yates, J.R., 3rd (2001). "Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology." *Nat Biotechnol* **19** (3): 242-247.
- [145] Wu, C.C. & Yates, J.R., 3rd (2003). "The application of mass spectrometry to membrane proteomics." *Nat Biotechnol* **21** (3): 262-267.
- [146] Wolters, D.A. (2004). "Anwendungen der MudPIT Technologie." *BIOSpektrum* **10** (2): 162-164.
- [147] Yocum, A.K. & Chinnaiyan, A.M. (2009). "Current affairs in quantitative targeted proteomics: multiple reaction monitoring-mass spectrometry." *Brief Funct Genomic Proteomic* **8** (2): 145-157.
- [148] Gross, J.H. (2004). "Mass Spectrometry: A Textbook." Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- [149] McNaught, A.D., Wilkinson, A. (1997). "IUPAC Compendium of Chemical Terminology." 2nd Edition, Blackwell Science, Oxford.
- [150] Haber, F., Weiss, J. (1932). "Über die Katalyse des Hydroperoxydes." *Naturwissenschaften* **20** (51): 948-950.
- [151] Manzanares, D., Rodriguez-Capote, K., Liu, S., Haines, T., Ramos, Y., Zhao, L., Doherty-Kirby, A., Lajoie, G. & Possmayer, F. (2007). "Modification of tryptophan and methionine residues is implicated in the oxidative inactivation of surfactant protein B." *Biochemistry* **46** (18): 5604-5615.
- [152] Resource Processing Industries Branch
["http://www.ic.gc.ca/app/ccc/srch/nvgt.do?lang=eng&prt1=1&sbPrt1=&estblmntNo=123456216271&profile=cmpltPrfl&profileId=201&app=sold"](http://www.ic.gc.ca/app/ccc/srch/nvgt.do?lang=eng&prt1=1&sbPrt1=&estblmntNo=123456216271&profile=cmpltPrfl&profileId=201&app=sold), 2009-04-30.

- [153] Frenzel, M. (2006). "Altersabhängige Untersuchung des Proteoms von *Rattus norvegicus*." Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [154] Pang, J.X., Ginanni, N., Dongre, A.R., Hefta, S.A. & Opitek, G.J. (2002). "Biomarker discovery in urine by proteomics." *J Proteome Res* **1** (2): 161-169.
- [155] Gao, J., Opiteck, G.J., Friedrichs, M.S., Dongre, A.R. & Hefta, S.A. (2003). "Changes in the protein expression of yeast as a function of carbon source." *J Proteome Res* **2** (6): 643-649.
- [156] Liu, H., Sadygov, R.G. & Yates, J.R., 3rd (2004). "A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics." *Anal Chem* **76** (14): 4193-4201.
- [157] Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J. & Kuster, B. (2007). "Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review." *Anal Bioanal Chem* **389** (4): 1017-1031.
- [158] Chelius, D. & Bondarenko, P.V. (2002). "Quantitative profiling of proteins in complex mixtures using liquid chromatography and mass spectrometry." *J Proteome Res* **1** (4): 317-323.
- [159] Wang, W., Zhou, H., Lin, H., Roy, S., Shaler, T.A., Hill, L.R., Norton, S., Kumar, P., Anderle, M. & Becker, C.H. (2003). "Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards." *Anal Chem* **75** (18): 4818-4826.
- [160] Wang, G., Wu, W.W., Zeng, W., Chou, C.L. & Shen, R.-F. (2006). "Label-Free Protein Quantification Using LC-Coupled Ion Trap or FT Mass Spectrometry: Reproducibility, Linearity, and Application with Complex Proteomes." *J Proteome Res* **5** (5): 1214-1223.
- [161] Higgs, R.E., Knierman, M.D., Gelfanova, V., Butler, J.P. & Hale, J.E. (2005). "Comprehensive Label-Free Method for the Relative Quantification of Proteins from Biological Samples." *J Proteome Res* **4** (4): 1442-1450.
- [162] Wiener, M.C., Sachs, J.R., Deyanova, E.G. & Yates, N.A. (2004). "Differential mass spectrometry: a label-free LC-MS method for finding significant differences in complex peptide and protein mixtures." *Anal Chem* **76** (20): 6085-6096.
- [163] Desiderio, D.M. & Kai, M. (1983). "Preparation of stable isotope-incorporated peptide internal standards for field desorption mass spectrometry quantification of peptides in biologic tissue." *Biomed Mass Spectrom* **10** (8): 471-479.
- [164] Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W. & Gygi, S.P. (2003). "Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (12): 6940-6945.
- [165] Kettenbach, A.N., Rush, J. & Gerber, S.A. "Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides." *Nat Protoc* **6** (2): 175-186.
- [166] Oestreich, M., Romberg, O. (2009). "Keine Panik vor Statistik!" 2., überarbeitete Auflage, Vieweg+Teubner Verlag, Wiesbaden.
- [167] Microsoft
"http://office.microsoft.com/de-de/excel-help/stabw-HP005209277.aspx", 2011-03-16.
- [168] Wilcoxon, F. (1945). "Individual Comparisons by Ranking Methods." *Biometrics Bulletin* **1** (6): 80-83.
- [169] Mann, H.B. & Whitney, D.R. (1947). "On a Test of Whether One of 2 Random Variables Is Stochastically Larger Than the Other." *Annals of Mathematical Statistics* **18** (1): 50-60.
- [170] A.F. Siegel
"http://www.scribd.com/doc/14752535/Excel-Manual", 2011-03-25.
- [171] Center für Digitale Systeme (CeDiS) Freie Universität Berlin
"http://web.neuostatistik.de/inhalte_web/content/MOD_32593/html/comp_32647.html", 2005-11-07.
- [172] Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M.D. & Dencher, N.A. (2010). "Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex." *Exp Gerontol* **45** (7-8): 563-572.

- [173] Söhn, M. (2010). "Der Einfluss von Altern und Kalorienreduktion auf das mitochondriale Proteom des Rattenhirns." Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [174] Thilmann, S. (2008). "Effekte des Alterns und der kurzzeitigen Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom der Rattenleber." Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [175] Lombardi, A., Silvestri, E., Cioffi, F., Senese, R., Lanni, A., Goglia, F., de Lange, P. & Moreno, M. (2009). "Defining the transcriptomic and proteomic profiles of rat ageing skeletal muscle by the use of a cDNA array, 2D- and Blue native-PAGE approach." *J Proteomics* **72** (4): 708-721.
- [176] Gomez, L.A., Monette, J.S., Chavez, J.D., Maier, C.S. & Hagen, T.M. (2009). "Supercomplexes of the mitochondrial electron transport chain decline in the aging rat heart." *Arch Biochem Biophys* **490** (1): 30-35.
- [177] Dani, D., Shimokawa, I., Komatsu, T., Higami, Y., Warnken, U., Schokraie, E., Schnolzer, M., Krause, F., Sugawa, M.D. & Dencher, N.A. (2010). "Modulation of oxidative phosphorylation machinery signifies a prime mode of anti-ageing mechanism of calorie restriction in male rat liver mitochondria." *Biogerontology* **11** (3): 321-334.
- [178] Powell, D.W., Weaver, C.M., Jennings, J.L., McAfee, K.J., He, Y., Weil, P.A. & Link, A.J. (2004). "Cluster analysis of mass spectrometry data reveals a novel component of SAGA." *Mol Cell Biol* **24** (16): 7249-7259.
- [179] McAfee, K.J., Duncan, D.T., Assink, M. & Link, A.J. (2006). "Analyzing proteomes and protein function using graphical comparative analysis of tandem mass spectrometry results." *Mol Cell Proteomics* **5** (8): 1497-1513.
- [180] Zeth, K. & Thein, M. (2010). "Porins in prokaryotes and eukaryotes: common themes and variations." *Biochem J* **431** (1): 13-22.
- [181] Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L. (2003). "Biochemie." 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [182] UniProtKB
["http://www.uniprot.org/uniprot/B2B736"](http://www.uniprot.org/uniprot/B2B736), 2011-03-08.
- [183] Hegner, D. (1980). "Age-dependence of molecular and functional changes in biological membrane properties." *Mech Ageing Dev* **14** (1-2): 101-118.
- [184] Goncalves, R.P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J.N. & Scheuring, S. (2007). "Supramolecular assembly of VDAC in native mitochondrial outer membranes." *J Mol Biol* **369** (2): 413-418.
- [185] O'Toole, J.F., Patel, H.V., Naples, C.J., Fujioka, H. & Hoppel, C.L. (2010). "Decreased cytochrome c mediates an age-related decline of oxidative phosphorylation in rat kidney mitochondria." *Biochem J* **427** (1): 105-112.
- [186] Karp, G. (2010). "Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments." 6th Edition, John Wiley & Sons Inc., Hoboken.
- [187] Chorna, S.V., Dosenko, V., Strutynska, N.A., Vavilova, H.L. & Sahach, V.F. (2010). "Increased expression of voltage-dependent anion channel and adenine nucleotide translocase and the sensitivity of calcium-induced mitochondrial permeability transition opening pore in the old rat heart." *Fiziol Zh* **56** (4): 19-25.
- [188] Heyde, M., Laloi, P. & Portalier, R. (2000). "Involvement of carbon source and acetyl phosphate in the external-pH-dependent expression of porin genes in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* **182** (1): 198-202.
- [189] Li, M., Xiao, Z.Q., Chen, Z.C., Li, J.L., Li, C., Zhang, P.F. & Li, M.Y. (2007). "Proteomic analysis of the aging-related proteins in human normal colon epithelial tissue." *J Biochem Mol Biol* **40** (1): 72-81.
- [190] Hofer, T., Servais, S., Seo, A.Y., Marzetti, E., Hiona, A., Upadhyay, S.J., Wohlgemuth, S.E. & Leeuwenburgh, C. (2009). "Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction." *Mech Ageing Dev* **130** (5): 297-307.

- [191] Csiszar, A., Labinsky, N., Orosz, Z., Xiangmin, Z., Buffenstein, R. & Ungvari, Z. (2007). "Vascular aging in the longest-living rodent, the naked mole rat." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293** (2): H919-927.
- [192] Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. & Schagger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F1FO-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." *Embo J* **17** (24): 7170-7178.
- [193] Rexroth, S., Meyer Zu Tittingdorf, J.M., Schwassmann, H.J., Krause, F., Seelert, H. & Dencher, N.A. (2004). "Dimeric H⁺-ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*." *Biochim Biophys Acta* **1658** (3): 202-211.
- [194] Eubel, H., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S. & Braun, H.P. (2004). "Respiratory chain supercomplexes in plant mitochondria." *Plant Physiol Biochem* **42** (12): 937-942.
- [195] van Lis, R., Atteia, A., Mendoza-Hernandez, G. & Gonzalez-Halphen, D. (2003). "Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach." *Plant Physiol* **132** (1): 318-330.
- [196] Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J. & Braun, H.P. (2005). "Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane." *FEBS Lett* **579** (25): 5769-5772.
- [197] Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. & Dencher, N.A. (2004). "'Respirasome'-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach." *J Biol Chem* **279** (46): 48369-48375.
- [198] Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A. & Osiewacz, H.D. (2006). "OXPHOS Supercomplexes: respiration and life-span control in the aging model *Podospora anserina*." *Ann N Y Acad Sci* **1067** 106-115.
- [199] Giraud, M.F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J.P. & Velours, J. (2002). "Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?" *Biochim Biophys Acta* **1555** (1-3): 174-180.
- [200] Wittig, I., Carozzo, R., Santorelli, F.M. & Schagger, H. (2006). "Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation." *Biochim Biophys Acta* **1757** (9-10): 1066-1072.
- [201] Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. & Walker, J.E. (2000). "The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution." *Nat Struct Biol* **7** (11): 1055-1061.
- [202] Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D.A., Mavelli, I. & Lippe, G. (2002). "Dimerization of FOF1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1." *Biochim Biophys Acta* **1556** (2-3): 133-141.
- [203] Paumard, P., Vaillier, J., Coulary, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. & Velours, J. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." *Embo J* **21** (3): 221-230.
- [204] Nelson, D. & Cox, M. (2001). "Lehninger Biochemie." Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- [205] Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J.N. & Scheuring, S. (2007). "Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes." *Biophys J* **93** (8): 2870-2876.
- [206] Brust, D., Daum, B., Breunig, C., Hamann, A., Kuhlbrandt, W. & Osiewacz, H.D. (2010). "Cyclophilin D links programmed cell death and organismal aging in *Podospora anserina*." *Aging Cell* **9** (5): 761-775.
- [207] Frenzel, M. (2011). "Mitochondrial ageing in rat brain areas and human fibroblasts." Doktorarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- [208] Schultz, B.E. & Chan, S.I. (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30** 23-65.
- [209] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. (1996). "The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å." *Science* **272** (5265): 1136-1144.

- [210] Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M.J., Libeu, C.P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. & Tsukihara, T. (1998). "Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase." *Science* **280** (5370): 1723-1729.
- [211] Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M., Ishimura, Y. & Yoshikawa, S. (2003). "The low-spin heme of cytochrome c oxidase as the driving element of the proton-pumping process." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (26): 15304-15309.
- [212] Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., Aoyama, H., Tsukihara, T. & Yoshikawa, S. (2007). "A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome c oxidase." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104** (19): 7881-7886.
- [213] Vonck, J. & Schafer, E. (2009). "Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane." *Biochim Biophys Acta* **1793** (1): 117-124.
- [214] Wittig, I., Karas, M. & Schagger, H. (2007). "High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes." *Mol Cell Proteomics* **6** (7): 1215-1225.
- [215] Berry, E.A. & Trumppower, B.L. (1985). "Isolation of ubiquinol oxidase from *Paracoccus denitrificans* and resolution into cytochrome bc1 and cytochrome c-aa3 complexes." *J Biol Chem* **260** (4): 2458-2467.
- [216] Schägger, H. & Pfeiffer, K. (2001). "The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **276** (41): 37861-37867.
- [217] Schägger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria." *Biochim Biophys Acta* **1555** (1-3): 154-159.
- [218] Wittig, I. & Schagger, H. (2009). "Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes." *Biochim Biophys Acta* **1787** (6): 672-680.
- [219] Krause, F., Scheckhuber, C.Q., Werner, A., Rexroth, S., Reifschneider, N.H., Dencher, N.A. & Osiewacz, H.D. (2004). "Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospira anserina*." *J Biol Chem* **279** (25): 26453-26461.
- [220] Fernandez-Vizarra, E., Tiranti, V. & Zeviani, M. (2009). "Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects." *Biochim Biophys Acta* **1793** (1): 200-211.
- [221] Vázquez-Acevedo, M., Antaramian, A., Corona, N. & González-Halphen, D. (1993). "Subunit structures of purified beef mitochondrial cytochrome bc1 complex from liver and heart." *J Bioenerg Biomembr* **25** (4): 401-410.
- [222] Crofts, A.R. (2004). "The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure." *Annu Rev Physiol* **66** 689-733.
- [223] Mitchell, P. (1976). "Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems." *J Theor Biol* **62** (2): 327-367.
- [224] Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A. & Harris, D.L. (1991). "Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation." *Biochemistry* **30** (14): 3576-3582.
- [225] Fariss, M.W., Chan, C.B., Patel, M., Van Houten, B. & Orrenius, S. (2005). "Role of mitochondria in toxic oxidative stress." *Mol Interv* **5** (2): 94-111.
- [226] Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." *Am J Physiol* **271** (5 Pt 1): C1424-1437.
- [227] Acker, H. (2005). "The oxygen sensing signal cascade under the influence of reactive oxygen species." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **360** (1464): 2201-2210.
- [228] Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W. & Sheu, S.S. (2004). "Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle." *Am J Physiol Cell Physiol* **287** (4): C817-833.

- [229] Waypa, G.B., Marks, J.D., Guzy, R., Mungai, P.T., Schriewer, J., Dokic, D. & Schumacker, P.T. (2010). "Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells." *Circ Res* **106** (3): 526-535.
- [230] Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J. & Finkel, T. (2000). "Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism." *Mol Cell Biol* **20** (19): 7311-7318.
- [231] Werner, E. & Werb, Z. (2002). "Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases." *J Cell Biol* **158** (2): 357-368.
- [232] Dada, L.A., Chandel, N.S., Ridge, K.M., Pedemonte, C., Bertorello, A.M. & Sznajder, J.I. (2003). "Hypoxia-induced endocytosis of Na,K-ATPase in alveolar epithelial cells is mediated by mitochondrial reactive oxygen species and PKC-zeta." *J Clin Invest* **111** (7): 1057-1064.
- [233] Ischiropoulos, H. & Beckman, J.S. (2003). "Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?" *J Clin Invest* **111** (2): 163-169.
- [234] Lenaz, G. (2001). "The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology." *IUBMB Life* **52** (3-5): 159-164.
- [235] Schilling, G. (2010). "Oxidativer Stress." *labor&more* **6** (3): 50-52.
- [236] Bénit, P., Lebon, S. & Rustin, P. (2009). "Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency." *Biochim Biophys Acta* **1793** (1): 181-185.
- [237] Brandt, U., Kerscher, S., Drose, S., Zwicker, K. & Zickermann, V. (2003). "Proton pumping by NADH:ubiquinone oxidoreductase. A redox driven conformational change mechanism?" *FEBS Lett* **545** (1): 9-17.
- [238] Lazarou, M., Thorburn, D.R., Ryan, M.T. & McKenzie, M. (2009). "Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease." *Biochim Biophys Acta* **1793** (1): 78-88.
- [239] Fearnley, I.M. & Walker, J.E. (1992). "Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins." *Biochim Biophys Acta* **1140** (2): 105-134.
- [240] Carroll, J., Fearnley, I.M., Shannon, R.J., Hirst, J. & Walker, J.E. (2003). "Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria." *Mol Cell Proteomics* **2** (2): 117-126.
- [241] Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M.W., Ragan, C.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1985). "Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase." *Nature* **314** (6012): 592-597.
- [242] Chomyn, A., Cleeter, M.W., Ragan, C.I., Riley, M., Doolittle, R.F. & Attardi, G. (1986). "URF6, last unidentified reading frame of human mtDNA, codes for an NADH dehydrogenase subunit." *Science* **234** (4776): 614-618.
- [243] Fearnley, I.M., Carroll, J., Shannon, R.J., Runswick, M.J., Walker, J.E. & Hirst, J. (2001). "GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I)." *J Biol Chem* **276** (42): 38345-38348.
- [244] Lufei, C., Ma, J., Huang, G., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Ong, C.T. & Cao, X. (2003). "GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction." *Embo J* **22** (6): 1325-1335.
- [245] Huang, G., Lu, H., Hao, A., Ng, D.C., Ponniah, S., Guo, K., Lufei, C., Zeng, Q. & Cao, X. (2004). "GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I." *Mol Cell Biol* **24** (19): 8447-8456.
- [246] Brown, M.D., Starikovskaya, E., Derbeneva, O., Hosseini, S., Allen, J.C., Mikhailovskaya, I.E., Sukernik, R.I. & Wallace, D.C. (2002). "The role of mtDNA background in disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup J." *Hum Genet* **110** (2): 130-138.

- [247] Valentino, M.L., Barboni, P., Ghelli, A., Bucchi, L., Rengo, C., Achilli, A., Torroni, A., Lugaresi, A., Lodi, R., Barbiroli, B., Dotti, M., Federico, A., Baruzzi, A. & Carelli, V. (2004). "The *ND1* gene of complex I is a mutational hot spot for Leber's hereditary optic neuropathy." *Ann Neurol* **56** (5): 631-641.
- [248] Loeffen, J., Smeitink, J., Triepels, R., Smeets, R., Schuelke, M., Sengers, R., Trijbels, F., Hamel, B., Mullaart, R. & van den Heuvel, L. (1998). "The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome." *Am J Hum Genet* **63** (6): 1598-1608.
- [249] Marella, M., Seo, B.B., Yagi, T. & Matsuno-Yagi, A. (2009). "Parkinson's disease and mitochondrial complex I: a perspective on the *Ndi1* therapy." *J Bioenerg Biomembr* **41** (6): 493-497.
- [250] Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B. & Schägger, H. (2004). "Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*." *J Biol Chem* **279** (6): 5000-5007.
- [251] Acin-Perez, R., Bayona-Bafaluy, M.P., Fernandez-Silva, P., Moreno-Loshuertos, R., Perez-Martos, A., Bruno, C., Moraes, C.T. & Enriquez, J.A. (2004). "Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria." *Mol Cell* **13** (6): 805-815.
- [252] de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhom, N., Lombes, A., de Baulny, H.O., Niaudet, P., Munnich, A., Rustin, P. & Rotig, A. (2001). "A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure." *Nat Genet* **29** (1): 57-60.
- [253] Fernández-Vizarra, E., Bugiani, M., Goffrini, P., Carrara, F., Farina, L., Procopio, E., Donati, A., Uziel, G., Ferrero, I. & Zeviani, M. (2007). "Impaired complex III assembly associated with *BCS1L* gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy." *Hum Mol Genet* **16** (10): 1241-1252.
- [254] Diaz, F., Fukui, H., Garcia, S. & Moraes, C.T. (2006). "Cytochrome *c* oxidase is required for the assembly/stability of respiratory complex I in mouse fibroblasts." *Mol Cell Biol* **26** (13): 4872-4881.
- [255] Li, Y., D'Aurelio, M., Deng, J.H., Park, J.S., Manfredi, G., Hu, P., Lu, J. & Bai, Y. (2007). "An assembled complex IV maintains the stability and activity of complex I in mammalian mitochondria." *J Biol Chem* **282** (24): 17557-17562.
- [256] Chance, B. & Williams, G.R. (1955). "A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation." *Nature* **176** (4475): 250-254.
- [257] Hackenbrock, C.R., Chazotte, B. & Gupte, S.S. (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." *J Bioenerg Biomembr* **18** (5): 331-368.
- [258] Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." *Annu Rev Biochem* **54** 1015-1069.
- [259] Capaldi, R.A. (1982). "Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane." *Biochim Biophys Acta* **694** (3): 291-306.
- [260] Sone, N., Sekimachi, M. & Kutoh, E. (1987). "Identification and properties of a quinol oxidase super-complex composed of a *bc1* complex and cytochrome oxidase in the thermophilic bacterium *PS3*." *J Biol Chem* **262** (32): 15386-15391.
- [261] Iwasaki, T., Wakagi, T., Isogai, Y., Iizuka, T. & Oshima, T. (1995). "Resolution of the aerobic respiratory system of the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. II. Characterization of the archaeal terminal oxidase subcomplexes and implication for the intramolecular electron transfer." *J Biol Chem* **270** (52): 30893-30901.
- [262] Ragan, C.I. & Heron, C. (1978). "The interaction between mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase and ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase. Evidence for stoichiometric association." *Biochem J* **174** (3): 783-790.
- [263] Fowler, L.R. & Richardson, S.H. (1963). "Studies on the electron transfer system. L. On the mechanism of reconstitution of the mitochondrial electron transfer system." *J Biol Chem* **238** 456-463.

- [264] Hatefi, Y. & Rieske, J.S. (1967). "The preparation and properties of DPNH-cytochrome c reductase (complex I-III of the respiratory chain)." *Methods Enzymol* **10** 225-231.
- [265] Fowler, L.R. & Hatefi, Y. (1961). "Reconstitution of the electron transport system. III. Reconstitution of DPNH oxidase, succinic oxidase, and DPNH, succinic oxidase." *Biochem Biophys Res Commun* **5** 203-208.
- [266] Tisdale, H.D. (1967). "Preparation and properties of succinic-cytochrome c reductase (complex II-III)." *Methods Enzymol* **10** 213-216.
- [267] Blair, P.V. (1967). "Preparation and properties of repeating units of electron transfer." *Methods Enzymol* **10** 208-212.
- [268] Cruciat, C.M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. & Stuart, R.A. (2000). "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria." *J Biol Chem* **275** (24): 18093-18098.
- [269] Eubel, H., Jansch, L. & Braun, H.P. (2003). "New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II." *Plant Physiol* **133** (1): 274-286.
- [270] Eubel, H., Heinemeyer, J. & Braun, H.P. (2004). "Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria." *Plant Physiol* **134** (4): 1450-1459.
- [271] Schägger, H., de Coo, R., Bauer, M.F., Hofmann, S., Godinot, C. & Brandt, U. (2004). "Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **279** (35): 36349-36353.
- [272] Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A. & Krause, F. (2006). "Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE." *J Proteome Res* **5** (5): 1117-1132.
- [273] Bultema, J.B., Braun, H.P., Boekema, E.J. & Kouril, R. (2009). "Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato." *Biochim Biophys Acta* **1787** (1): 60-67.
- [274] Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. & Vonck, J. (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **281** (22): 15370-15375.
- [275] Wittig, I. & Schägger, H. (2005). "Advantages and limitations of clear-native PAGE." *Proteomics* **5** (17): 4338-4346.
- [276] Ackrell, B.A., Kearney, E.B. & Edmondson, D. (1975). "Mechanism of the reductive activation of succinate dehydrogenase." *J Biol Chem* **250** (18): 7114-7119.
- [277] Hägerhäll, C. (1997). "Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme." *Biochim Biophys Acta* **1320** (2): 107-141.
- [278] Schäfer, E., Dencher, N.A., Vonck, J. & Parcej, D.N. (2007). "Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I1III2IV1 from bovine heart mitochondria." *Biochemistry* **46** (44): 12579-12585.
- [279] Bianchi, C., Genova, M.L., Parenti Castelli, G. & Lenaz, G. (2004). "The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis." *J Biol Chem* **279** (35): 36562-36569.
- [280] Pfeiffer, K., Gohil, V., Stuart, R.A., Hunte, C., Brandt, U., Greenberg, M.L. & Schagger, H. (2003). "Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes." *J Biol Chem* **278** (52): 52873-52880.
- [281] Zhang, M., Mileykovskaya, E. & Dowhan, W. (2005). "Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria." *J Biol Chem* **280** (33): 29403-29408.
- [282] Mileykovskaya, E., Zhang, M. & Dowhan, W. (2005). "Cardiolipin in energy transducing membranes." *Biochemistry (Mosc)* **70** (2): 154-158.
- [283] McKenzie, M., Lazarou, M., Thorburn, D.R. & Ryan, M.T. (2006). "Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth Syndrome patients." *J Mol Biol* **361** (3): 462-469.

-
- [284] Wernicke, C., Hellmann, J., Zieba, B., Kuter, K., Ossowska, K., Frenzel, M., Dencher, N.A. & Rommelspacher, H. (2010). "9-Methyl-beta-carboline has restorative effects in an animal model of Parkinson's disease." *Pharmacol Rep* **62** (1): 35-53.
- [285] Appel, T.R. "Lipidanalyse-Kit - Quantitative Dünnschichtchromatographie." appel@gymnasium-otterndorf.de.
- [286] Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* **37** (8): 911-917.
- [287] Hulbert, A.J. (2005). "On the importance of fatty acid composition of membranes for aging." *J Theor Biol* **234** (2): 277-288.
- [288] Lewin, M.B. & Timiras, P.S. (1984). "Lipid changes with aging in cardiac mitochondrial membranes." *Mech Ageing Dev* **24** (3): 343-351.
- [289] Lee, H.J., Mayette, J., Rapoport, S.I. & Bazinet, R.P. (2006). "Selective remodeling of cardiolipin fatty acids in the aged rat heart." *Lipids Health Dis* **5** 2.
- [290] Rattan, S.I. (2009). "Synthesis, modification and turnover of proteins during aging." *Adv Exp Med Biol* **694** 1-13.
- [291] Soskic, V., Groebe, K. & Schrattenholz, A. (2008). "Nonenzymatic posttranslational protein modifications in ageing." *Exp Gerontol* **43** (4): 247-257.
- [292] Stefani, M. (2008). "Protein folding and misfolding on surfaces." *Int J Mol Sci* **9** (12): 2515-2542.
- [293] Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." *J Gerontol* **11** (3): 298-300.
- [294] Stadtman, E.R. (2006). "Protein oxidation and aging." *Free Radic Res* **40** (12): 1250-1258.
- [295] Stadtman, E.R., Van Remmen, H., Richardson, A., Wehr, N.B. & Levine, R.L. (2005). "Methionine oxidation and aging." *Biochim Biophys Acta* **1703** (2): 135-140.
- [296] Stadtman, E.R. (2004). "Role of oxidant species in aging." *Curr Med Chem* **11** (9): 1105-1112.
- [297] Levine, R.L. (2002). "Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease." *Free Radic Biol Med* **32** (9): 790-796.
- [298] Wells-Knecht, M.C., Lyons, T.J., McCance, D.R., Thorpe, S.R. & Baynes, J.W. (1997). "Age-dependent increase in ortho-tyrosine and methionine sulfoxide in human skin collagen is not accelerated in diabetes. Evidence against a generalized increase in oxidative stress in diabetes." *J Clin Invest* **100** (4): 839-846.
- [299] Squier, T.C. & Bigelow, D.J. (2000). "Protein oxidation and age-dependent alterations in calcium homeostasis." *Front Biosci* **5** D504-526.
- [300] Baynes, J.W. (2001). "The role of AGEs in aging: causation or correlation." *Exp Gerontol* **36** (9): 1527-1537.
- [301] Hunzinger, C., Wozny, W., Schwall, G.P., Poznanovic, S., Stegmann, W., Zengerling, H., Schoepf, R., Groebe, K., Cahill, M.A., Osiewacz, H.D., Jagemann, N., Bloch, M., Dencher, N.A., Krause, F. & Schrattenholz, 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** (3): 625-633.
- [302] Korlimbinis, A. & Truscott, R.J. (2006). "Identification of 3-hydroxykynurenine bound to proteins in the human lens. A possible role in age-related nuclear cataract." *Biochemistry* **45** (6): 1950-1960.
- [303] Taylor, S.W., Fahy, E., Murray, J., Capaldi, R.A. & Ghosh, S.S. (2003). "Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins." *J Biol Chem* **278** (22): 19587-19590.

- [304] Mattson, M.P. (2009). "Roles of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in obesity, the metabolic syndrome, and associated vascular and neurodegenerative disorders." *Exp Gerontol* **44** (10): 625-633.
- [305] Siems, W. & Grune, T. (2003). "Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal." *Mol Aspects Med* **24** (4-5): 167-175.
- [306] Nadkarni, D.V. & Sayre, L.M. (1995). "Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal." *Chem Res Toxicol* **8** (2): 284-291.
- [307] Poli, G., Schaur, R.J., Siems, W.G. & Leonarduzzi, G. (2008). "4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest." *Med Res Rev* **28** (4): 569-631.
- [308] Chen, J., Robinson, N.C., Schenker, S., Frosto, T.A. & Henderson, G.I. (1999). "Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake." *Hepatology* **29** (6): 1792-1798.
- [309] Musatov, A., Carroll, C.A., Liu, Y.C., Henderson, G.I., Weintraub, S.T. & Robinson, N.C. (2002). "Identification of bovine heart cytochrome c oxidase subunits modified by the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal." *Biochemistry* **41** (25): 8212-8220.
- [310] Lashin, O.M., Szweida, P.A., Szweida, L.I. & Romani, A.M. (2006). "Decreased complex II respiration and HNE-modified SDH subunit in diabetic heart." *Free Radic Biol Med* **40** (5): 886-896.
- [311] Lovell, M.A., Ehmann, W.D., Mattson, M.P. & Markesbery, W.R. (1997). "Elevated 4-hydroxynonenal in ventricular fluid in Alzheimer's disease." *Neurobiol Aging* **18** (5): 457-461.
- [312] MacCoss, M.J., Wu, C.C. & Yates, J.R., 3rd (2002). "Probability-based validation of protein identifications using a modified SEQUEST algorithm." *Anal Chem* **74** (21): 5593-5599.
- [313] UNIMOD protein modifications for mass spectrometry
"http://www.unimod.org/modifications_list.php?", 2011-05-08.
- [314] Potgieter, H.C., Ubbink, J.B., Bissbort, S., Bester, M.J., Spies, J.H. & Vermaak, W.J. (1997). "Spontaneous oxidation of methionine: effect on the quantification of plasma methionine levels." *Anal Biochem* **248** (1): 86-93.
- [315] *Podospora anserina* Genome Project
"http://podospora.igmors.u-psud.fr/", 2010-07-13.
- [316] UniProtKB
"http://www.uniprot.org/uniprot/B2A947", 2011-04-05.
- [317] Swiss Institute of Bioinformatics
"http://expasy.org/tools/protparam.html", 2003-01-22.
- [318] Guruprasad, K., Reddy, B.V. & Pandit, M.W. (1990). "Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence." *Protein Eng* **4** (2): 155-161.
- [319] SelectW3
"http://www.selectscience.net/product-news/thermo-fisher-scientific/thermo-fisher-scientifics-new-tsq-vantage-lc-ms+ms-delivers-highest-sensitivity--up-to-10-times-more-than-existing-systems/?artID=15072", 2011-05-06.
- [320] Stebbing, A.R. (1982). "Hormesis - the stimulation of growth by low levels of inhibitors." *Sci Total Environ* **22** (3): 213-234.
- [321] Sell, D.R., Strauch, C.M., Shen, W. & Monnier, V.M. (2007). "2-amino adipic acid is a marker of protein carbonyl oxidation in the aging human skin: effects of diabetes, renal failure and sepsis." *Biochem J* **404** (2): 269-277.
- [322] Abel, T. & Zukin, R.S. (2008). "Epigenetic targets of HDAC inhibition in neurodegenerative and psychiatric disorders." *Curr Opin Pharmacol* **8** (1): 57-64.

- [323] Fischer, A., Sananbenesi, F., Mungenast, A. & Tsai, L.H. (2010). "Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders." *Trends Pharmacol Sci* **31** (12): 605-617.
- [324] Sananbenesi, F. & Fischer, A. (2009). "The epigenetic bottleneck of neurodegenerative and psychiatric diseases." *Biol Chem* **390** (11): 1145-1153.
- [325] Fan, X., Zhang, J., Theves, M., Strauch, C., Nemet, I., Liu, X., Qian, J., Giblin, F.J. & Monnier, V.M. (2009). "Mechanism of lysine oxidation in human lens crystallins during aging and in diabetes." *J Biol Chem* **284** (50): 34618-34627.
- [326] Requena, J.R., Chao, C.C., Levine, R.L. & Stadtman, E.R. (2001). "Glutamic and aminoadipic semialdehydes are the main carbonyl products of metal-catalyzed oxidation of proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (1): 69-74.
- [327] Blumenthal, T., Squire, M., Kirtland, S., Cane, J., Donegan, M., Spieth, J. & Sharrock, W. (1984). "Cloning of a yolk protein gene family from *Caenorhabditis elegans*." *J Mol Biol* **174** (1): 1-18.
- [328] Fallert-Müller, A. (1999/2000). "Lexikon der Biochemie." 1. Auflage, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München, Heidelberg.
- [329] Zhang, S., Wang, S., Li, H. & Li, L. (2011). "Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector." *Int J Biochem Cell Biol* **43** (3): 303-305.
- [330] Engelmann, F. (1979). "Insect vitellogenin: identification, biosynthesis, and the role in vitellogenesis." *Adv Insect Physiol* **14** 49-108.
- [331] Piulacks, M.D., Guidugli, K.R., Cruz, J., Simoes, Z.I.P. & Belles, X. (2003). "The vitellogenin of the honey bee *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression study." *Insect Biochem Mol Biol* **33** 459-465.
- [332] Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N. & Goto, S. (1999). "Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*." *Biochem Biophys Res Commun* **264** (2): 580-583.
- [333] Swiss Institute of Bioinformatics
"http://expasy.org/tools/blast/", 2011-05-20.
- [334] WormBase
"http://www.wormbase.org/db/searches/blast_blat", 2011-05-20.
- [335] Matrix Science Limited
"http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF", 2011-05-20.
- [336] Camby, I., Le Mercier, M., Lefranc, F. & Kiss, R. (2006). "Galectin-1: a small protein with major functions." *Glycobiology* **16** (11): 137R-157R.
- [337] Chen, H.J., Chen, Y.M. & Chang, C.M. (2002). "Lipoyl dehydrogenase catalyzes reduction of nitrated DNA and protein adducts using dihydrolipoic acid or ubiquinol as the cofactor." *Chem Biol Interact* **140** (3): 199-213.
- [338] Sengupta, R., Billiar, T.R., Atkins, J.L., Kagan, V.E. & Stoyanovsky, D.A. (2009). "Nitric oxide and dihydrolipoic acid modulate the activity of caspase 3 in HepG2 cells." *FEBS Lett* **583** (21): 3525-3530.
- [339] Freedman, R.B. (1989). "Protein disulfide isomerase: multiple roles in the modification of nascent secretory proteins." *Cell* **57** (7): 1069-1072.
- [340] de la Lastra, C.A. & Villegas, I. (2005). "Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: mechanisms and clinical implications." *Mol Nutr Food Res* **49** (5): 405-430.
- [341] Fremont, L., Belguendouz, L. & Delpal, S. (1999). "Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids." *Life Sci* **64** (26): 2511-2521.
- [342] Pervaiz, S. (2003). "Resveratrol: from grapevines to mammalian biology." *FASEB J* **17** (14): 1975-1985.

-
- [343] Nanji, A.A. & French, S.W. (1986). "*Alcoholic beverages and coronary heart disease.*" *Atherosclerosis* **60** (2): 197-198.

Anhang

A *Podospora anserina*

A.1 Quantifizierung der Atmungskettenkomplexe und -superkomplexe

Normierungsfaktoren

Um Proben verschiedener Individuen vergleichen zu können, ist eine entsprechende Vergleichsgröße unabdingbar. Normiert man auf die eingesetzte Proteinmenge und berechnet diese anhand der in Tabelle 5.1.1 angegebenen Werte der „alten“ Proteinkonzentration, so müssen keine zusätzlichen Normierungsfaktoren berechnet werden, da die tatsächlich für die 2D-BN/SDS-Gele eingesetzte Proteinmenge anhand eben dieser Konzentration berechnet wurde. Möchte man die quantitativen Daten jedoch auf die ebenfalls in Tabelle 5.1.1 angegebene „neue“ Proteinkonzentration normieren, müssen entsprechende Faktoren berechnet werden. Dies geschieht mit Hilfe folgender Formel.

$$F = \frac{m_{alt}}{m_{neu}} = \frac{m_{alt}}{(m_{alt} \cdot c_{neu})/c_{alt}}$$

Die auf diese Weise berechneten Normierungsfaktoren für alle Individuen finden sich in Tabelle A.1.

Ebenfalls als Vergleichsgröße herangezogen werden können die Menge an Porin der äußeren Mitochondrienmembran oder die Gesamtfärbeintensität auf einem Glycin-SDS-Gel (Erläuterung hierzu siehe Abschnitt 5.1.1). Die entsprechenden Faktoren finden sich ebenfalls in Tabelle A.1.

Um Unterschiede in der Färbeintensität der 2D-BN/SDS-Gele auszugleichen und somit den Vergleich verschiedener Gele möglich zu machen, wird, wie in Kapitel 4.8.1.2 ausführlich beschrieben, auf jedes Gel die gleiche Menge des LMW-Massenstandards aufgetragen und ein Normierungsfaktor für jedes einzelne Gel berechnet, welcher die Abweichung der Färbeintensität eines Gels von der durchschnittlichen Färbeintensität aller betrachteten Gele widerspiegelt. Im Gegensatz zu den als Vergleichsgröße eingesetzten Normierungsfaktoren erhält man somit nicht nur für jedes Individuum sondern auch für jedes Gel einen eigenen Normierungsfaktor. Diese sind in Tabelle A.2 aufgelistet.

Tabelle A.1 Normierungsfaktoren für die Verwendung der „neuen“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1), der Menge an Porin der äußeren Mitochondrienmembran oder der Gesamtfärbeintensität auf einem Glycin-SDS-Gel als Vergleichsgröße für die quantitative Analyse der 2D-BN/SDS-Gele von *Podospora anserina*. Angegeben sind die Art des Normierungsfaktors sowie zugehöriges Alter und Kulturnummer des jeweiligen Individuums.

Alter	Kulturnummer	Art der Normierung	Normierungsfaktor
6d	#52	neue Proteinkonzentration	1,71428571
		SDS-Gel	1,00000000
		Porin	1,00000000
	#53	neue Proteinkonzentration	0,76250000
		SDS-Gel	1,40233297
		Porin	0,92094326
	#55	neue Proteinkonzentration	1,16296296
		SDS-Gel	1,14889831
		Porin	1,05257737
9d	#64	neue Proteinkonzentration	2,03666667
		SDS-Gel	0,51668592
		Porin	0,66755890
	#65	neue Proteinkonzentration	1,44000000
		SDS-Gel	1,10686375
		Porin	1,04735145
	#66	neue Proteinkonzentration	0,87750000
		SDS-Gel	1,23049013
		Porin	0,32914240
13d	#54	neue Proteinkonzentration	0,95000000
		SDS-Gel	1,25536830
		Porin	0,96150152
	#56	neue Proteinkonzentration	1,43272727
		SDS-Gel	0,95390807
		Porin	0,97061145
	#57	neue Proteinkonzentration	3,05454545
		SDS-Gel	0,53504544
		Porin	0,76251162
sen	#61	neue Proteinkonzentration	1,84285714
		SDS-Gel	0,85675387
		Porin	0,76113708
	#62	neue Proteinkonzentration	2,62878788
		SDS-Gel	0,64806291
		Porin	0,99054133
	#60	neue Proteinkonzentration	1,16956522
		SDS-Gel	1,10688543
		Porin	0,62058473

Tabelle A.2 Anhand der ersten fünf Banden des LMW-Massenstandards ermittelte Normierungsfaktoren zum Ausgleich von Gel-zu-Gel-Variationen der Färbeintensität auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina* unter Angabe von Alter, Kulturnummer und Gelreplikat.

Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Normierungsfaktor
6d	#52	1	1,68648022
		2	1,49924916
		3	0,61271533
	#53	1	1,68304292
		2	1,25029745
		3	1,62156567
	#55	1	1,07525192
		2	1,39072583
		3	1,46189457
9d	#64	1	0,74738888
		2	0,67035063
		3	0,79114071
	#65	1	0,87127155
		2	1,52558270
		3	1,08855177
	#66	1	1,64555347
		2	0,74415323
		3	1,01049521
13d	#54	1	1,61729174
		2	1,87451684
		3	1,55757468
	#56	1	0,87584973
		2	0,61966436
		3	0,78078280
	#57	1	0,44855238
		2	0,85098166
		3	0,55091980
sen	#61	1	1,15490276
		2	1,80807283
		3	2,39945891
	#62	1	0,89107575
		2	0,91133642
		3	1,08123808
	#60	1	1,66885599
		2	0,65059246
		3	1,64180937

Rohdaten

Tabelle A.3 Intensitäten der Markerbanden von Phosphorylase b (97,0 kDa), Albumin (66,0 kDa) und Ovalbumin (45,0 kDa) des LMW-Massenstandards in GU auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina*; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]		
			Phosphorylase b	Albumin	Ovalbumin
6d	#52	1	81,83711	202,47834	353,40369
		2	116,38718	201,48013	326,91298
		3	350,38050	485,30083	727,21192
	#53	1	101,14383	191,75343	292,41651
		2	160,74026	239,44831	372,23894
		3	119,66456	163,67126	284,53816
	#55	1	186,80082	258,81016	445,96580
		2	168,07648	214,05023	287,34115
		3	85,20855	218,51559	346,54163
9d	#64	1	248,25092	393,53268	611,66459
		2	311,46697	458,85116	657,02153
		3	242,62116	368,52438	548,79509
	#65	1	182,38979	323,62640	514,01997
		2	105,45695	128,56715	328,53989
		3	175,08542	290,90654	350,85362
	#66	1	106,89546	167,02565	269,55396
		2	326,85632	362,98350	555,76442
		3	212,94212	251,62611	433,20317
13d	#54	1	117,33733	192,66613	319,23288
		2	115,13553	170,65995	281,50341
		3	109,59934	210,85118	302,07784
	#56	1	208,99500	389,63824	556,89560
		2	379,09671	558,94945	704,28028
		3	250,57436	442,78889	590,78518
	#57	1	392,78592	650,11398	1152,63217
		2	233,77633	449,12850	637,19039
		3	340,92522	602,56544	866,67257
sen	#61	1	197,40009	279,09363	403,32212
		2	118,08547	175,18743	251,08833
		3	58,38378	106,79467	230,77403
	#62	1	273,52558	341,47819	528,08267
		2	240,57522	327,34568	523,26246
		3	170,79811	234,41794	473,66082
	#60	1	135,86499	177,63421	270,45821
		2	355,38892	473,04982	719,35953
		3	121,34798	195,50532	290,32290

Tabelle A.4 Intensitäten der Markerbanden von Carboanhydrase (30,0 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa) des LMW-Massenstandards in GU auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *Podospora anserina*; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplik	Intensität [GU]		
			Carboanhydrase	Trypsin-Inhibitor	α -Lactalbumin
6d	#52	1	190,95470	196,51672	497,73344
		2	271,22350	190,35756	499,00554
		3	603,90657	464,90114	1113,70138
	#53	1	220,62977	177,42367	347,73213
		2	306,81054	223,22396	553,85914
		3	261,50579	183,48626	450,18096
	#55	1	361,55200	267,57929	529,11138
		2	282,23090	197,51652	436,48193
		3	283,52102	245,44236	415,99002
9d	#64	1	514,07469	418,49633	950,34270
		2	539,33426	437,32519	1043,19187
		3	471,39113	418,19696	992,99702
	#65	1	477,81257	411,89485	919,48762
		2	291,78946	279,12218	527,75555
		3	392,13317	279,91592	558,96727
	#66	1	259,29891	199,10732	451,67285
		2	510,56480	390,24633	893,60787
		3	388,73079	315,36023	811,69841
13d	#54	1	209,58874	179,13361	364,27364
		2	192,33289	121,76182	347,05846
		3	243,99815	192,00047	191,80052
	#56	1	397,53338	322,65856	219,91983
		2	538,90901	408,00920	858,47654
		3	439,47042	358,66770	673,81703
	#57	1	836,34887	670,72822	1257,18601
		2	290,12975	346,10065	377,29337
		3	671,76818	493,91966	924,96046
sen	#61	1	361,43348	181,69010	532,92076
		2	184,75639	161,67060	391,89111
		3	163,58985	160,13431	368,51157
	#62	1	347,39060	311,44549	653,40858
		2	358,39158	322,92937	629,15961
		3	379,56612	281,83867	110,87420
	#60	1	259,98871	136,47494	361,41198
		2	522,23311	407,25811	919,27723
		3	240,79487	151,53144	133,66506

Tabelle A.5 Mittelwerte der sechs Banden des LMW-Massenstandards aus allen 36 *P. anserina* 2D-BN/SDS-Gelen in GU, beruhend auf den in Tabelle A.3 und A.4 aufgelisteten Werten mit zusätzlicher Angabe der zugehörigen Standardabweichung.

Markerbande	Intensität [GU]			
	vor Normierung		nach Normierung	
	Mittelwert	Standardabweichung	Mittelwert	Standardabweichung
Phosphorylase b	197,27223000	94,26655279	195,05130312	29,34245605
Albumin	302,75056944	139,35181805	302,40910667	33,71529868
Ovalbumin	466,87745583	202,53488260	473,88351364	42,67968327
Carboanhydrase	368,49135194	152,31496323	376,00958725	41,09694595
Trypsin-Inhibitor	291,77960306	124,22399879	296,26239650	41,82062563
α -Lactalbumin	591,92841778	291,90506498	605,22894590	181,27103047

Tabelle A.6 Mittels der Software QuantityOne ermittelte Intensitäten des Porin-Signals der zwölf in Tabelle 5.1.1 aufgelisteten Proben von *P. anserina*, beruhend auf dem in Abbildung 5.1.1 dargestellten Western-Blot.

Alter	Kulturnummer	Intensität Porin [GU]
6d	#52	980688
	#53	903158
	#55	1032250
9d	#64	654667
	#65	1027125
	#66	322786
13d	#54	942933
	#56	951867
	#57	747786
sen	#61	746438
	#62	971412
	#60	608600

Tabelle A.7 Mittels der Software QuantityOne ermittelte Intensitäten einer markanten, gut abgegrenzten Bande des in Abbildung 5.1.2 dargestellten Glycin-SDS-Gels mit allen zwölf in Tabelle 5.1.1 aufgelisteten Proben von *P. anserina*. Die Software gibt außerdem den prozentualen Anteil der betrachteten Bande an der Gesamtintensität der Spur an, so dass diese berechnet werden kann. Die Gesamtintensität wird für die Berechnung der in Tabelle A.1 angegebenen Normierungsfaktoren benötigt.

Alter	Kulturnummer	Intensität ausgewählte Bande [GU]	Anteil an Gesamtintensität [%]	Gesamtintensität [GU]
6d	#52	0,193	6,160	3,13311688
	#53	0,250	5,690	4,39367311
	#55	0,196	5,445	3,59963269
9d	#64	0,066	4,077	1,61883738
	#65	0,146	4,210	3,46793349
	#66	0,244	6,329	3,85526939
13d	#54	0,245	6,229	3,93321560
	#56	0,172	5,755	2,98870547
	#57	0,098	5,846	1,67635990
sen	#61	0,071	2,645	3,46800143
	#62	0,048	2,364	2,68431002
	#60	0,097	2,797	2,03045685

Gelbilder

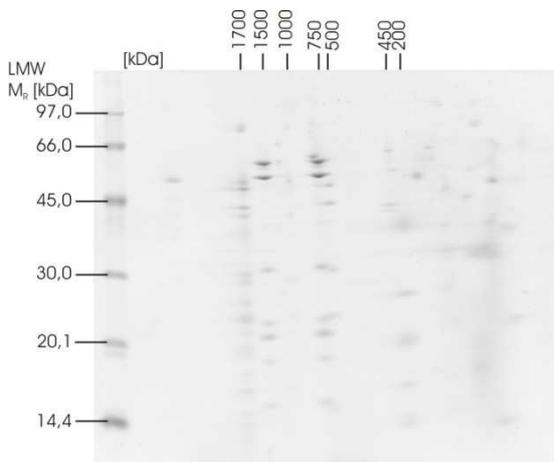


Abbildung A.1 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

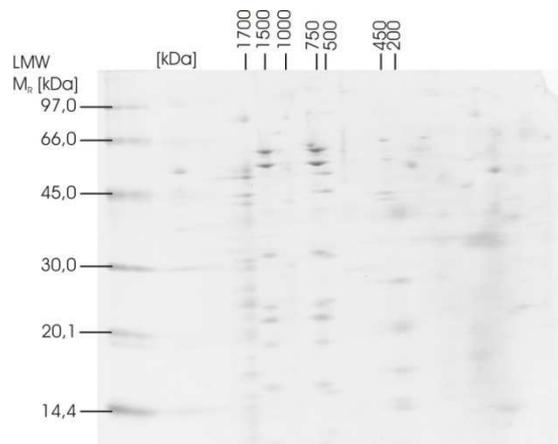


Abbildung A.2 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

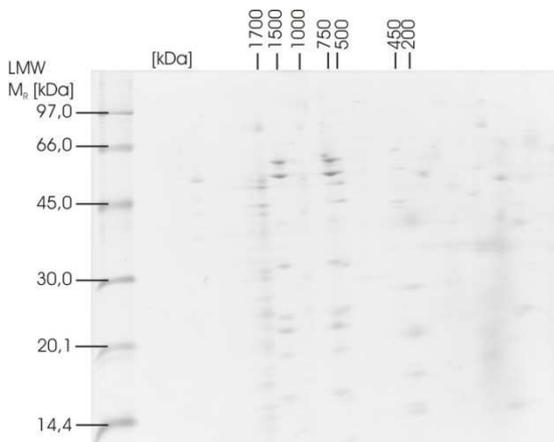


Abbildung A.3 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #52) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

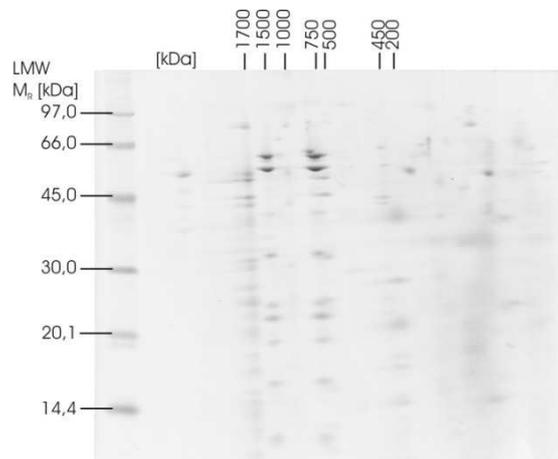


Abbildung A.4 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #53) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

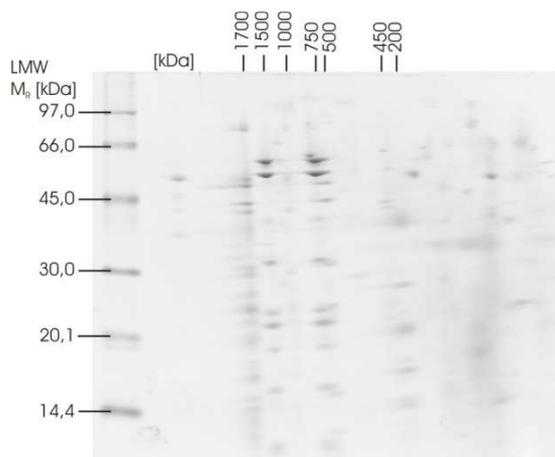


Abbildung A.5 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #53) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

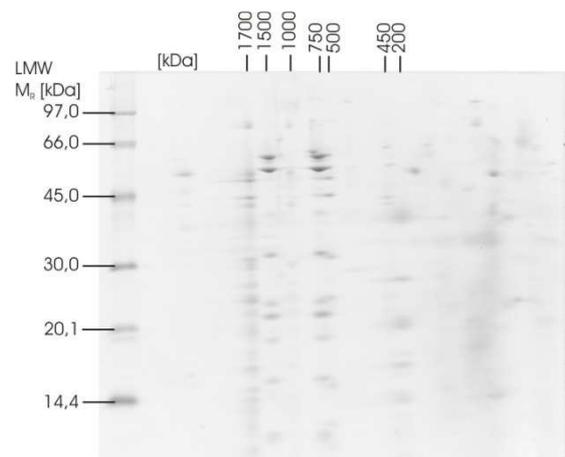


Abbildung A.6 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #53) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

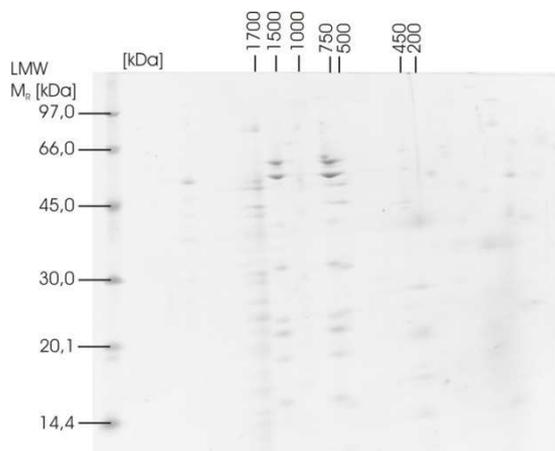


Abbildung A.7 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #55) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

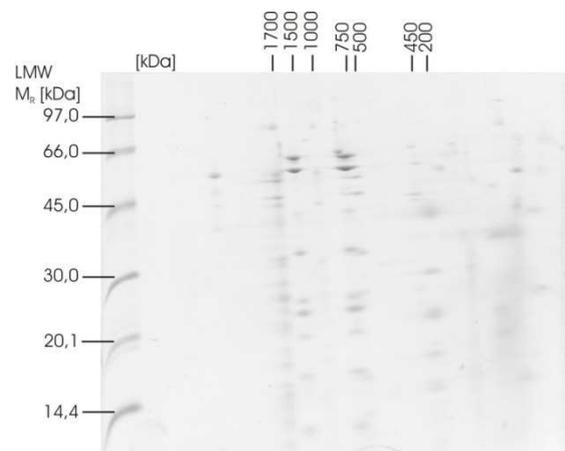


Abbildung A.8 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #55) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

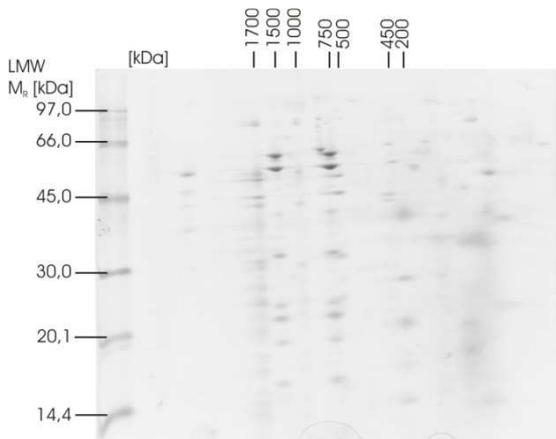


Abbildung A.9 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 6 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #55) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

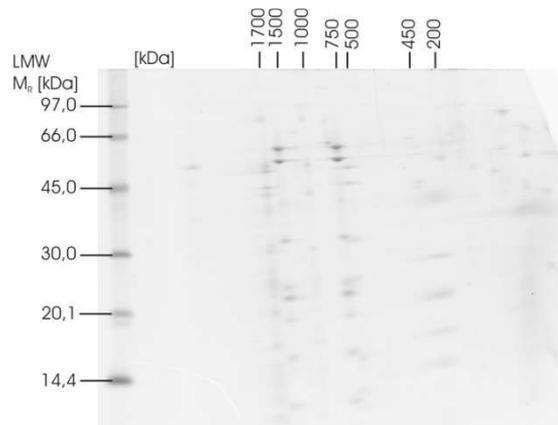


Abbildung A.10 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #64) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

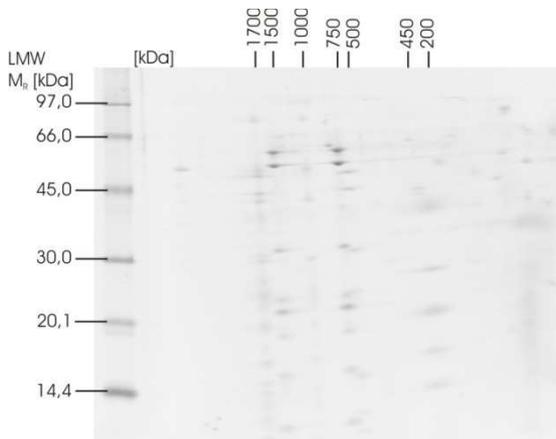


Abbildung A.11 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #64) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

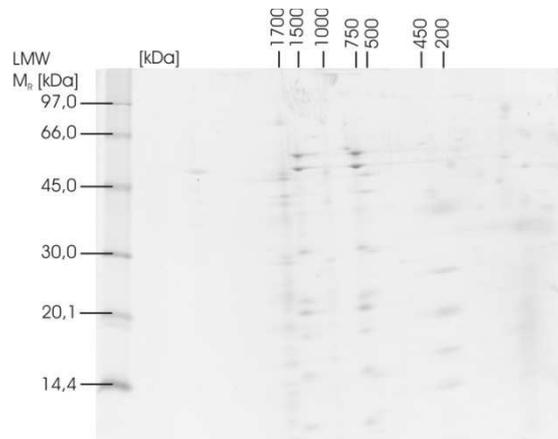


Abbildung A.12 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #64) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

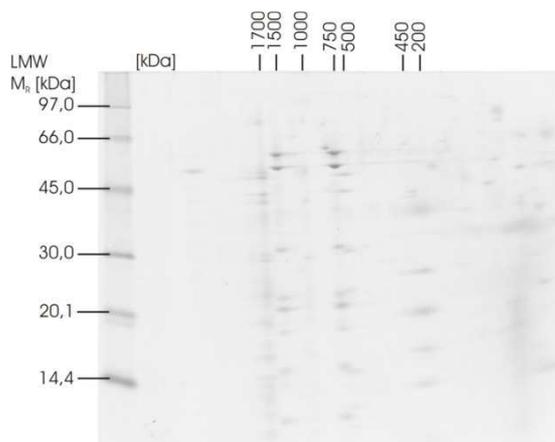


Abbildung A.13 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #65) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

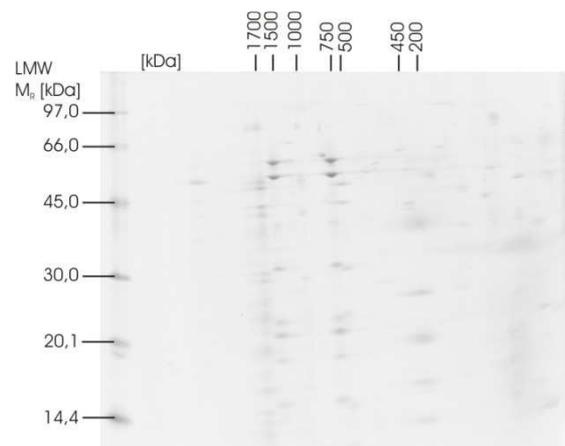


Abbildung A.14 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #65) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

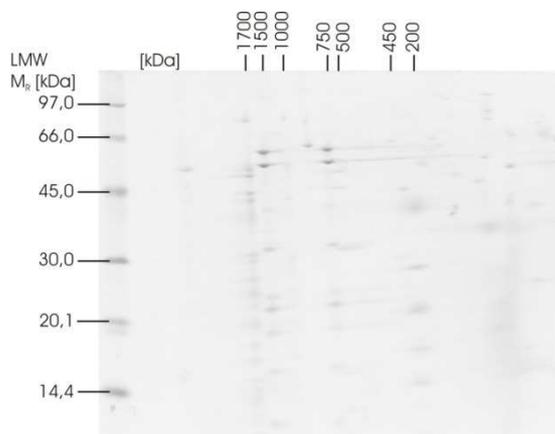


Abbildung A.15 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #65) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

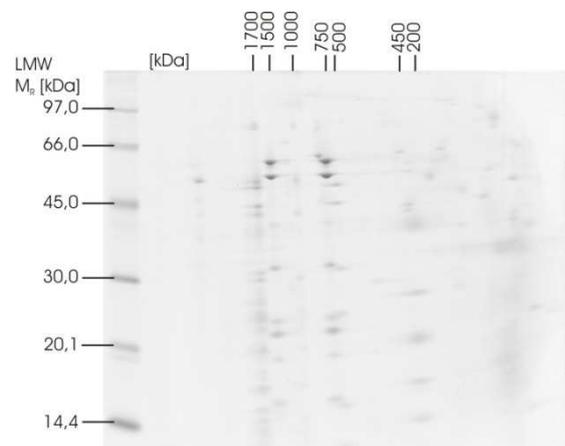


Abbildung A.16 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #66) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

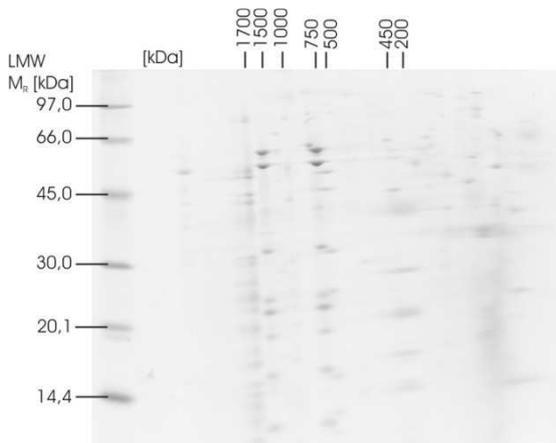


Abbildung A.17 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #66) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

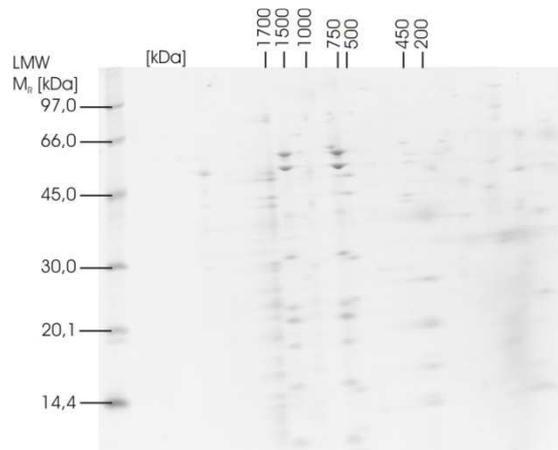


Abbildung A.18 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 9 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #66) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

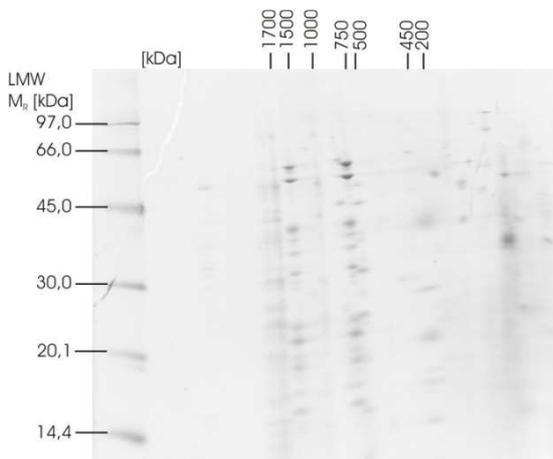


Abbildung A.19 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #54) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

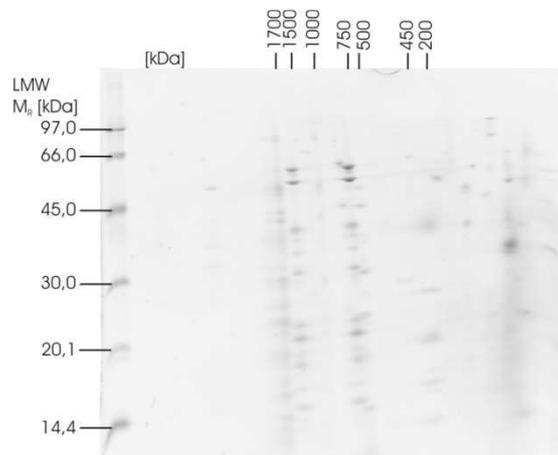


Abbildung A.20 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #54) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

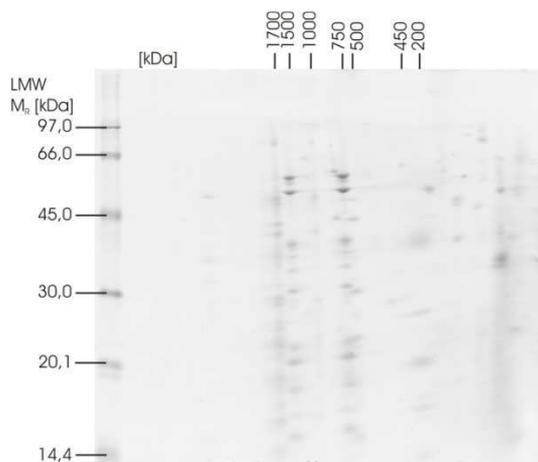


Abbildung A.21 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #54) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

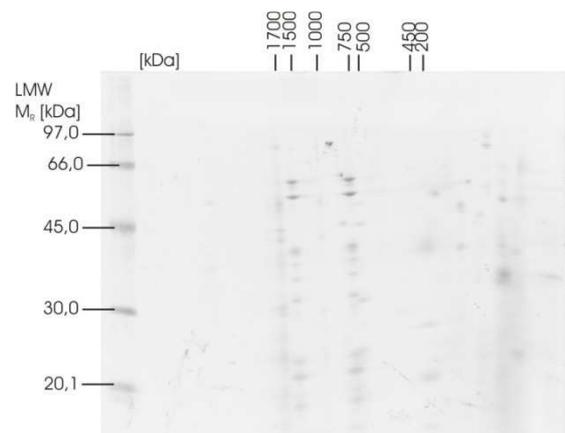


Abbildung A.22 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #56) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

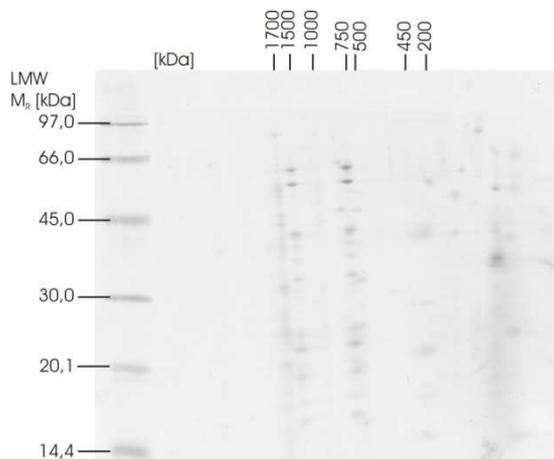


Abbildung A.23 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #56) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

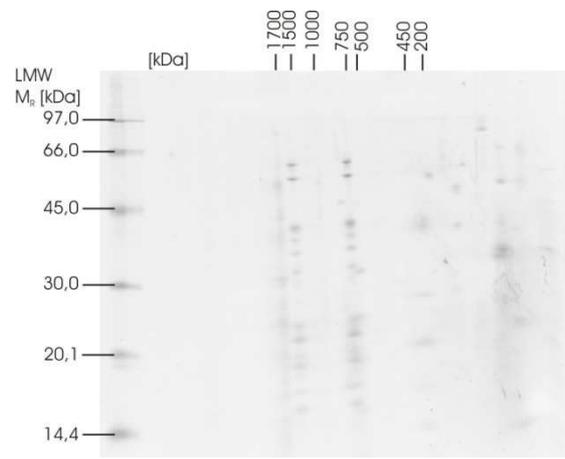


Abbildung A.24 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #56) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

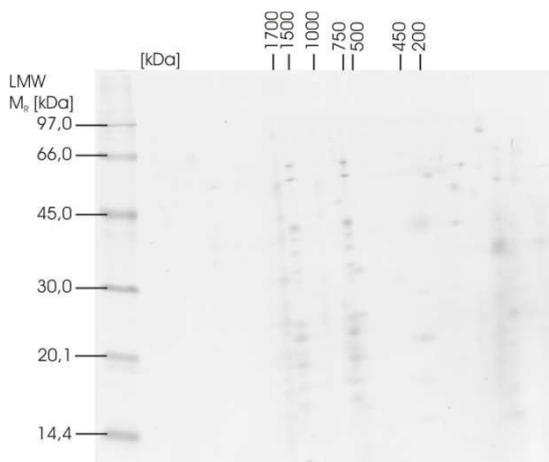


Abbildung A.25 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #57) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

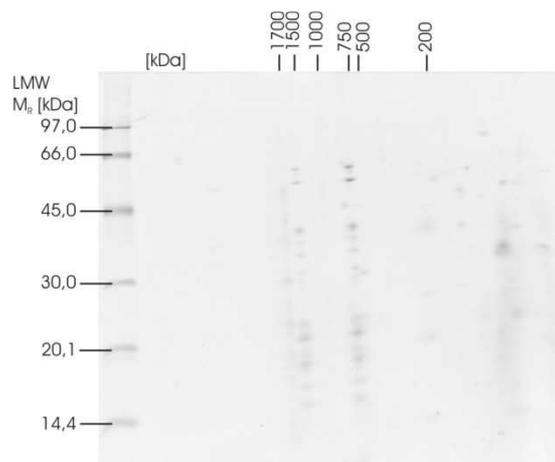


Abbildung A.26 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #57) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

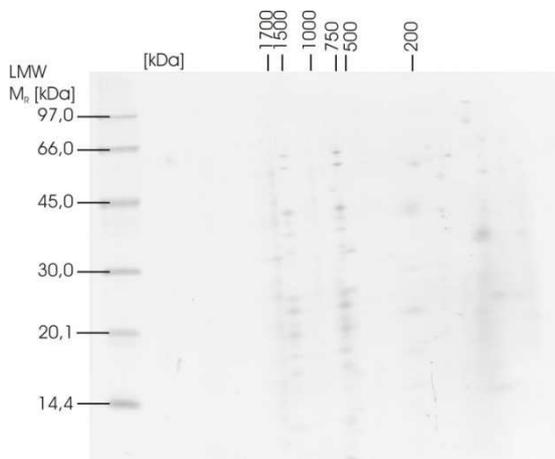


Abbildung A.27 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des 13 Tage alten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #57) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

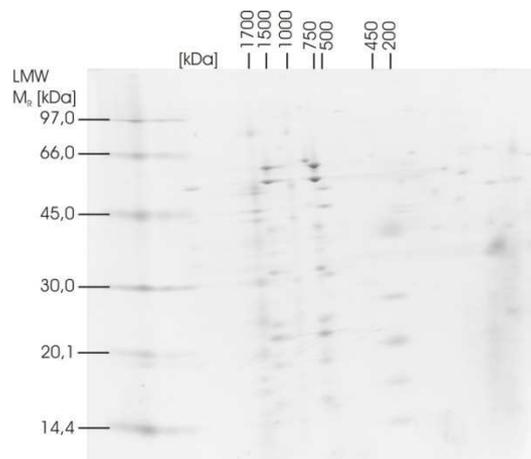


Abbildung A.28 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #61) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

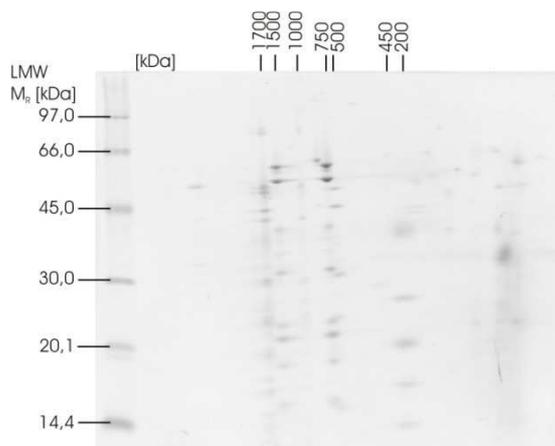


Abbildung A.29 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #61) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

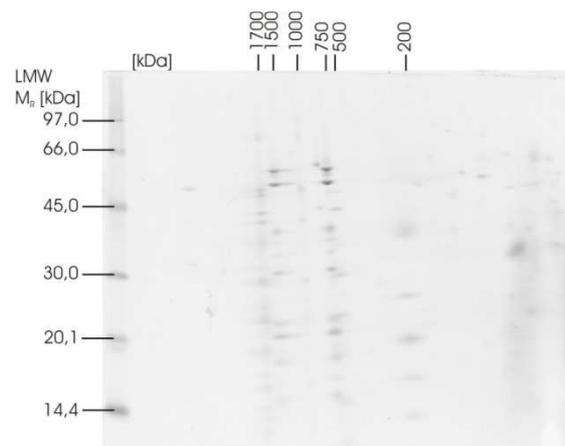


Abbildung A.30 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89830 (Kulturnummer #61) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

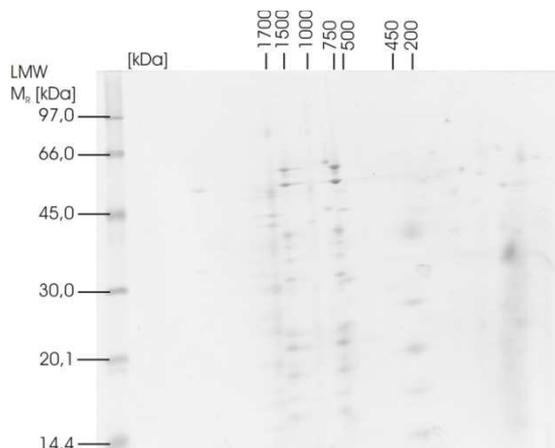


Abbildung A.31 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #62) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

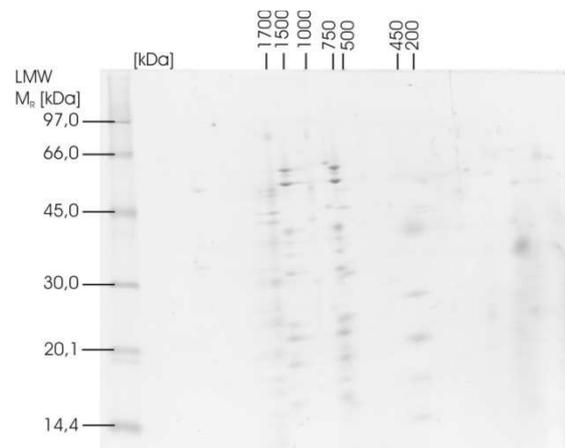


Abbildung A.32 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospora anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #62) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

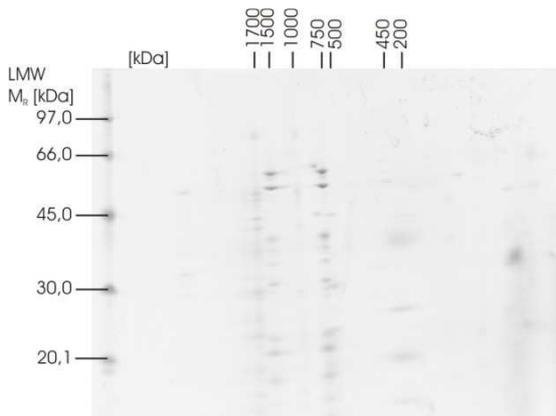


Abbildung A.33 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89840 (Kulturnummer #62) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

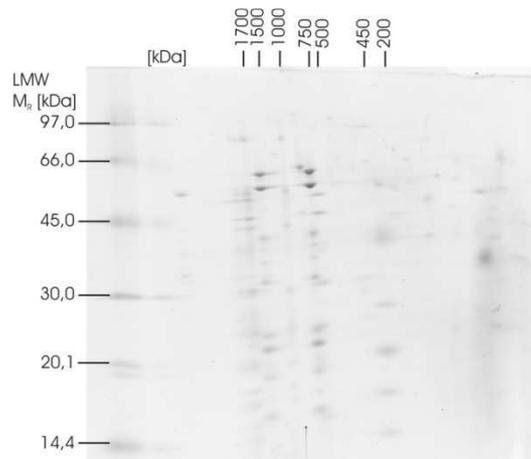


Abbildung A.34 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #60) – Replik 1 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

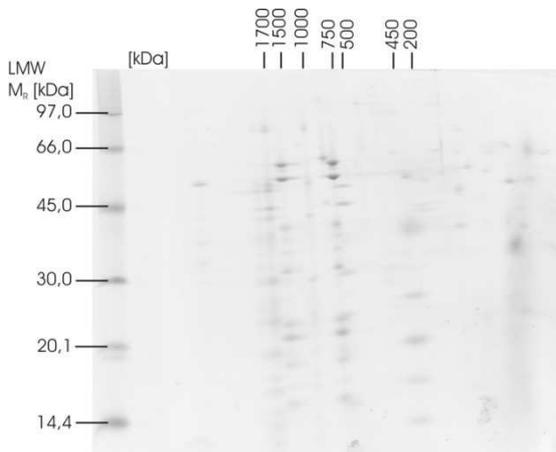


Abbildung A.35 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #60) – Replik 2 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

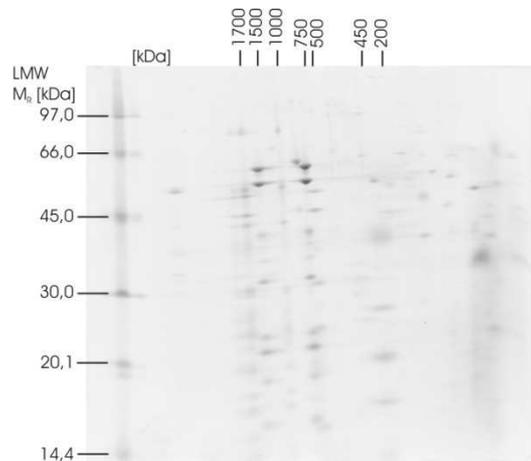


Abbildung A.36 SYPRO® Ruby-gefärbtes 2D-BN/SDS-Gel des seneszenten *Podospira anserina* Individuums s(-)F89851 (Kulturnummer #60) – Replik 3 von 3. Aufgetragen sind 125 µg Protein (Berechnung anhand der „alten“ Proteinkonzentration aus Tabelle 5.1.1) vor Solubilisierung (Digitonin, 8:1 (w/w)).

A.1.1 ATP-Synthase (Komplex V)

Rohdaten

Tabelle A.8 Intensitäten für α - und β -Untereinheit (UE) des ATP-Synthase Monomers und Dimers auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

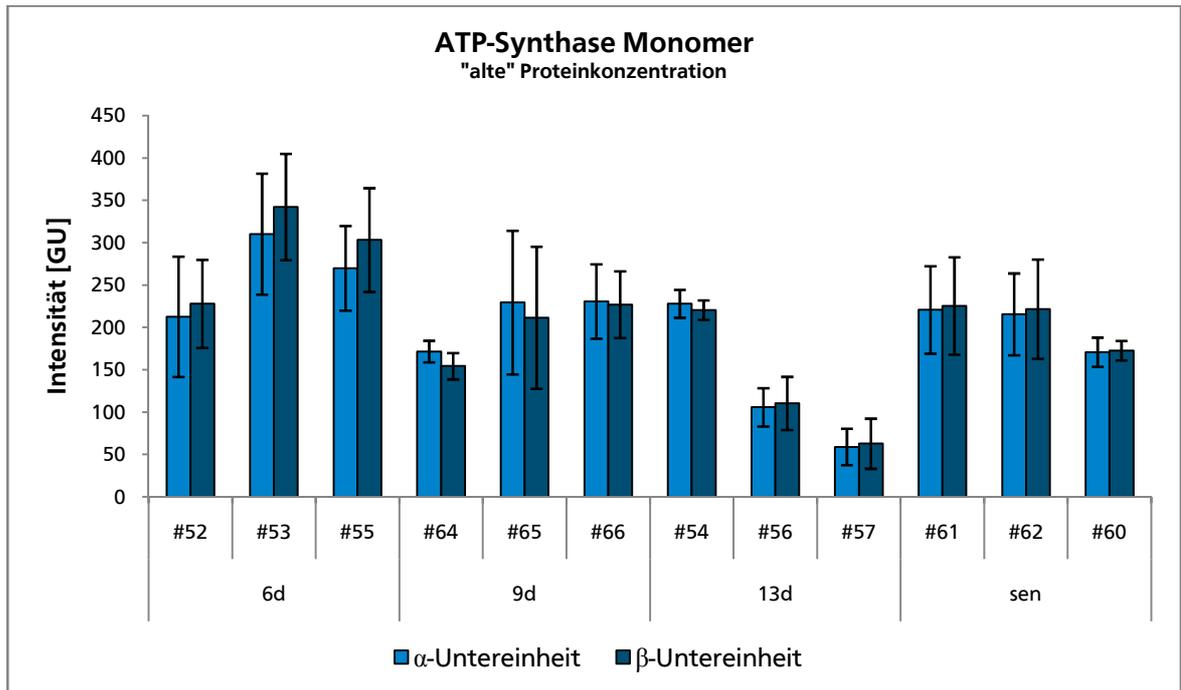
Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]			
			Monomer		Dimer	
			α -UE	β -UE	α -UE	β -UE
6d	#52	1	162,67851	161,62133	132,76594	130,85080
		2	152,42986	160,30149	122,53121	122,16237
		3	220,20134	278,75909	181,17545	204,41791
	#53	1	232,75471	246,16216	172,19310	167,93393
		2	223,27890	240,22734	189,68927	177,70106
		3	160,10695	192,41917	131,54522	145,24492
	#55	1	294,03703	341,54073	203,13288	225,43635
		2	155,98267	176,32523	116,47584	124,38755
		3	189,00040	203,30674	145,91148	150,04977
9d	#64	1	221,91670	215,87651	171,87671	175,64495
		2	242,69746	203,72364	176,26036	159,05573
		3	235,39719	208,92322	193,23790	161,26412
	#65	1	239,07073	200,61588	151,68682	143,02414
		2	211,61671	201,46410	169,08867	159,64492
		3	144,46169	139,95299	155,69050	152,48571
	#66	1	145,44460	137,49113	110,10857	101,84427
		2	246,12821	252,53497	203,73434	189,83778
		3	266,88354	263,80169	199,88771	186,47802
13d	#54	1	152,17932	134,74296	78,23615	87,88516
		2	119,68067	124,29718	77,34043	82,66978
		3	137,18421	135,18621	90,56713	101,80505
	#56	1	149,33765	164,56956	103,24976	119,71441
		2	161,33219	169,38421	102,21305	103,38833
		3	111,14408	105,14855	77,68963	90,69741
	#57	1	104,32078	97,99734	63,95825	73,45994
		2	98,51804	113,85428	27,99217	39,64445
		3	84,49992	86,64582	43,21181	36,23886
sen	#61	1	141,91583	133,39083	85,26221	107,37226
		2	143,49087	140,83659	101,45388	114,26984
		3	93,07530	106,78267	79,30445	94,94371
	#62	1	196,75937	181,40954	124,59965	145,17508
		2	166,53642	188,42628	161,01114	193,29853
		3	171,51594	170,76437	154,60571	178,23867
	#60	1	135,48858	148,77017	119,30632	127,38996
		2	256,13671	245,94928	203,05684	208,90341
		3	164,13349	163,24485	158,15673	148,26603

Tabelle A.9 Intensitäten für α - und β -Untereinheit (UE) des ATP-Synthase F_1 -Teils auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplik	Intensität [GU]	
			α -UE	β -UE
6d	#52	1	16,68043	14,33185
		2	18,84247	13,10443
		3	21,53696	17,06052
	#53	1	17,63259	13,17702
		2	15,74701	12,75207
		3	12,00166	11,85263
	#55	1	14,12454	16,40290
		2	10,56954	13,82367
		3	13,88331	18,36742
9d	#64	1	18,08109	10,01411
		2	23,31987	12,87842
		3	17,33257	13,02968
	#65	1	17,92383	16,02052
		2	18,49049	18,94818
		3	15,73767	21,44634
	#66	1	14,64332	7,38343
		2	28,99411	20,28470
		3	20,30468	18,52457
13d	#54	1	10,37235	7,62658
		2	8,68341	4,99864
		3	7,89438	4,92329
	#56	1	6,33845	6,30042
		2	5,93068	4,67517
		3	1,97002	2,91276
	#57	1	6,87285	8,34932
		2	2,14702	4,28920
		3	0,00000	0,00000
sen	#61	1	3,18920	5,45458
		2	3,36915	7,30613
		3	1,19086	3,88353
	#62	1	3,54307	9,24338
		2	4,03412	14,17797
		3	5,26758	17,90742
	#60	1	3,86290	7,64765
		2	12,06754	17,26069
		3	10,48875	8,12633

Zusätzliche Daten

A



B

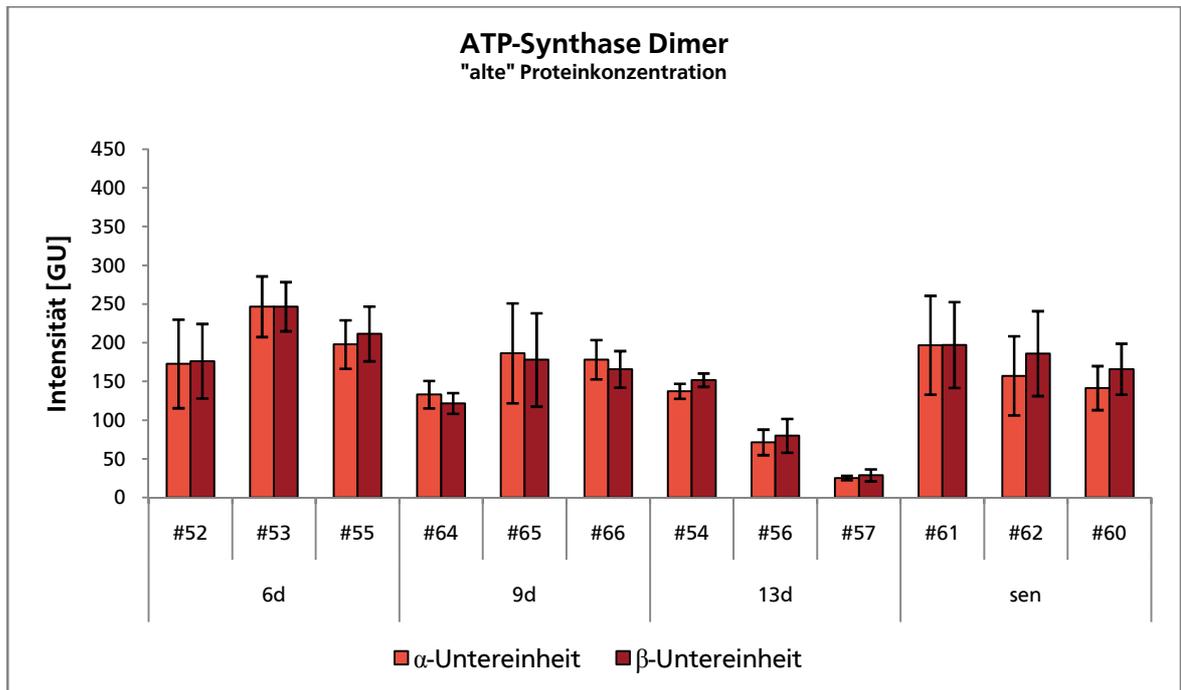
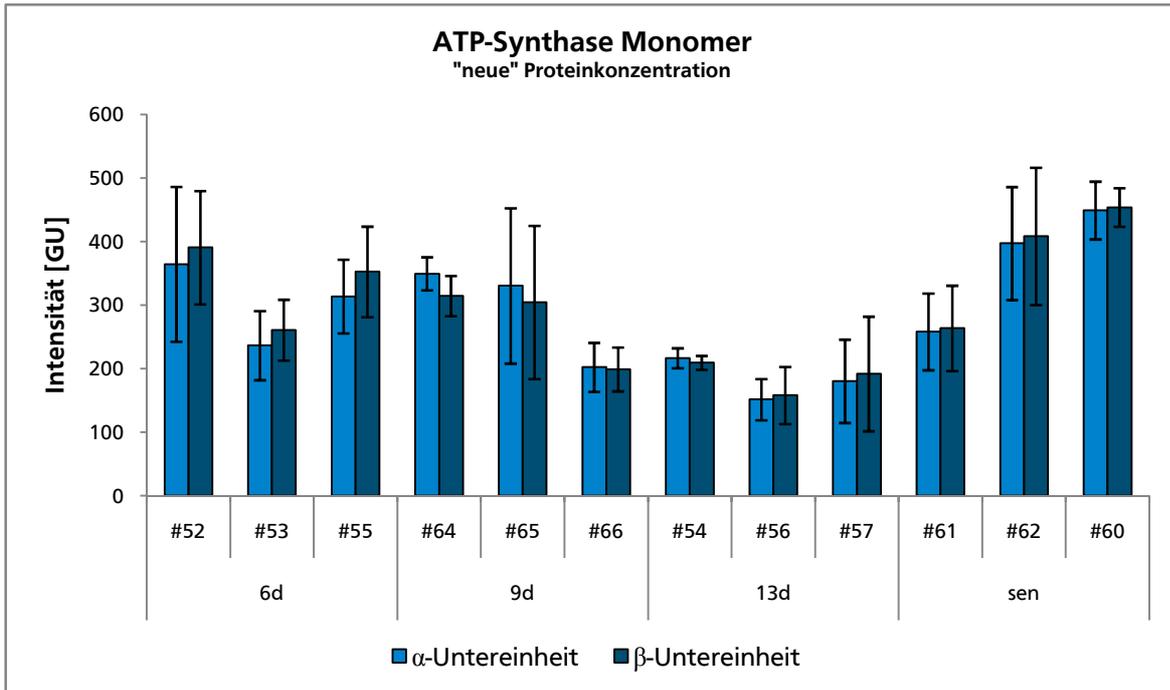


Abbildung A.37 Altersabhängigkeit der Intensitäten der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (A) und Dimers (B), basierend auf der „alten“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Unterschiede zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.7) finden sich vor allem bei den 9 Tage alten Proben und hier bei den Individuen mit den Kulturnummern #64 und #66.

A



B

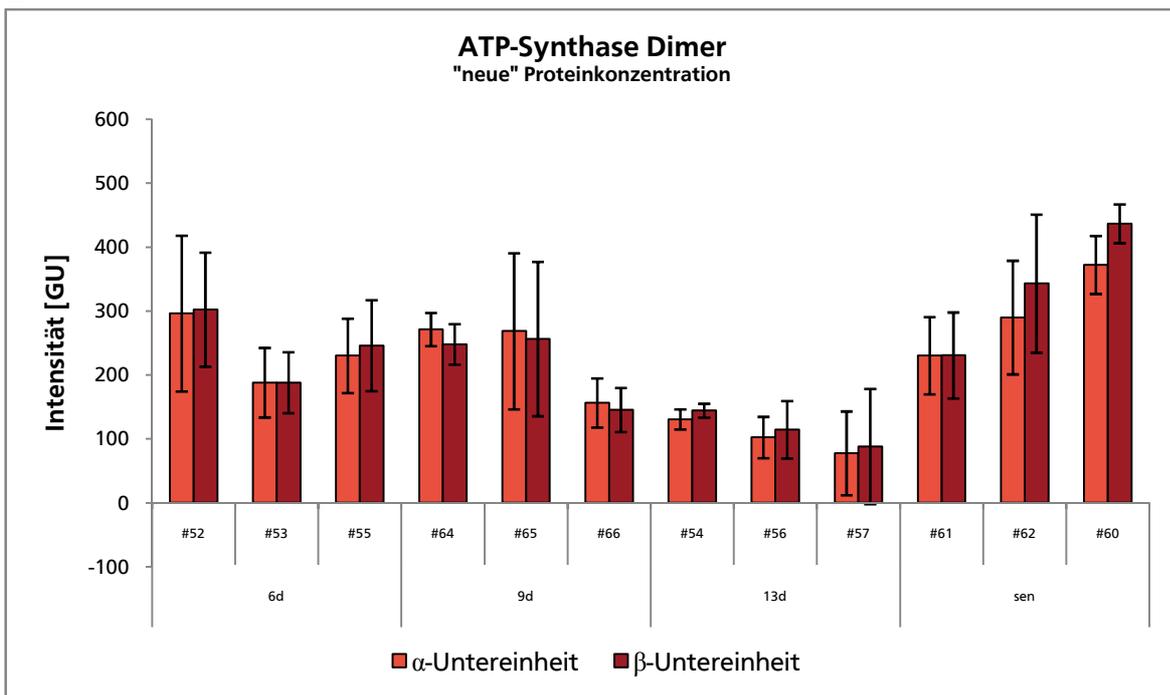
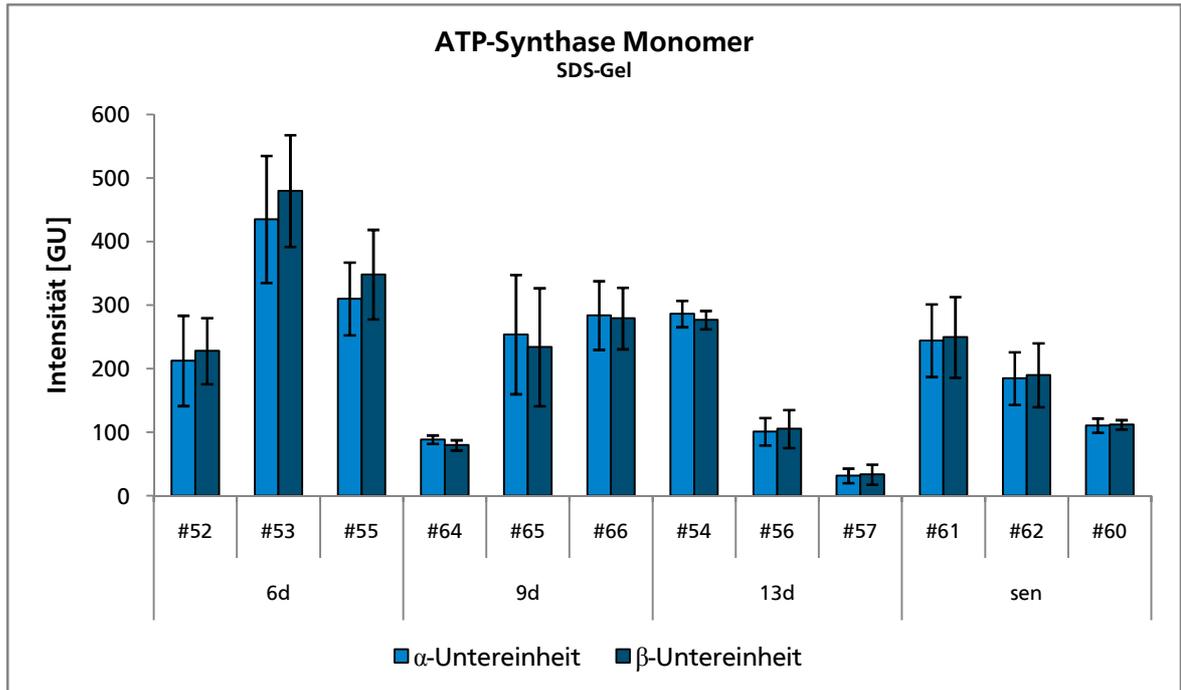


Abbildung A.38 Altersabhängigkeit der Intensitäten der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (A) und Dimers (B), basierend auf der „neuen“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospira anserina* Individuums an. Sowohl im Vergleich mit den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.7) als auch im Vergleich mit den auf die „alte“ Proteinkonzentration (Abbildung A.37) und den auf die Gesamtfärbeintensität im Glycin-SDS-Gel (Abbildung A.39) normierten Daten finden sich große Unterschiede bei allen Altersstufen.

A



B

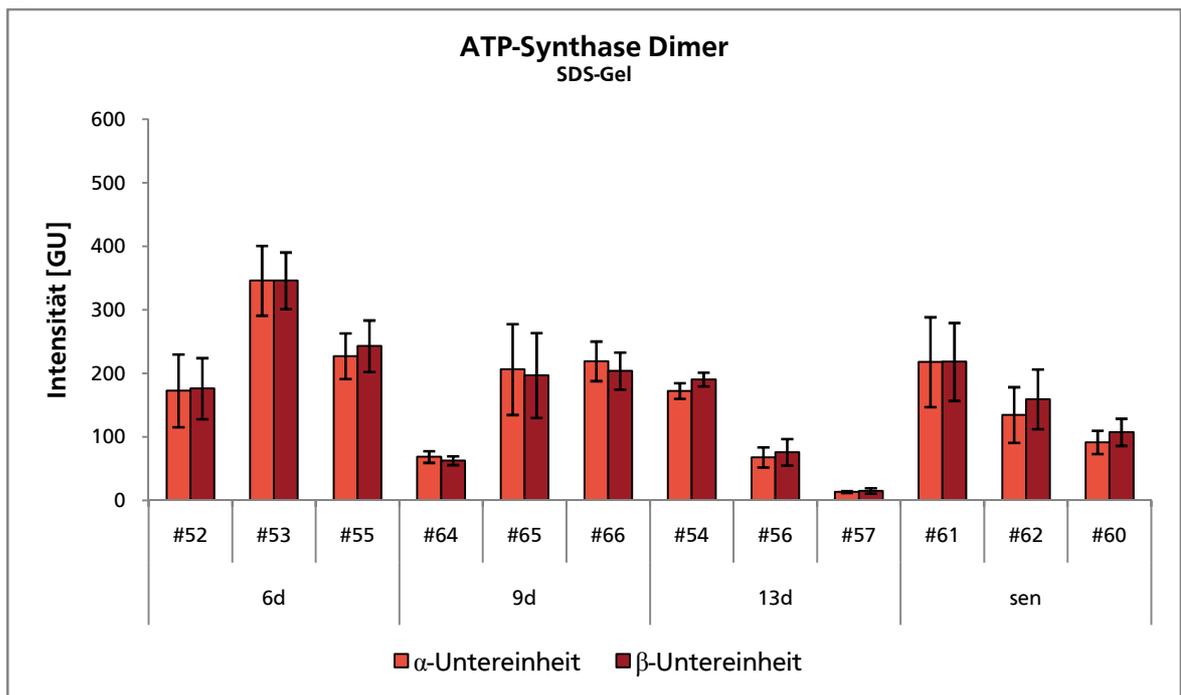


Abbildung A.39 Altersabhängigkeit der Intensitäten der α - und β -Untereinheit des ATP-Synthase Monomers (A) und Dimers (B), normiert auf die Gesamtfärbereintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospira anserina* Individuums an. Sowohl im Vergleich mit den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.7) als auch im Vergleich mit den auf die „alte“ oder „neue“ Proteinkonzentration normierten Daten (Abbildung A.37 und A .38) finden sich große Unterschiede bei allen Altersstufen.

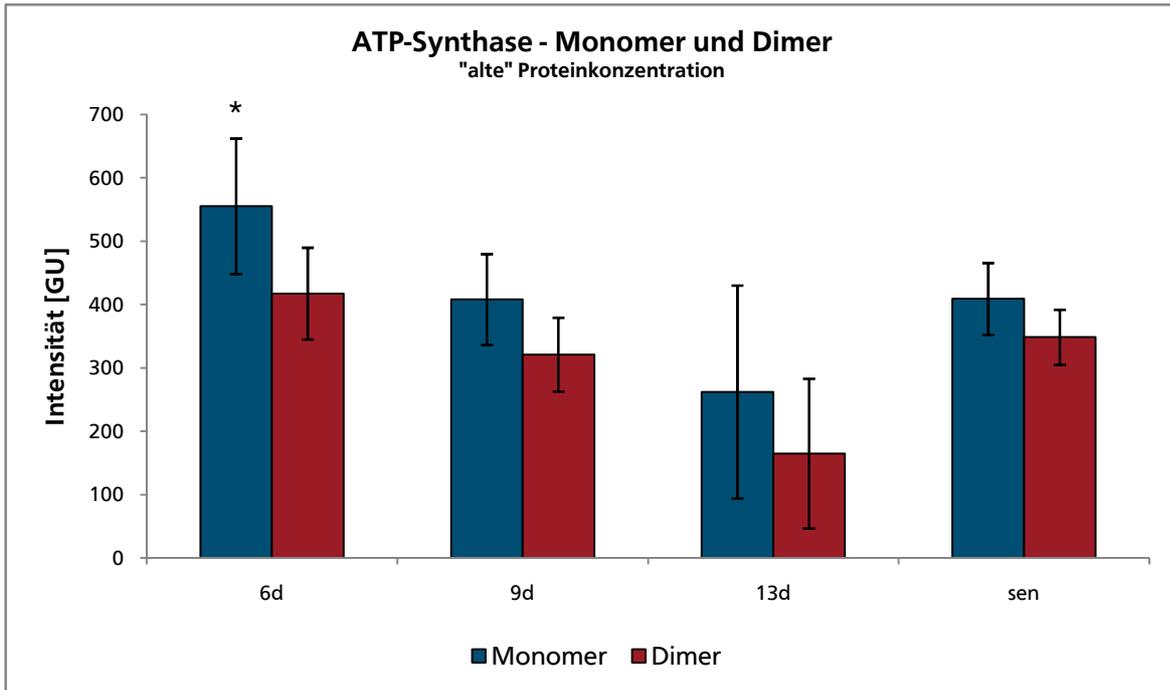
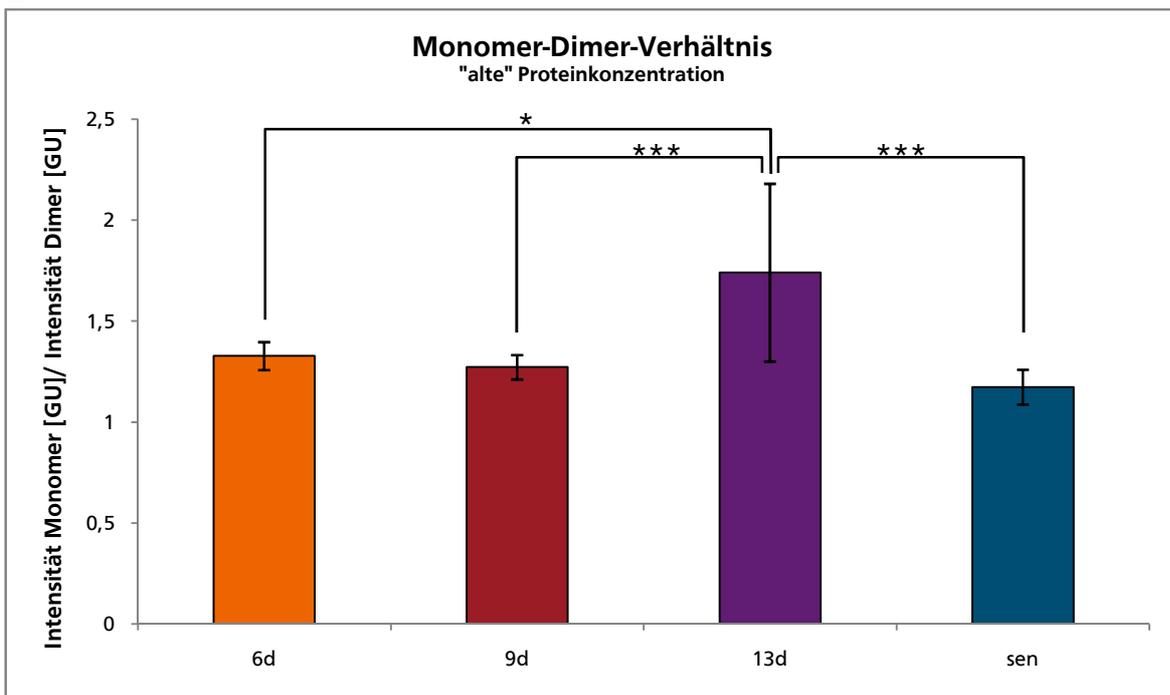
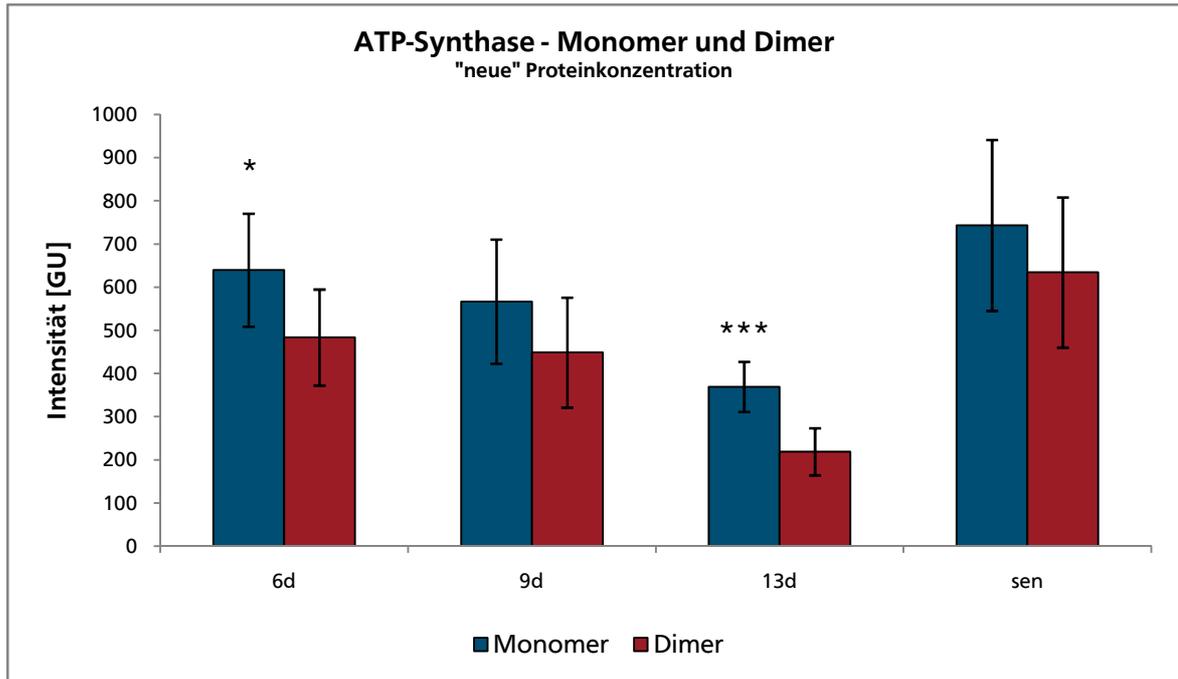
A**B**

Abbildung A.40 Altersabhängiger Vergleich von Monomer und Dimer der ATP-Synthase (A) und altersabhängige Veränderung des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe wurden gemittelt, die Intensitäten für α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase wurden addiert. Wie bei den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.8) ist lediglich bei den 6 Tage alten Proben ein statistisch signifikanter (*, $p = 0,0118$) Intensitätsunterschied zwischen Monomer und Dimer vorhanden. (B) Das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase bleibt von der Art der Normierung unbeeinflusst. Im Mittel ist das Monomer-Dimer-Verhältnis bei den 13 Tage alten Kulturen um 38% höher als bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Proben (vgl. Abbildung 5.1.8). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

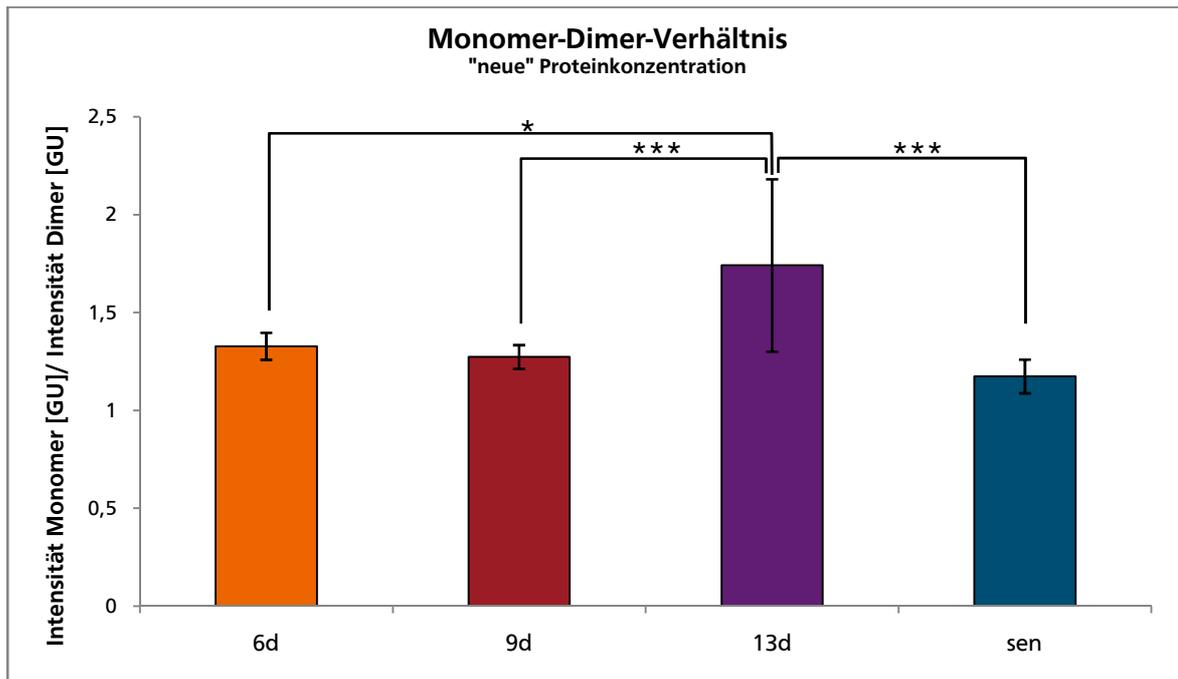


Abbildung A.41 Altersabhängiger Vergleich von Monomer und Dimer der ATP-Synthase (A) und altersabhängige Veränderung des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe wurden gemittelt, die Intensitäten für α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase wurden addiert. Im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (vgl. Abbildung 5.1.8) sowie den auf die „alte“ Proteinkonzentration normierten Daten (vgl. Abbildung A.40) ist sowohl bei den 6 Tage alten (*, $p = 0,0379$) als auch bei den 13 Tage (***, $p = 0,0031$) alten Proben ein statistisch signifikanter Intensitätsunterschied zwischen Monomer und Dimer vorhanden. (B) Das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase bleibt von der Art der Normierung unbeeinflusst. Im Mittel ist das Monomer-Dimer-Verhältnis bei den 13 Tage alten Kulturen um 38% höher als bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Proben (vgl. Abbildung 5.1.8). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

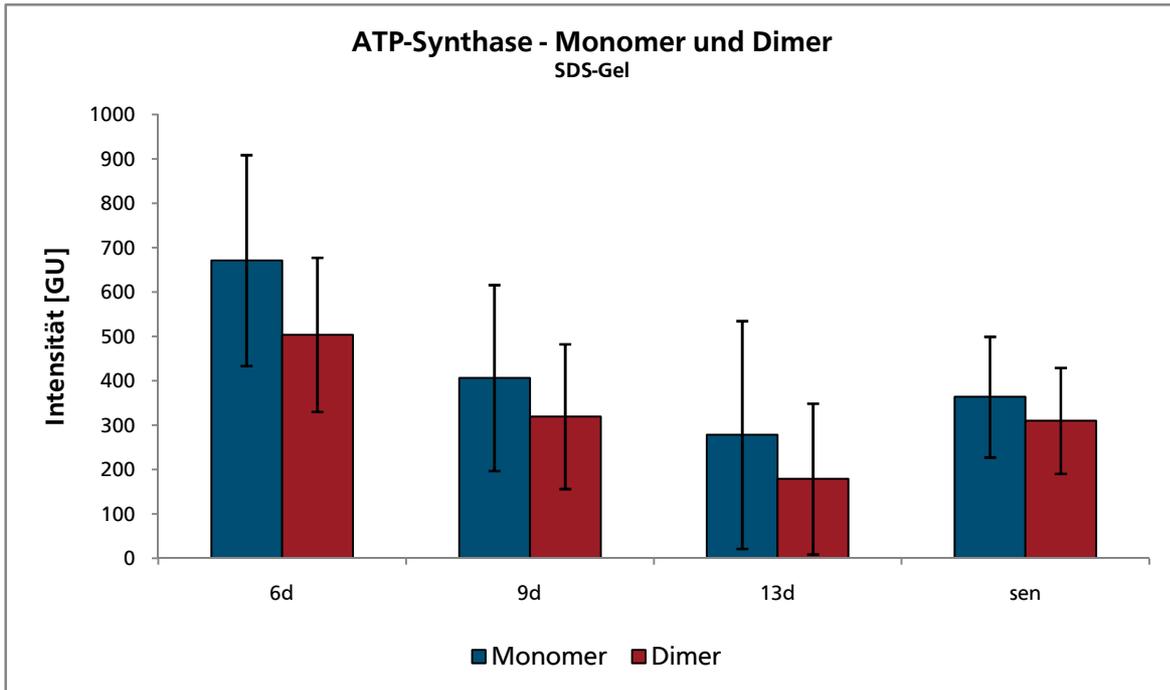
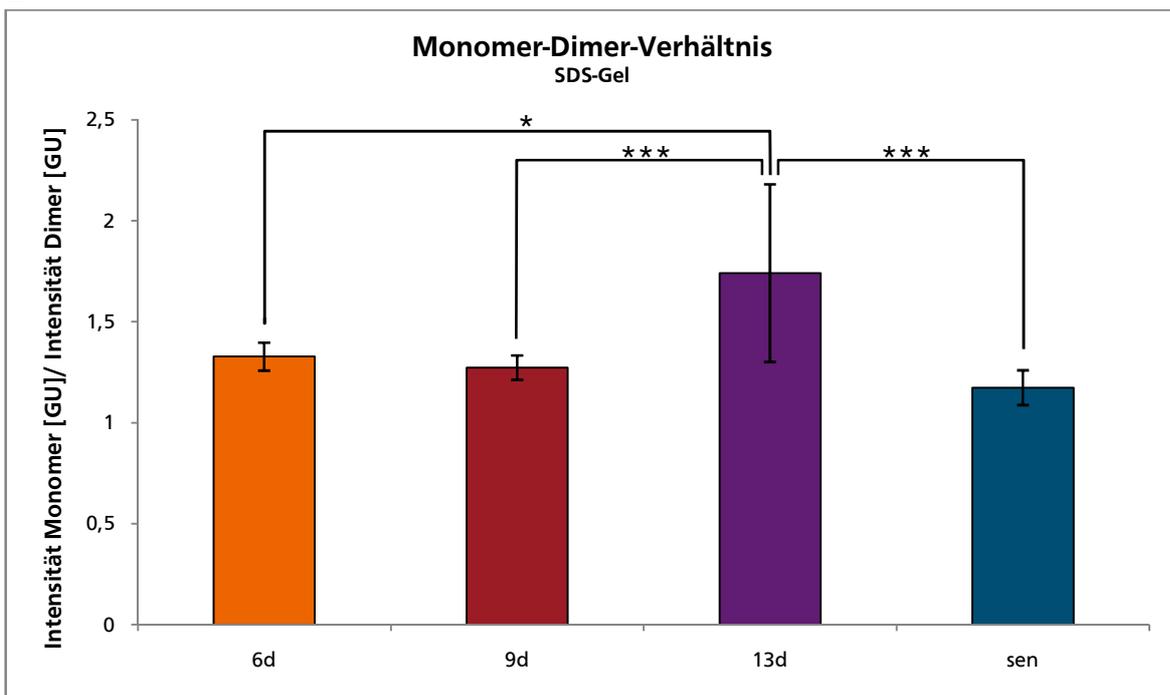
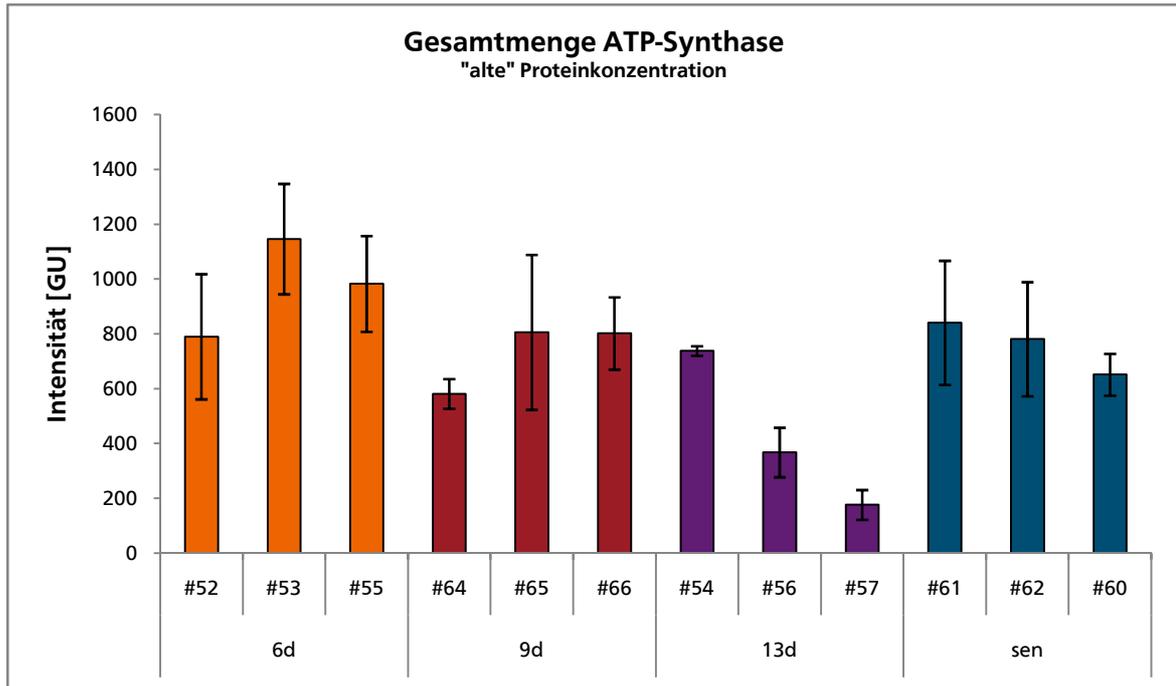
A**B**

Abbildung A.42 Altersabhängiger Vergleich von Monomer und Dimer der ATP-Synthase (A) und altersabhängige Veränderung des Monomer-Dimer-Verhältnisses der ATP-Synthase (B), normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe wurden gemittelt, die Intensitäten für α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase wurden addiert. Im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (vgl. Abbildung 5.1.8) sowie die „alte“ und „neue“ Proteinkonzentration normierten Daten (vgl. Abbildung A.40 und A.41) ist bei keiner der vier Altersstufen ein statistisch signifikanter Intensitätsunterschied zwischen Monomer und Dimer vorhanden. (B) Das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase bleibt von der Art der Normierung unbeeinflusst. Im Mittel ist das Monomer-Dimer-Verhältnis bei den 13 Tage alten Kulturen um 38% höher als bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Proben (vgl. Abbildung 5.1.8). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

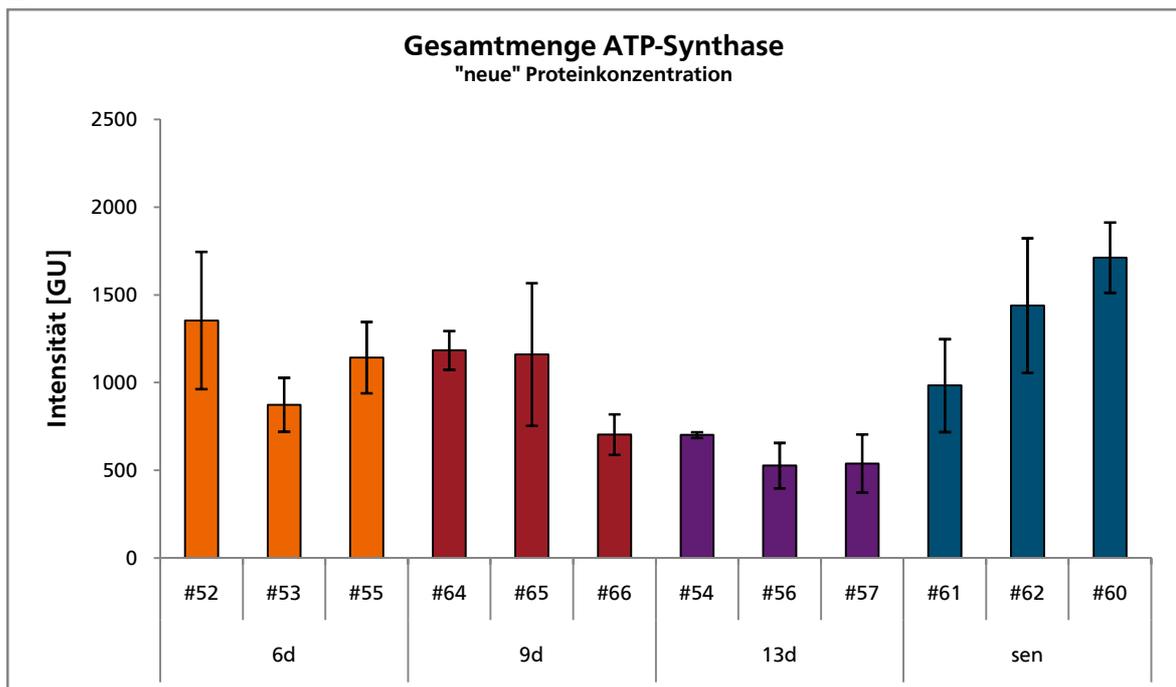


Abbildung A.43 Altersabhängigkeit der ATP-Synthase Gesamtmenge. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten von Monomer und Dimer in GU. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospira anserina* Individuums an. (A) Normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.9) zeigt hier nur die Altersstufe 13d große Unterschiede zwischen den drei Individuen. Bei den 9 Tage alten Kulturen ist der Unterschied wesentlich geringer. (B) Normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.9) zeigen die Altersstufen 6d, 9d und 13d hier nur geringe Intensitätsunterschiede zwischen den drei Individuen, während die Variation bei den seneszenten Proben zugenommen hat. Auffällig ist, dass hier die Intensitäten der seneszenten Proben von Kulturnummer #61 zu #60 ansteigen, während dies bei den anderen Normierungsmethoden genau umgekehrt ist.

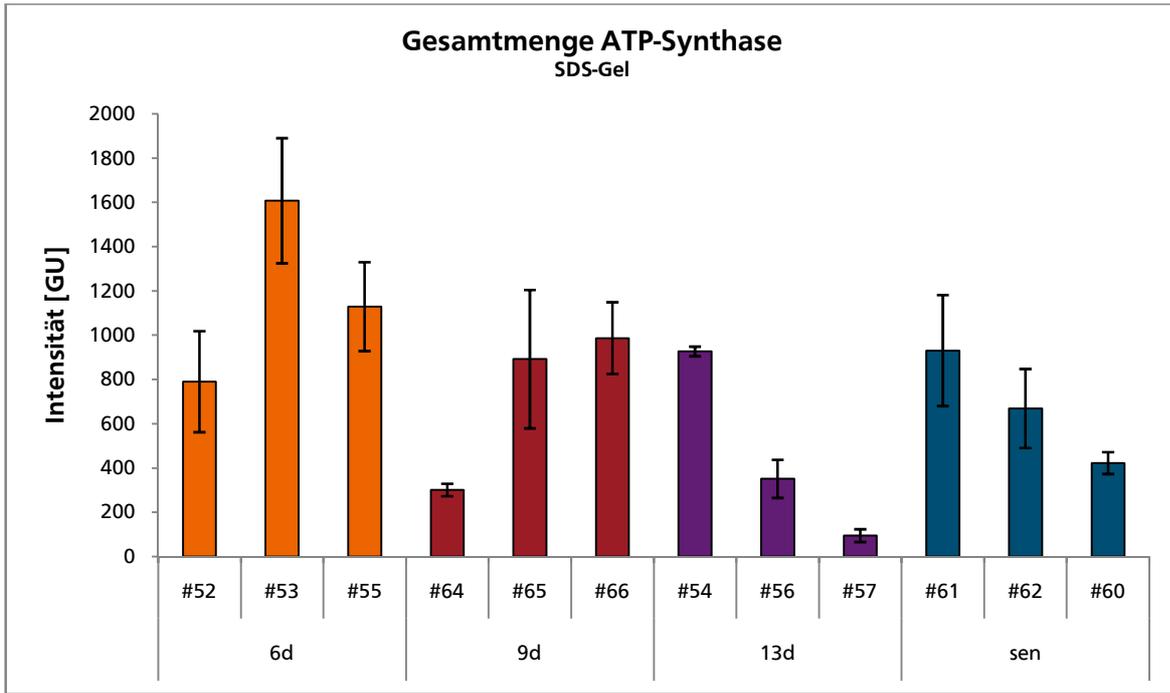


Abbildung A.44 Altersabhängigkeit der ATP-Synthase Gesamtmenge. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten von Monomer und Dimer in GU, normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Hier zeigen alle vier Altersgruppen mehr oder weniger große Intensitätsunterschiede zwischen den drei Individuen wobei diese für 9d und 13d am größten sind.

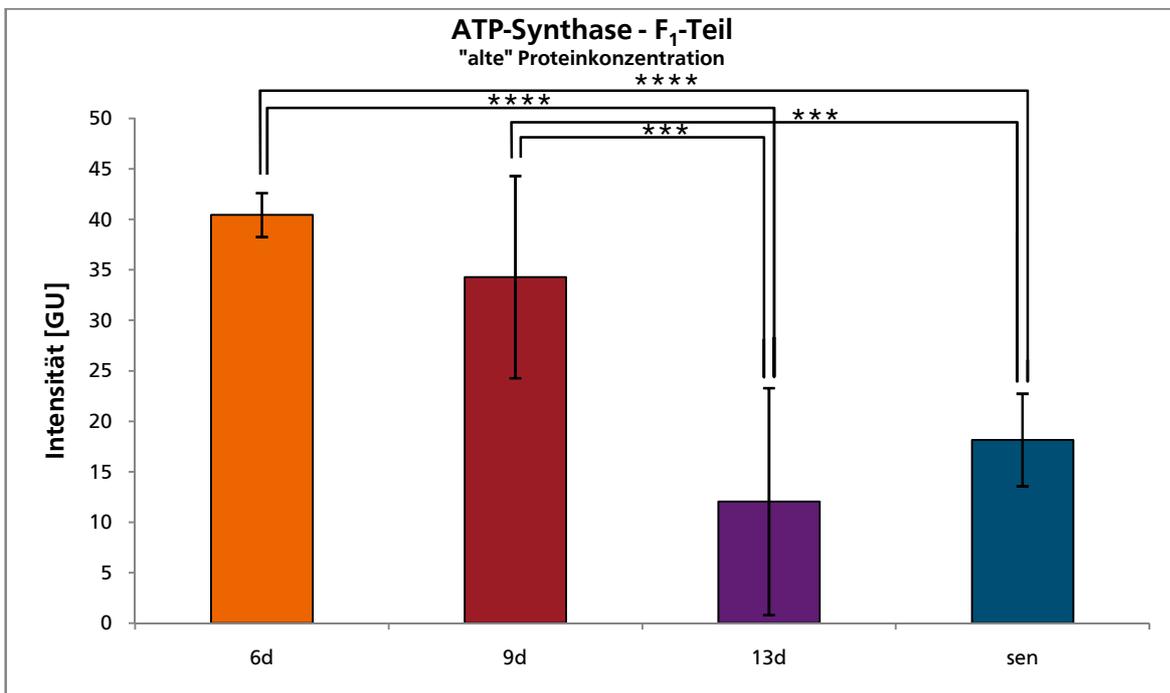


Abbildung A.45 Summe der Intensitäten der α - und β -Untereinheit für den freien F₁-Kopfteil der ATP-Synthase in GU, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.10) ist nicht bereits von den 6 zu den 9 Tage alten sondern erst von den 9 zu den 13 Tage alten Proben eine signifikante Abnahme um 70% ($p = 0,0007$) zu verzeichnen. Ebenfalls signifikant sind die 65%-ige Abnahme von 9d nach 13d ($p = 0,0023$), die 55%-ige Abnahme von 6d nach sen ($p = 0,0007$) sowie die 47%-ige Abnahme von 9d nach sen ($p = 0,0031$). Insgesamt beträgt der Anteil des F₁-Teils an der ATP-Synthase Gesamtmenge nur zwischen 2,3% (sen) und 4,5% (9d). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

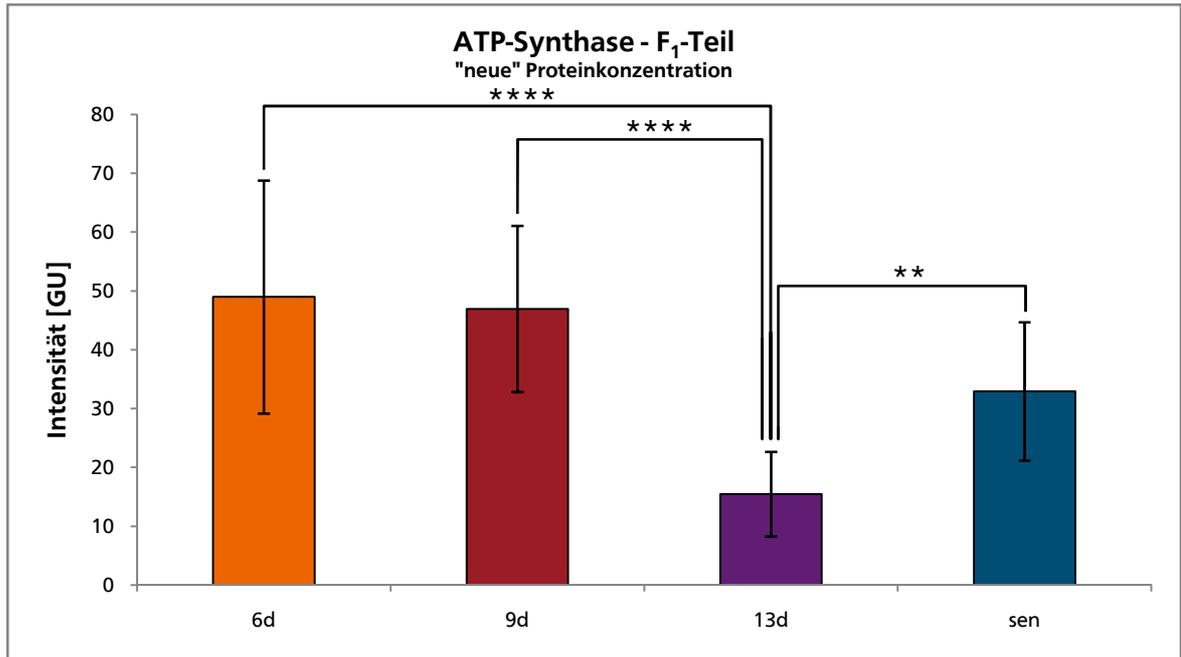
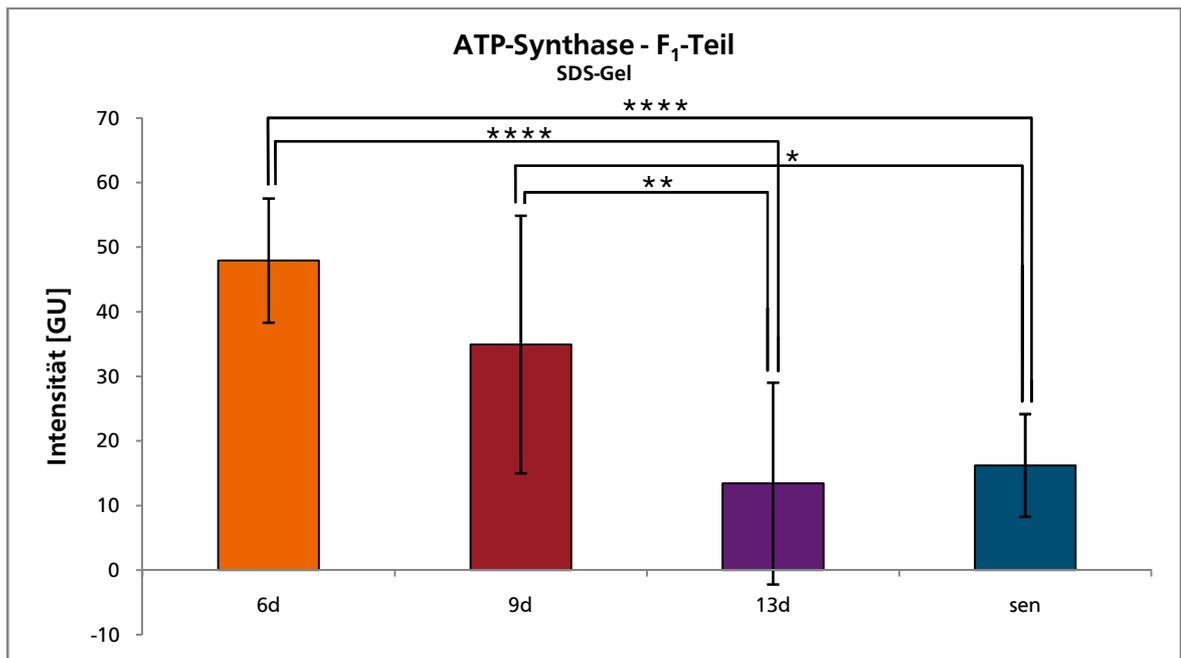
A**B**

Abbildung A.46 Altersabhängiges Auftreten von freier F₁-Kopfgruppe der ATP-Synthase. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten der α - und β -Untereinheit in GU. **(A)** Normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Wie auch bei den auf die „alte“ Proteinkonzentration normierten Daten (vgl. Abbildung A.45) ist, im Gegensatz zu den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.10) nicht bereits von den 6 zu den 9 Tage alten sondern erst von den 9 zu den 13 Tage alten Proben eine signifikante Abnahme um 68% ($p = 0,0005$) zu verzeichnen. Ebenfalls signifikant sind die 67%-ige Abnahme von 9d nach 13d ($p = 0,0003$) sowie die 113%-ige Zunahme von 13d nach sen ($p = 0,0071$). Insgesamt beträgt der Anteil des F₁-Teils an der ATP-Synthase Gesamtmenge nur zwischen 2,3% (sen) und 4,4% (9d). **(B)** Normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Tabelle A.1). Auch hier ist erst von 6d nach 13d eine statistisch signifikante Abnahme um 72% ($p = 0,0009$) vorhanden. Ebenfalls signifikant sind die 62%-ige Abnahme von 9d nach 13d ($p = 0,0071$), die 66%-ige Abnahme von 6d nach sen ($p = 0,0005$) sowie die 54%-ige Abnahme von 9d nach sen ($p = 0,0305$). Insgesamt beträgt der Anteil des F₁-Teils an der ATP-Synthase Gesamtmenge nur zwischen 2,4% (sen) und 4,6% (9d). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$)

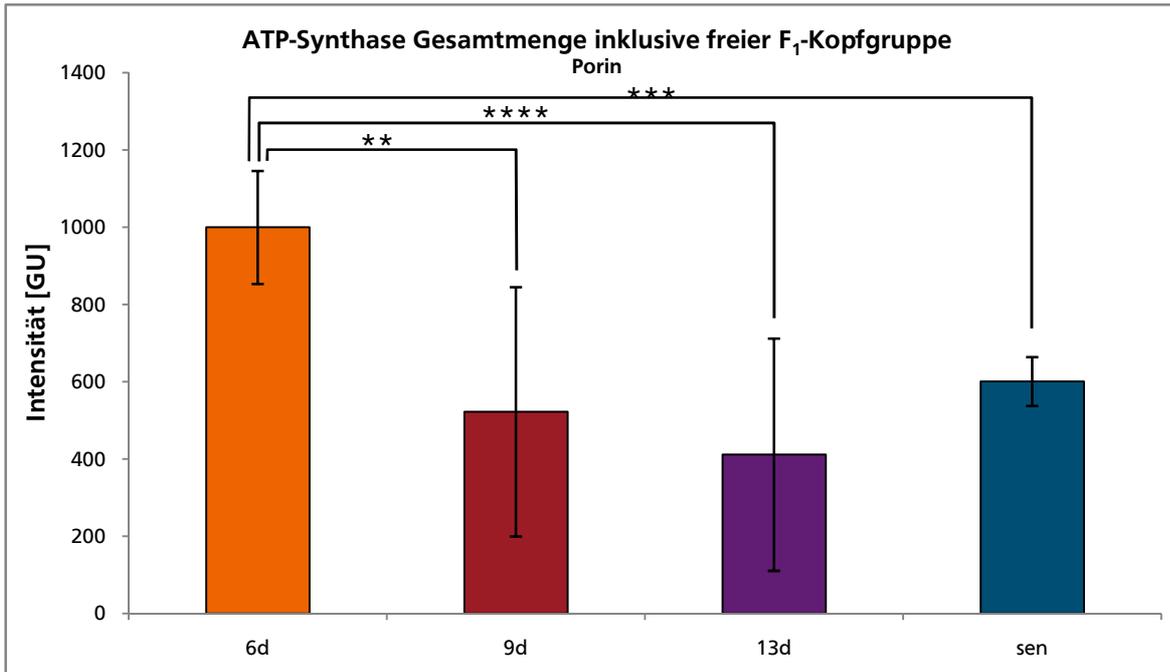
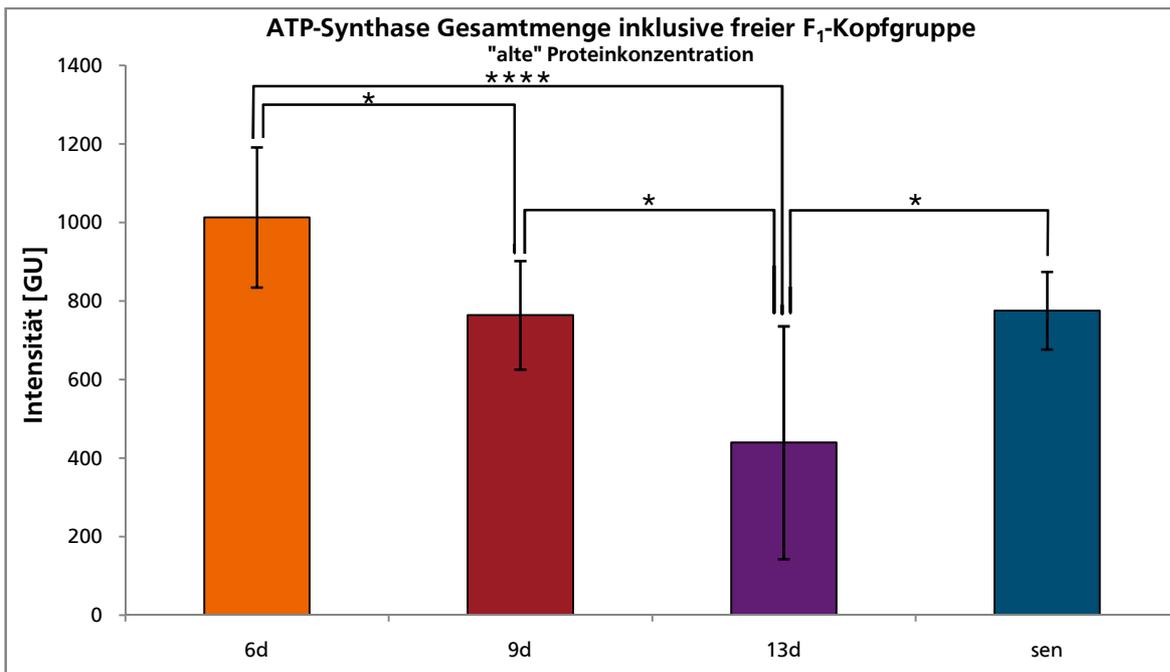
A**B**

Abbildung A.47 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an ATP-Synthase inklusive freiem F₁-Teil, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Monomer, Dimer und freier F₁-Kopfgruppe. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Normiert auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-48%, p = 0,0071), den 6 und 13 Tage alten (-59%, p = 0,0009) sowie den 6 Tage alten und seneszenten Proben (-40%, p = 0,0023) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 51% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (B) Normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-25%, p = 0,0469), den 6 und 13 Tage alten (-57%, p = 0,0009), den 9 und 13 Tage alten (-42%, p = 0,0469) sowie den 13 Tage alten und seneszenten Proben (+77%, p = 0,0193) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 65% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,005, **** p < 0,001)

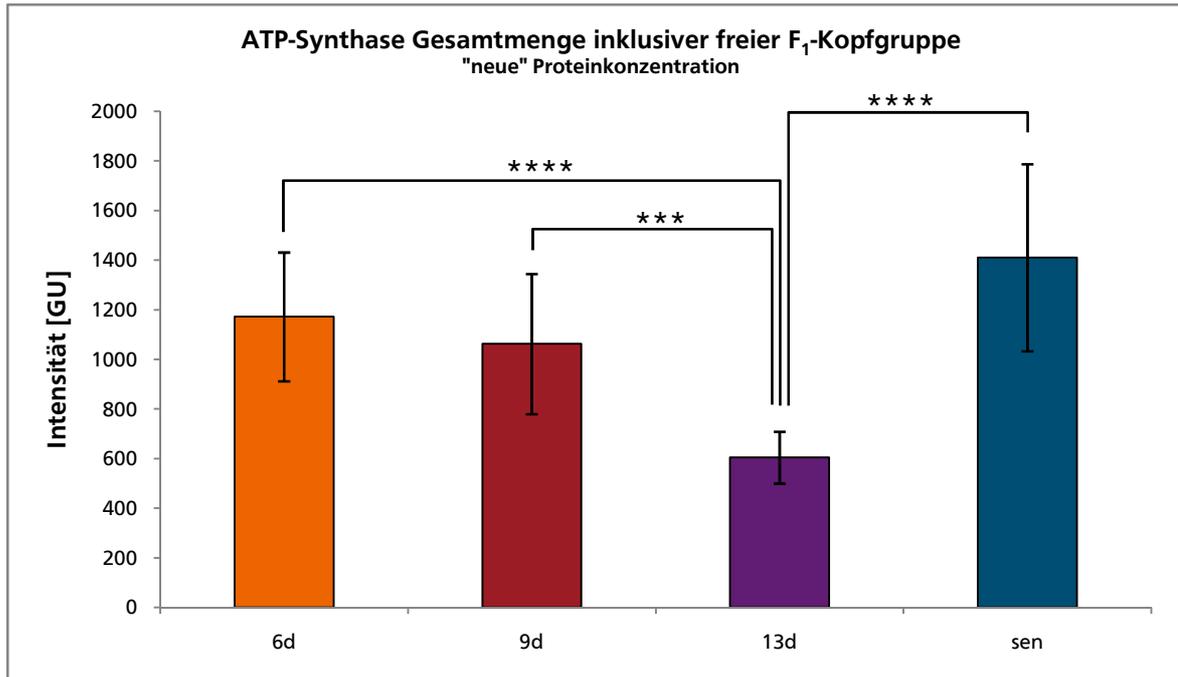
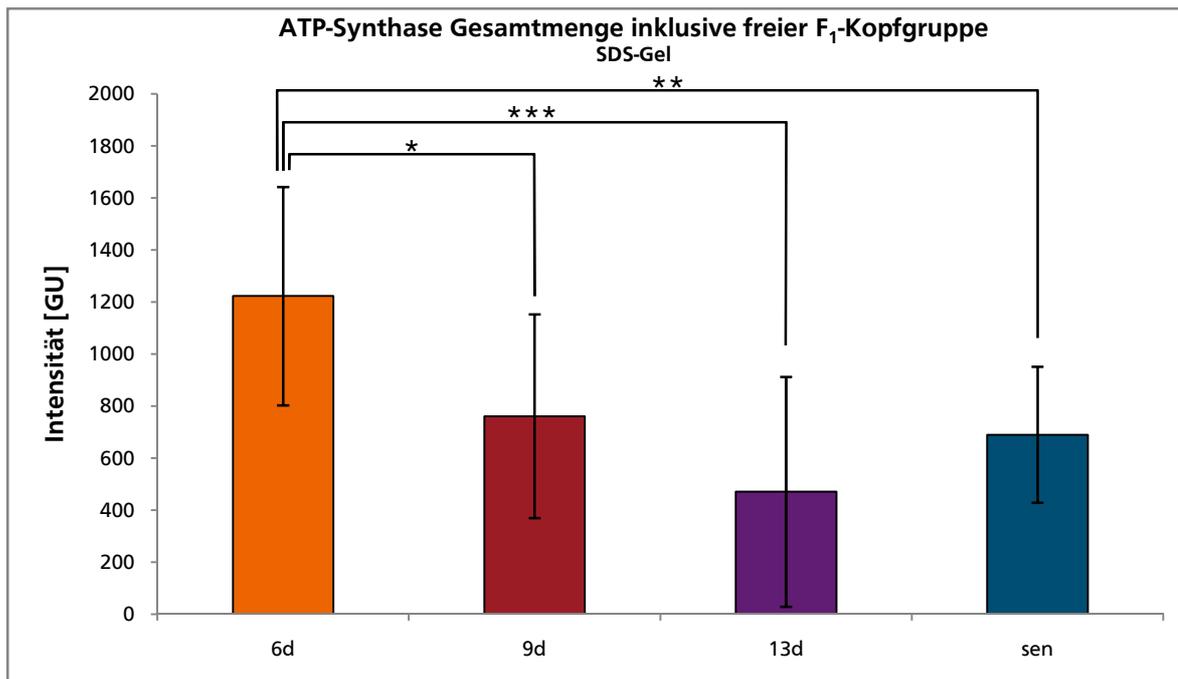
A**B**

Abbildung A.48 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an ATP-Synthase inklusive freiem F₁-Teil, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Monomer, Dimer und freier F₁-Kopfgruppe. Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 13 Tage alten (-48%, $p = 0,0003$), den 9 und 13 Tage alten (-43%, $p = 0,0017$) sowie den 13 Tage alten und seneszenten Proben (+134%, $p = 0,0009$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 87% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (B) Normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren siehe Tabelle A.1). Statistisch signifikante Änderungen sind jeweils zwischen den 6 und 9 Tage alten (-38%, $p = 0,0305$), den 6 und 13 Tage alten (-62%, $p = 0,0041$) sowie den 6 Tage alten und seneszenten Proben (-44%, $p = 0,0071$) vorhanden. Im Mittel liegen bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben nur noch 52% der bei den 6 Tage alten Individuen vorhandenen Menge an ATP-Synthase vor. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A.1.2 Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)

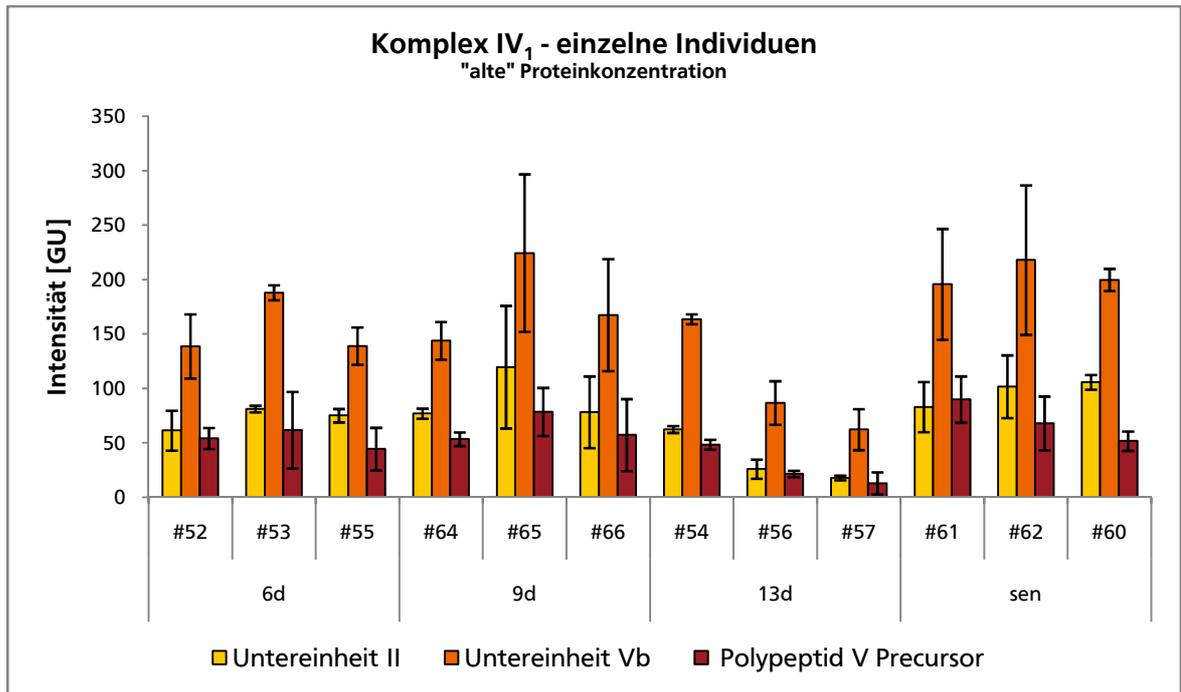
Rohdaten

Tabelle A.10 Intensitäten für die Untereinheiten II und Vb sowie den Polypeptid V Precursor des Komplex IV Monomers auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]		
			UE II	UE Vb	Polypeptid V Precursor
6d	#52	1	44,59768	97,03450	34,52796
		2	45,66647	97,60496	40,77617
		3	66,34115	173,37379	70,65441
	#53	1	48,38799	110,95489	13,23244
		2	62,41559	156,29972	71,50451
		3	51,85927	112,11920	45,55689
	#55	1	71,17868	142,99026	51,59016
		2	49,25217	102,84179	40,38184
		3	55,11437	82,27855	15,04056
9d	#64	1	102,69784	174,81921	79,29093
		2	108,33684	204,97864	81,03975
		3	103,36101	206,49574	59,43130
	#65	1	86,35315	203,65968	76,95622
		2	119,95088	201,68812	68,19161
		3	92,70105	172,73072	59,54249
	#66	1	24,89717	66,52679	12,05943
		2	122,08496	249,34913	94,36854
		3	102,00699	205,33686	81,17687
13d	#54	1	40,78264	102,81135	32,45574
		2	31,90910	84,47965	26,32683
		3	39,66964	106,81207	28,01480
	#56	1	40,77060	124,95012	28,51545
		2	39,39965	128,17810	31,88193
		3	23,37804	91,64680	25,78672
	#57	1	36,29099	144,88208	38,75407
		2	23,88258	49,75631	1,65266
		3	31,32280	144,88141	36,60784
sen	#61	1	60,05924	121,61317	40,41039
		2	68,83497	134,11928	52,57295
		3	46,41035	112,91720	25,99411
	#62	1	110,74102	212,45173	65,55099
		2	122,98697	230,10472	60,49049
		3	98,68142	185,16858	38,59069
	#60	1	40,53440	98,95830	48,28603
		2	110,62403	257,26426	115,30227
		3	66,68341	154,99899	69,62980

Zusätzliche Daten

A



B

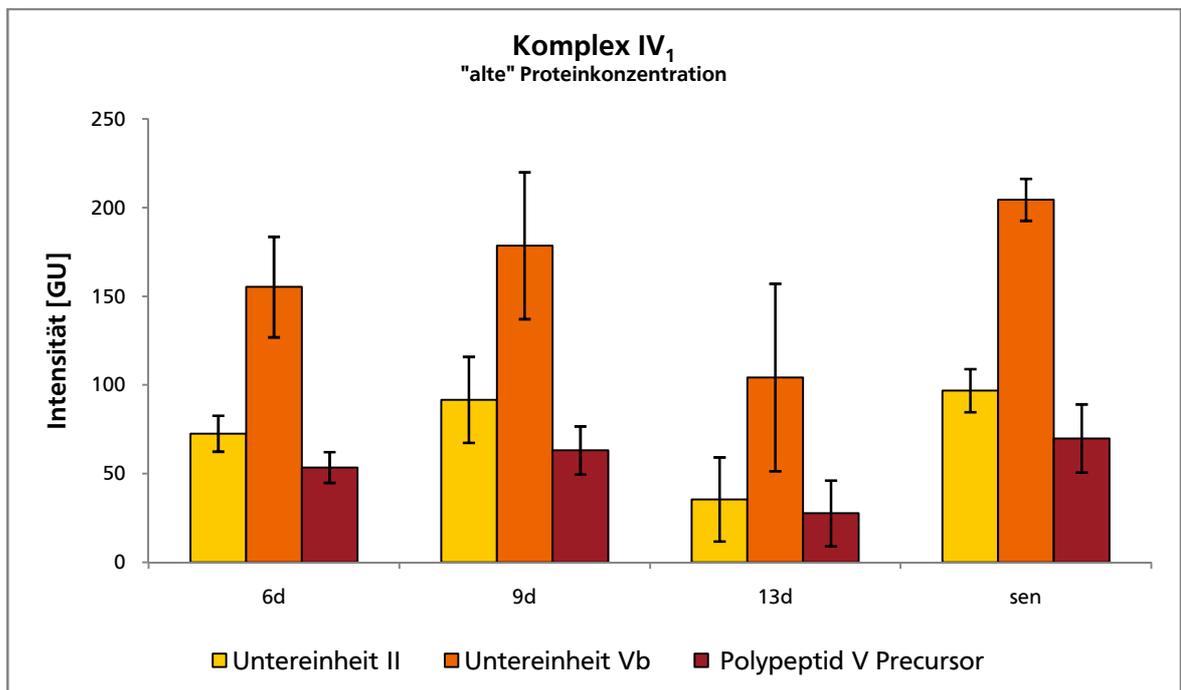
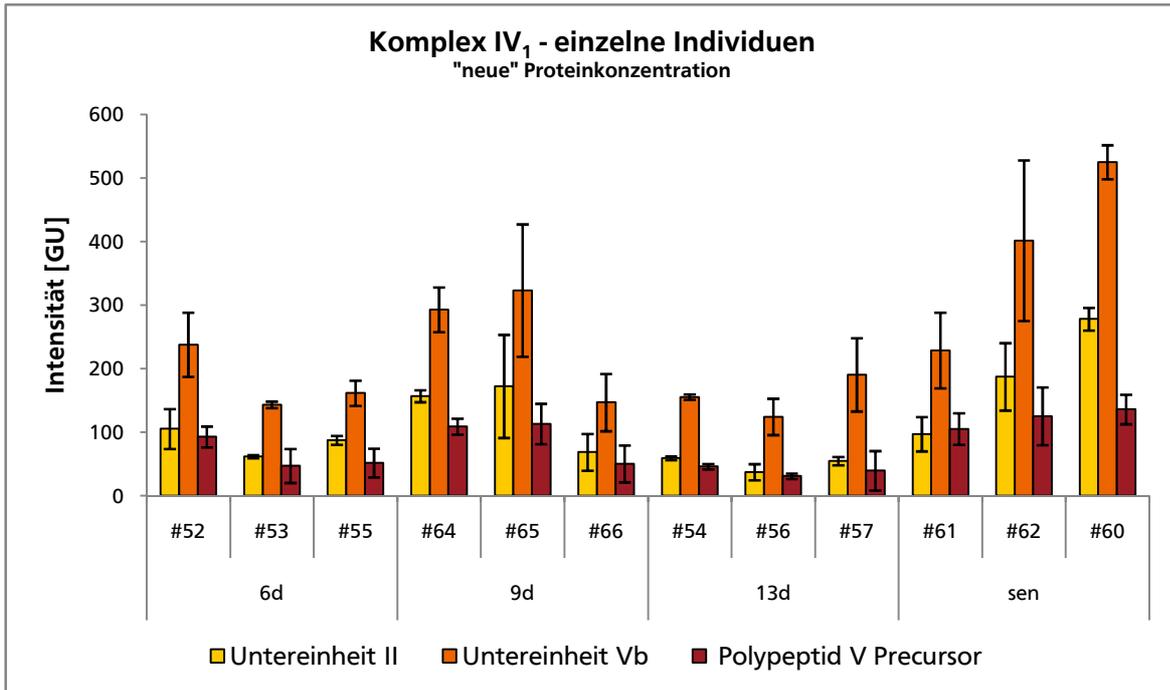


Abbildung A.49 Altersabhängige Intensitäten der Untereinheit II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors (VP) von Komplex IV in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die "alte" Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Die Verhältnisse der Intensitäten der drei Untereinheiten von Komplex IV₁ sind über alle Proben hinweg sehr konstant. Für die gemittelten Werte (B) liegen sie im Bereich von $0,45 \pm 0,09$ (UE II/ UE Vb), $1,40 \pm 0,28$ (UE II/ VP) und $3,22 \pm 0,72$ (UE Vb/ VP). Anhand der Mittelwerte der drei Individuen pro Altersstufe (B) lässt sich eine geringere Komplex IV Menge bei den 13 Tage alten Individuen im Vergleich zu den drei anderen Altersstufen erkennen.

A



B

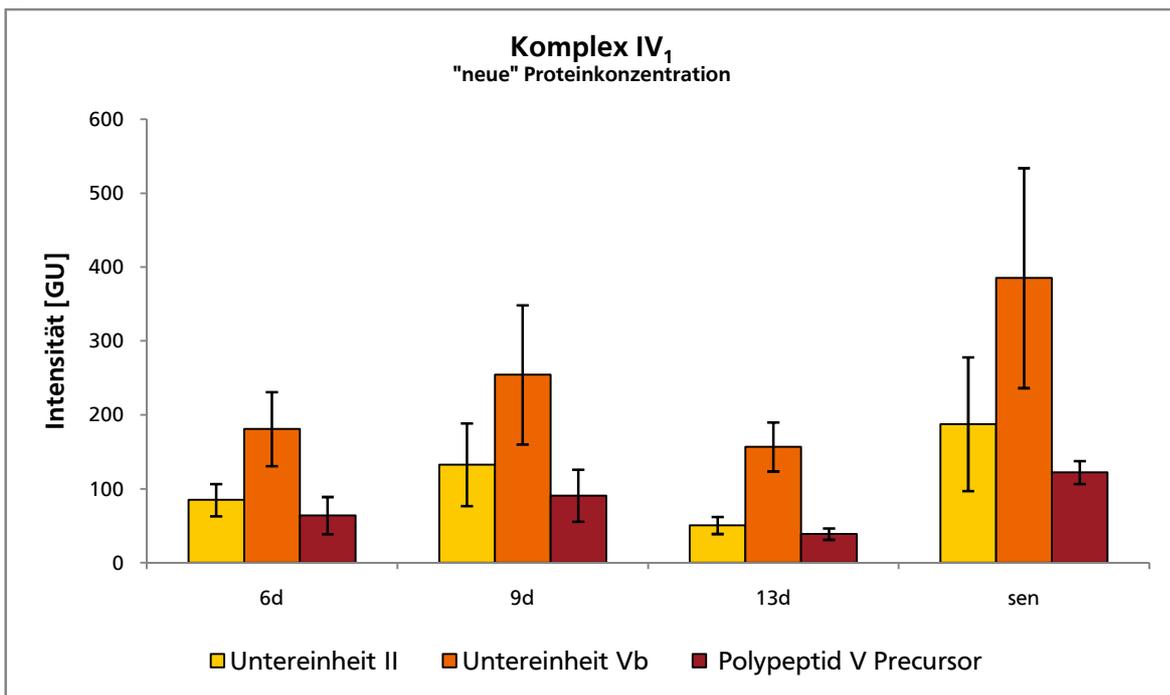
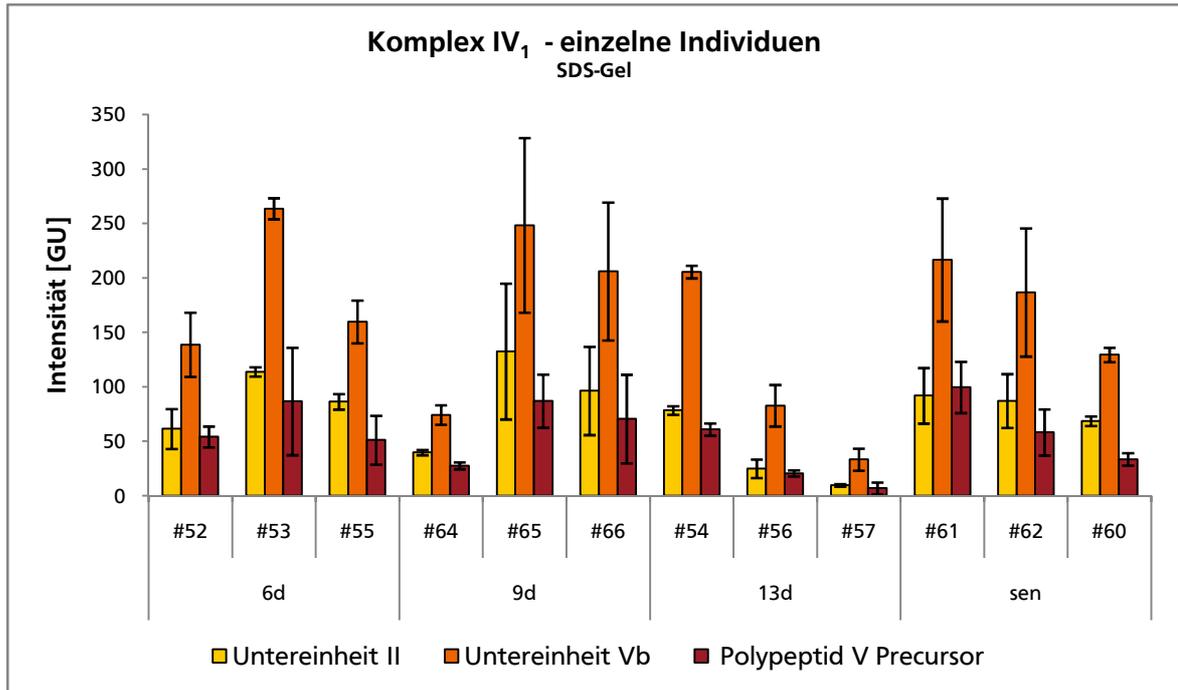


Abbildung A.50 Altersabhängige Intensitäten der Untereinheit II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors (VP) von Komplex IV in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die "neue" Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *Podospora anserina* Individuums an. Die Verhältnisse der Intensitäten der drei Untereinheiten von Komplex IV₁ sind über alle Proben hinweg sehr konstant. Für die gemittelten Werte (B) liegen sie im Bereich von $0,45 \pm 0,09$ (UE II/ UE Vb), $1,40 \pm 0,28$ (UE II/ VP) und $3,22 \pm 0,72$ (UE Vb/ VP). Anhand der Mittelwerte der drei Individuen pro Altersstufe (B) lässt sich eine wesentlich höhere Komplex IV Menge bei den seneszenten Individuen im Vergleich zu den drei anderen Altersstufen erkennen.

A



B

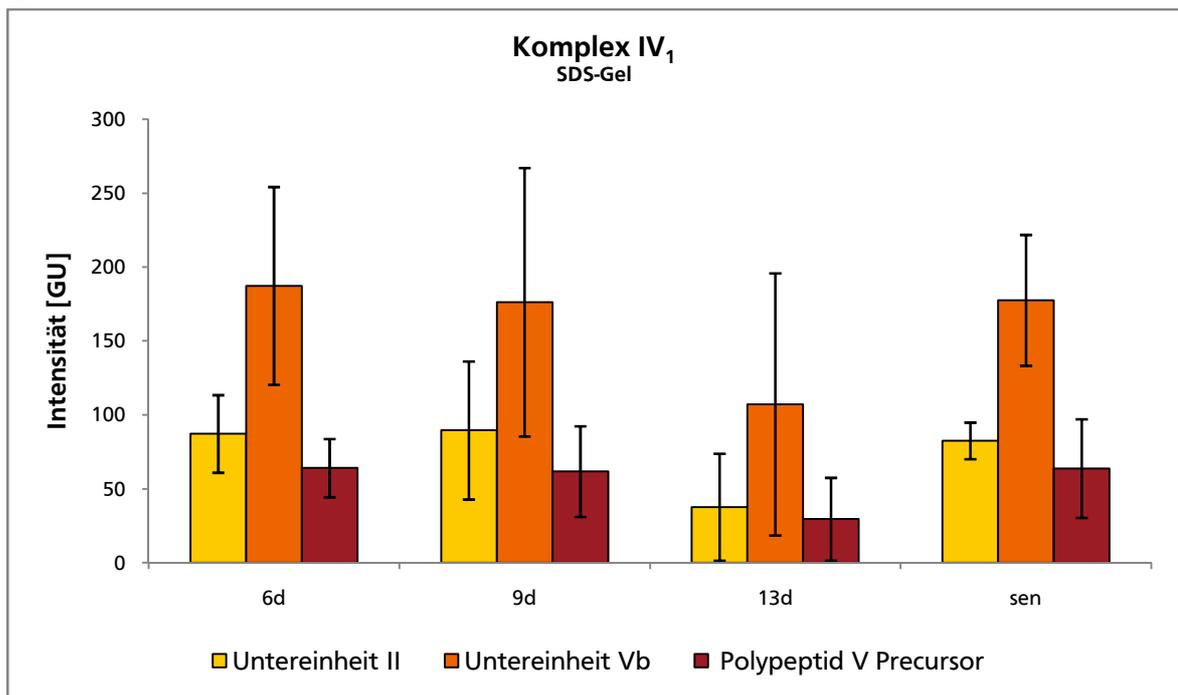


Abbildung A.51 Altersabhängige Intensitäten der Untereinheit II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors (VP) von Komplex IV in GU für alle 12 Proben von *Podospira anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1) Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *Podospira anserina* Individuums an. Die Verhältnisse der Intensitäten der drei Untereinheiten von Komplex IV₁ sind über alle Proben hinweg sehr konstant. Für die gemittelten Werte (B) liegen sie im Bereich von $0,45 \pm 0,09$ (UE II/ UE Vb), $1,40 \pm 0,28$ (UE II/ VP) und $3,22 \pm 0,72$ (UE Vb/ VP). Anhand der Mittelwerte der drei Individuen pro Altersstufe (B) lässt sich eine etwas geringere Komplex IV Menge bei den 13 Tage alten Individuen im Vergleich zu den drei anderen Altersstufen erkennen.

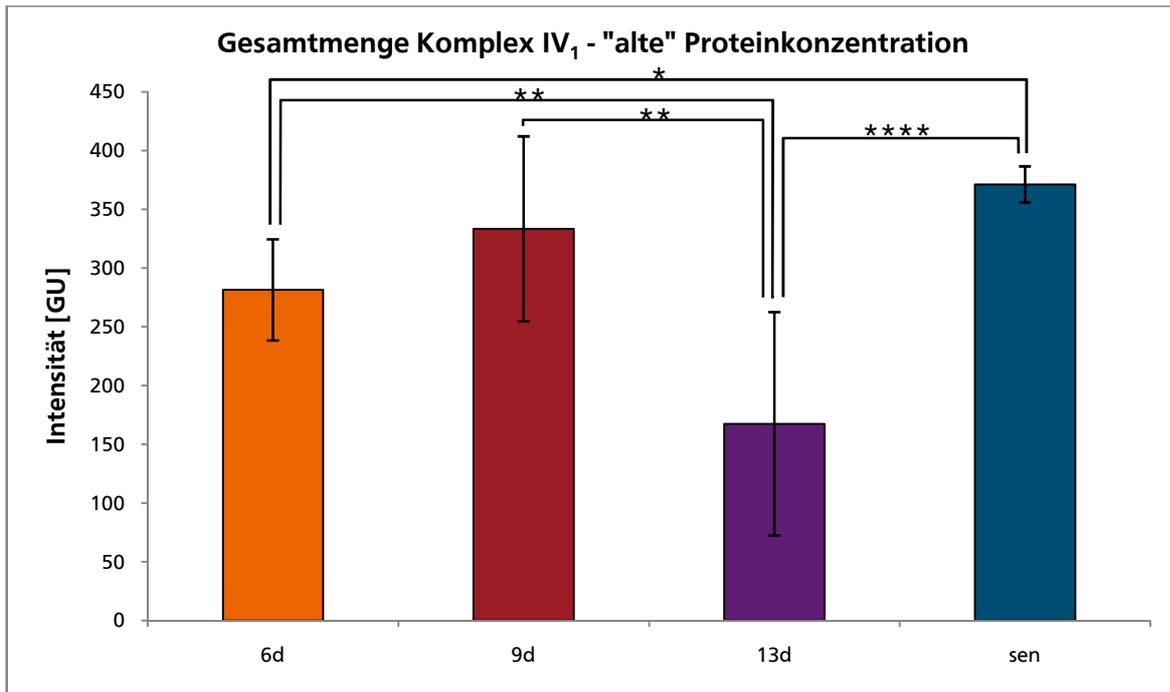


Abbildung A.52 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex IV₁, gewonnen aus der Summe der Intensitäten der Untereinheiten II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors von Komplex IV in GU, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersgruppe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersgruppe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex IV₁ Menge um 40.% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0054$) sowie um 50.% von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0054$). Wie bei den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran normierten Daten (vgl. Abbildung 5.1.15) zeigt sich also eine Abnahme der Menge von Komplex IV Monomer im fortgeschrittenen Alter. Es sind allerdings auch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den 6 Tage alten und den seneszenten sowie den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen vorhanden, die einer 32-%igen bzw. 122-%igen Zunahme entsprechen (6d:sen $p = 0,0152$, 13d:sen $p = 0,0009$). Aufgrund der unterschiedlichen Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sind diese jedoch nicht direkt mit den jüngeren vergleichbar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

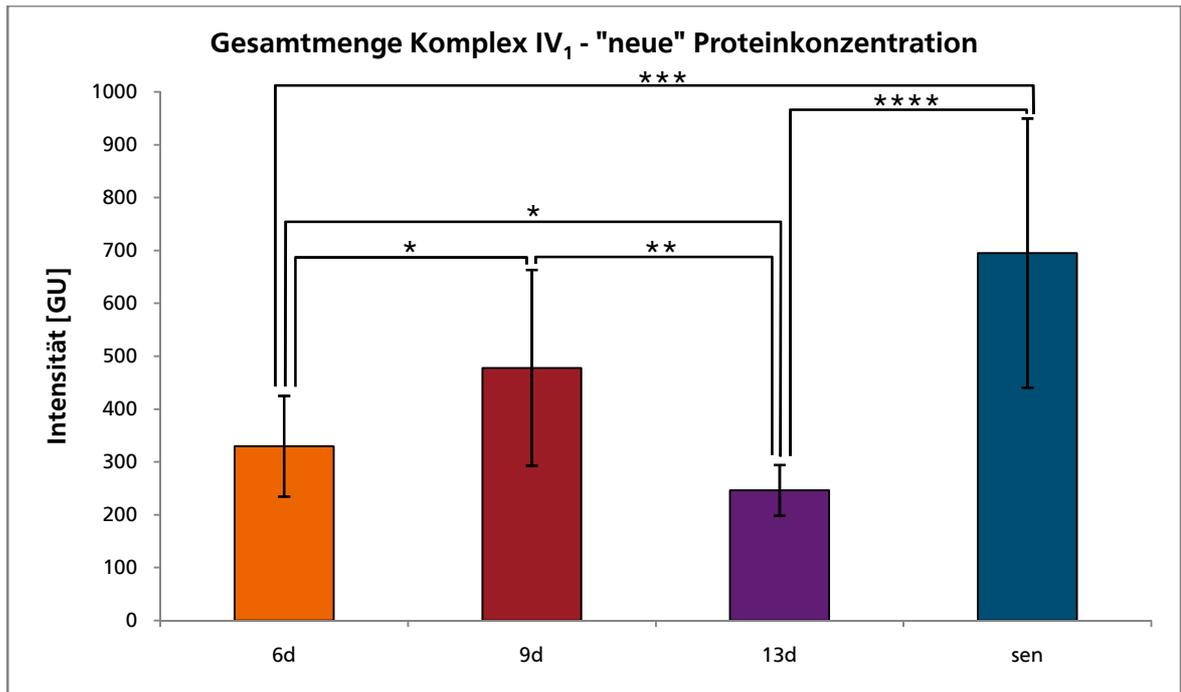


Abbildung A.53 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex IV₁, gewonnen aus der Summe der Intensitäten der Untereinheiten II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors von Komplex IV in GU, normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersgruppe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersgruppe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex IV₁ Menge um 25% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0380$) sowie um 48% von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0092$). Auch der 45%-ige Anstieg von den 6 zu den 9 Tage alten Individuen ist statistisch signifikant ($p = 0,0469$). Wie schon bei den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (vgl. Abbildung 5.1.15) und die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Abbildung A.52) normierten Daten besitzen die seneszenten Kulturen am meisten Komplex IV Monomer. Statistisch signifikant sind hier die Zunahme um 111% von den 6 Tage alten zu den seneszenten ($p = 0,0023$) sowie die 182%-ige Zunahme von den 13 Tage alten zu den seneszenten Individuen ($p = 0,0003$). Aufgrund der unterschiedlichen Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sind diese jedoch nicht direkt mit den jüngeren vergleichbar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

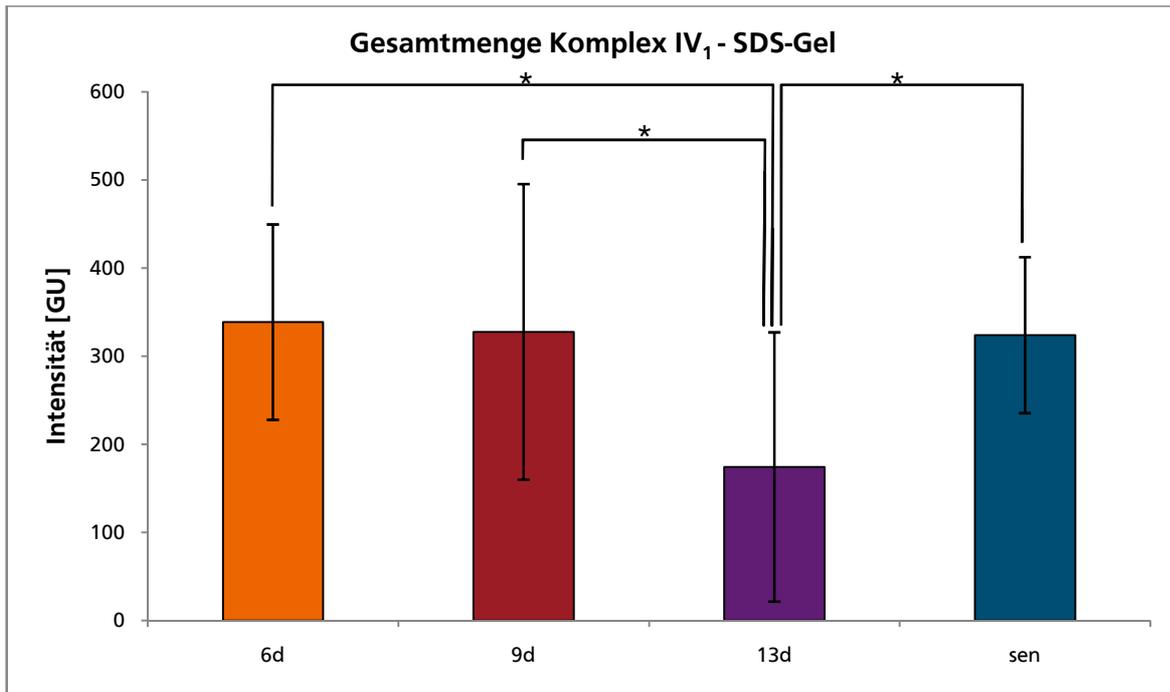


Abbildung A.54 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex IV₁, gewonnen aus der Summe der Intensitäten der Untereinheiten II und Vb sowie des Polypeptid V Precursors von Komplex IV in GU, normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersgruppe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersgruppe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex IV₁ Menge um 49% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0469$) sowie um 47% von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0305$). Wie bei den auf das Porin der äußeren Mitochondrienmembran (vgl. Abbildung 5.1.15) und den auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Abbildung A.52) normierten Daten zeigt sich also eine Abnahme der Menge von Komplex IV Monomer im fortgeschrittenen Alter. Es ist allerdings auch eine statistisch signifikante Zunahme der Komplex IV₁ Menge um 86% von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen vorhanden ($p = 0,0193$). Aufgrund der unterschiedlichen Gewinnung der seneszenten *Podospora*-Kulturen sind diese jedoch nicht direkt mit den jüngeren vergleichbar. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A.1.3 Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase (Komplex III₂)

Rohdaten

Tabelle A.11 Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des Komplex III Homodimers (III₂) auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplik	Intensität [GU]	
			Core Protein 1	Core Protein 2
6d	#52	1	55,75767	44,86375
		2	61,40882	35,69076
		3	53,12491	76,48994
	#53	1	64,50196	59,03146
		2	75,08904	67,42704
		3	35,11696	51,13329
	#55	1	106,22737	78,35763
		2	30,17900	32,02460
		3	60,70748	45,72744
9d	#64	1	84,88046	78,35476
		2	90,02974	76,19678
		3	78,30323	64,74517
	#65	1	75,93060	60,93257
		2	73,85214	59,63664
		3	21,76329	15,82803
	#66	1	36,78550	25,94179
		2	99,36638	92,02356
		3	96,64401	92,92023
13d	#54	1	15,03502	29,35851
		2	13,59193	26,50126
		3	10,96402	30,01700
	#56	1	9,31914	30,23926
		2	8,36965	26,28878
		3	2,23903	10,94536
	#57	1	1,07320	7,64164
		2	1,80491	6,48939
		3	1,15427	3,79138
sen	#61	1	39,70599	44,57424
		2	36,69667	43,87472
		3	12,87784	27,91164
	#62	1	18,20171	39,66867
		2	32,26862	44,35120
		3	6,34765	32,88478
	#60	1	42,76335	45,01016
		2	75,67375	98,71122
		3	45,24802	48,03201

Zusätzliche Daten

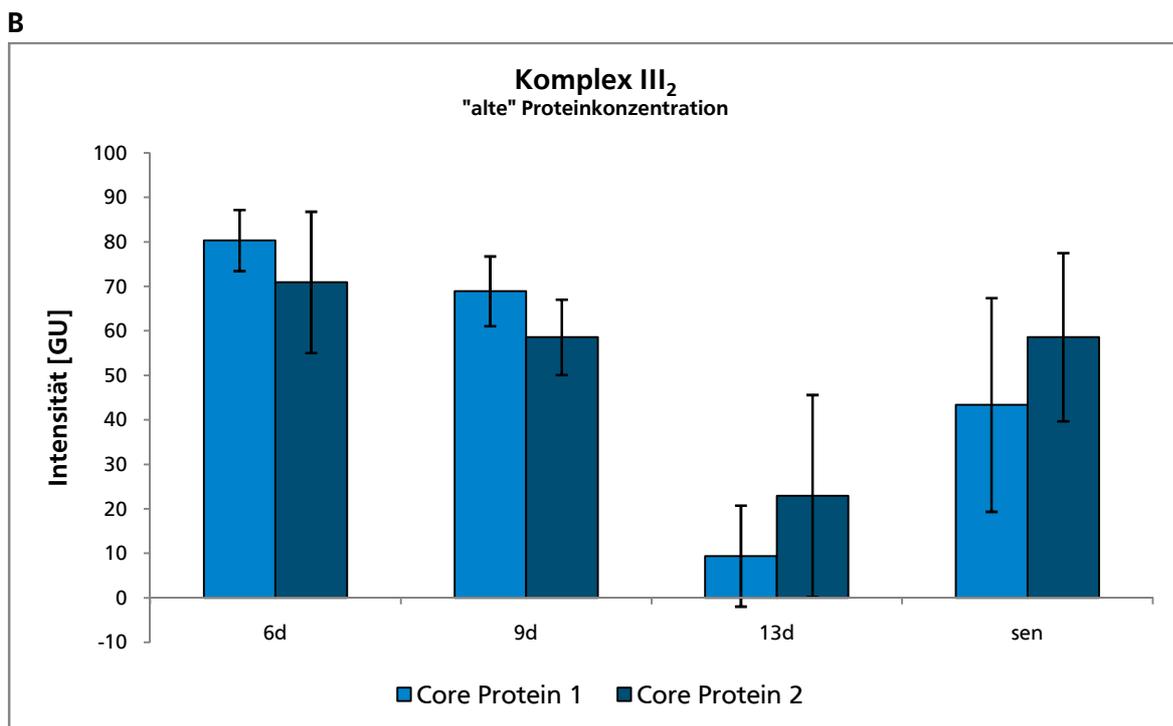
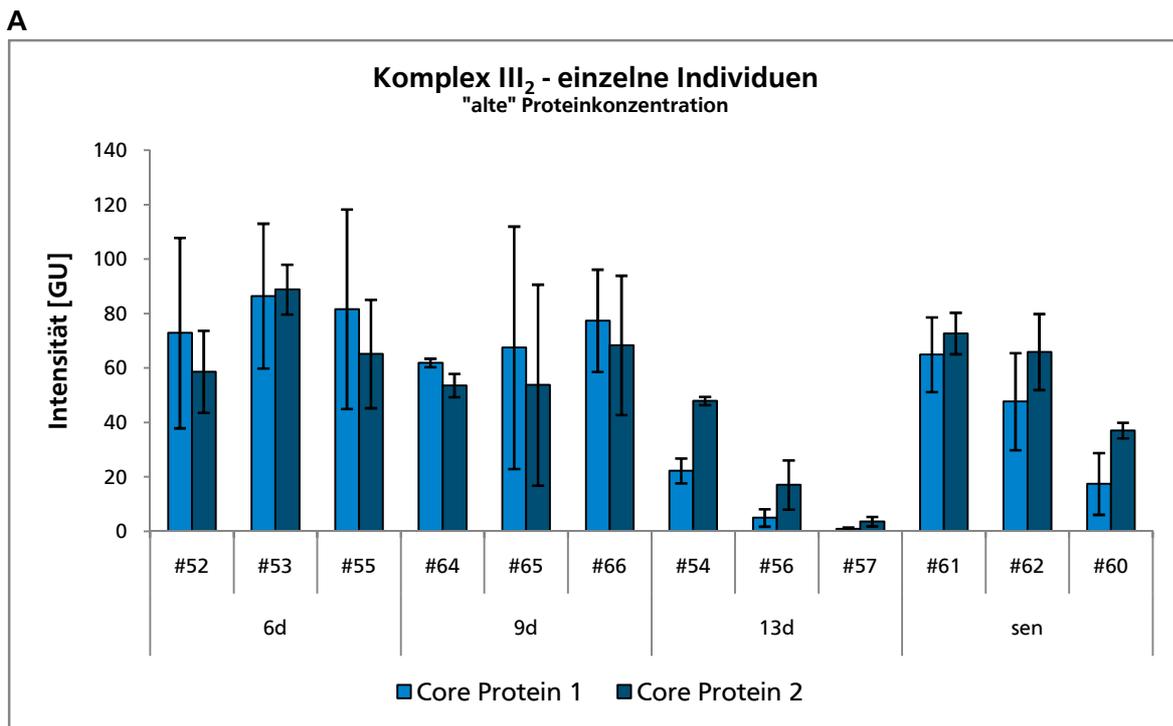
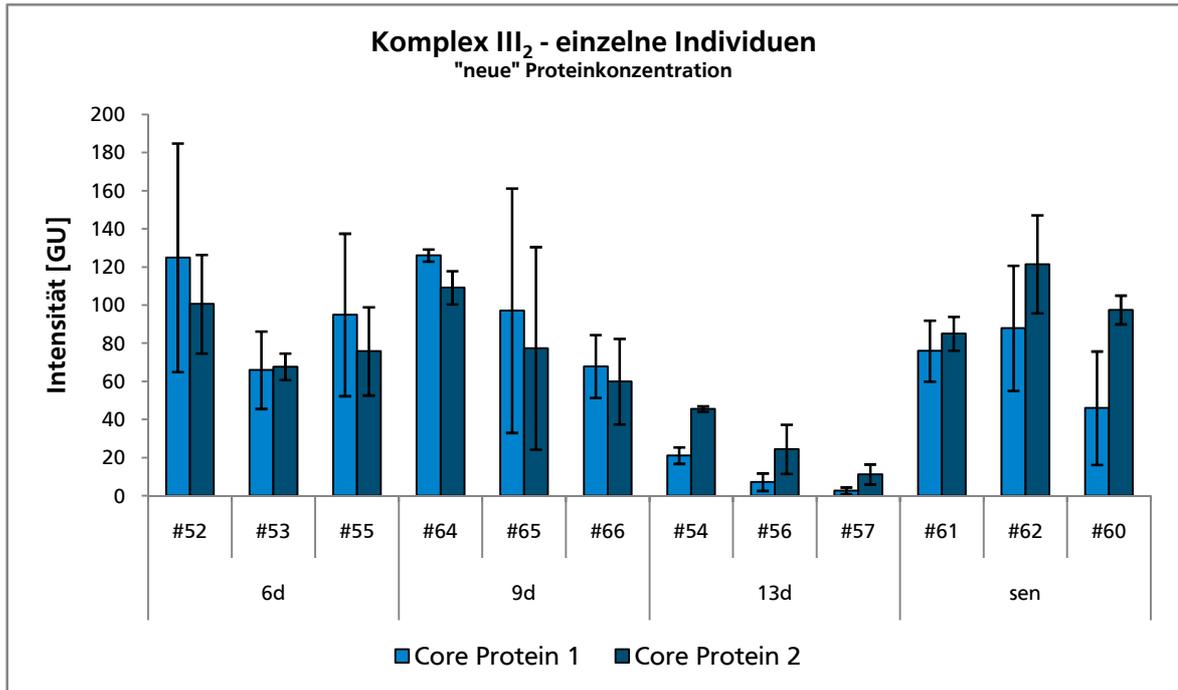


Abbildung A.55 Altersabhängige Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Während bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen Core Protein 1 überwiegt, ist bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mehr Core Protein 2 als 1 vorhanden. Unabhängig vom Verhältnis der beiden betrachteten Untereinheiten lässt sich eine Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen beobachten, die von den seneszenten Proben jedoch nicht fortgesetzt wird, da diese fast die gleiche Menge an Komplex III₂ aufweisen wie die 9 Tage alten Kulturen.

A



B

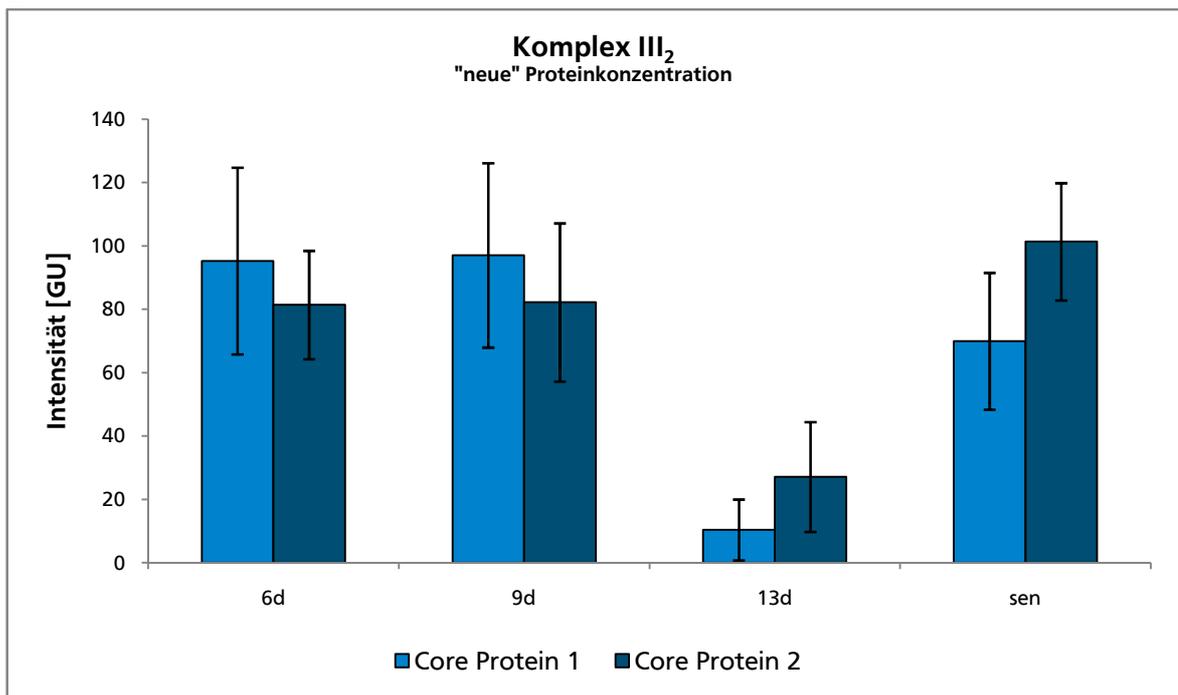
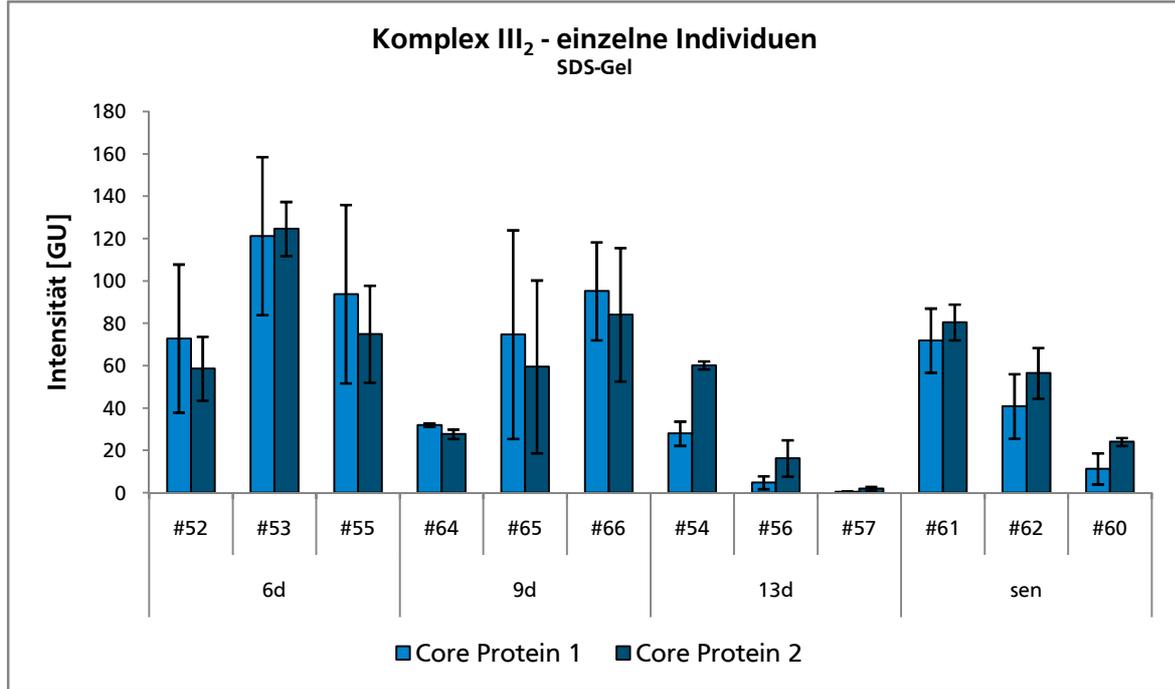


Abbildung A.56 Altersabhängige Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Während bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen Core Protein 1 überwiegt, ist bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mehr Core Protein 2 als 1 vorhanden. Unabhängig vom Verhältnis der beiden betrachteten Untereinheiten besitzen die 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Kulturen in etwa die gleiche Menge an Komplex III₂, die 13 Tage alten Proben jedoch wesentlich weniger. Lässt man die seneszenten Kulturen außer Acht, ergibt sich somit eine starke Abnahme der Komplex III₂ Menge im hohen Alter.

A



B

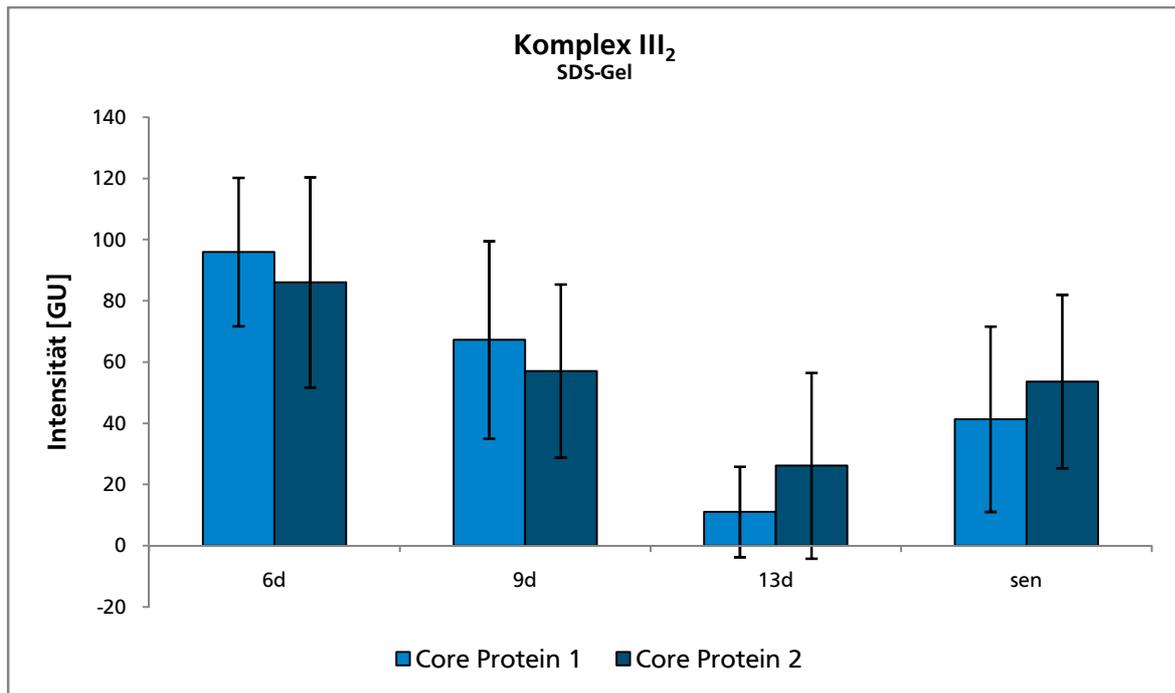


Abbildung A.57 Altersabhängige Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Während bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen Core Protein 1 überwiegt, ist bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben mehr Core Protein 2 als 1 vorhanden. Unabhängig vom Verhältnis der beiden betrachteten Untereinheiten lässt sich eine Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 9 und von den 9 zu den 13 Tage alten *Podospora*-Kulturen beobachten, die von den seneszenten Proben jedoch nicht fortgesetzt wird.

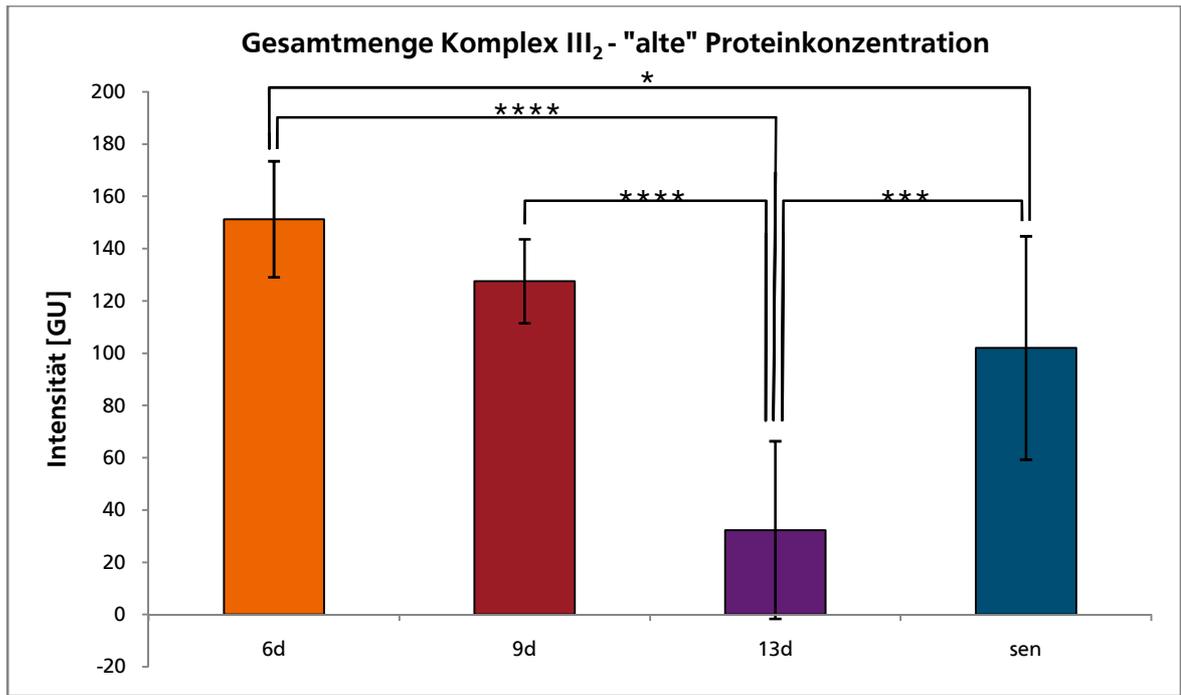


Abbildung A.58 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex III₂, gewonnen aus der Summe der Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten (-79%, $p = 0,0003$) und von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen (-75%, $p = 0,0009$). Die 16%-ige Abnahme von den 6 zu den 9 Tage alten Individuen ist nicht statistisch signifikant. Von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen kommt es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Komplex III₂ Menge um 216% ($p = 0,0041$). Im Vergleich zu den 6 Tage alten liegt bei den seneszenten Proben 33% weniger Komplex III₂ vor ($p = 0,0469$). Ohne Berücksichtigung der seneszenten Kulturen, die auf andere Weise gewonnen wurden (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1), kann somit eine starke Abnahme der Komplex III₂ Menge gegen Ende der Lebensspanne festgestellt werden. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

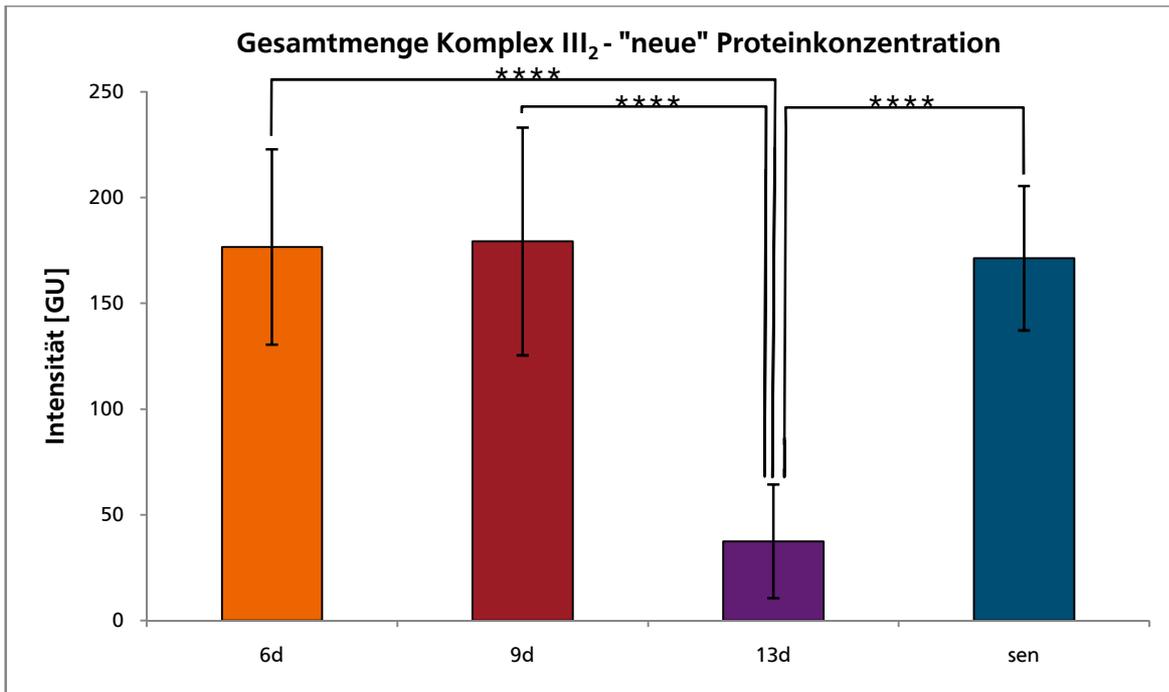


Abbildung A.59 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex III₂, gewonnen aus Summe der Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU, normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Während die Komplex III₂ Menge bei den 6 und 9 Tage alten sowie seneszenten Kulturen nahezu identisch ist, zeigt sich eine erheblich geringere Menge bei den 13 Tage alten Proben. Im Vergleich mit den 6 Tage alten Kulturen liegen 79% ($p = 0,0003$), im Vergleich mit den 9 Tage alten ebenfalls 79% ($p = 0,0009$) und im Vergleich mit den seneszenten Kulturen 78% ($p = 0,0003$) weniger Komplex III₂ vor. Das entspricht einer 357%-igen Zunahme der Komplex III₂ Menge von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen. Lässt man letztere aufgrund ihrer andersartigen Gewinnung außer Acht (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1), so lässt sich eine starke Abnahme der Komplex III₂ Menge gegen Ende der Lebensspanne feststellen. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

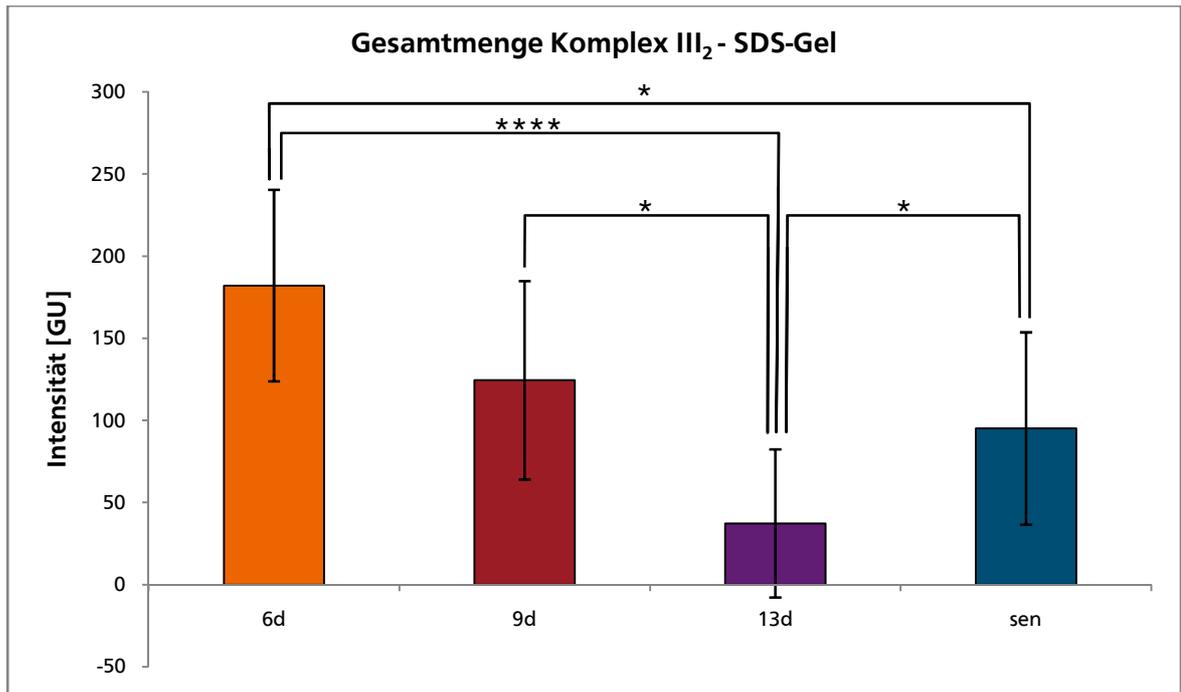


Abbildung A.60 Altersabhängigkeit der Gesamtmenge an Komplex III₂, gewonnen aus Summe der Intensitäten des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ in GU, normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten (-80%, $p = 0,0009$) und von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen (-70%, $p = 0,0118$). Die 32%-ige Abnahme von den 6 zu den 9 Tage alten Individuen ist nicht statistisch signifikant. Von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen kommt es zu einer statistisch signifikanten Zunahme der Komplex III₂ Menge um 155% ($p = 0,0193$). Im Vergleich zu den 6 Tage alten liegt bei den seneszenten Proben 48% weniger Komplex III₂ vor ($p = 0,0118$). Ohne Berücksichtigung der seneszenten Kulturen, die auf andere Weise gewonnen werden (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1), kann somit eine graduelle Abnahme der Komplex III₂ Menge mit dem Alter festgestellt werden. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A.1.4 NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (Komplex I)

Rohdaten

Tabelle A.12 Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein, sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]		
			78 kDa FeS-Protein	49 kDa Untereinheit	40 kDa Untereinheit
6d	#52	1	8,61242	11,99701	8,05530
		2	7,22243	13,07660	6,69769
		3	19,27382	27,29560	18,36295
	#53	1	11,49160	18,53660	12,02165
		2	15,19786	19,10771	16,00748
		3	8,84311	20,84790	14,22831
	#55	1	13,53616	27,12407	14,83003
		2	9,61988	21,32427	11,87976
		3	18,91302	23,58354	18,51878
9d	#64	1	17,37987	30,82028	26,85411
		2	22,57531	34,44639	34,35087
		3	18,36593	32,64558	23,48290
	#65	1	10,97647	30,00229	21,27588
		2	14,86024	24,87378	20,34485
		3	11,20455	15,87097	13,94968
	#66	1	7,58965	14,59248	11,00174
		2	12,13883	26,68536	23,76097
		3	13,54604	23,13547	23,85251
13d	#54	1	9,66065	27,44375	15,43090
		2	9,81428	17,42794	7,35436
		3	6,90539	20,03124	14,16480
	#56	1	11,10669	18,52839	8,54678
		2	7,74702	12,37812	10,65368
		3	2,54241	12,75412	6,29146
	#57	1	4,79966	21,41598	14,89827
		2	2,92879	9,94641	5,02887
		3	1,42203	16,08171	11,28305
sen	#61	1	11,22252	18,33031	13,14553
		2	8,24341	16,50999	12,04604
		3	6,82042	15,21686	10,94113
	#62	1	9,97557	24,44898	19,15129
		2	10,87543	31,93439	17,89281
		3	15,00288	26,31997	15,30767
	#60	1	17,06113	25,05359	18,09216
		2	36,88957	33,82678	26,18645
		3	19,17270	28,22806	22,45220

Zusätzliche Daten

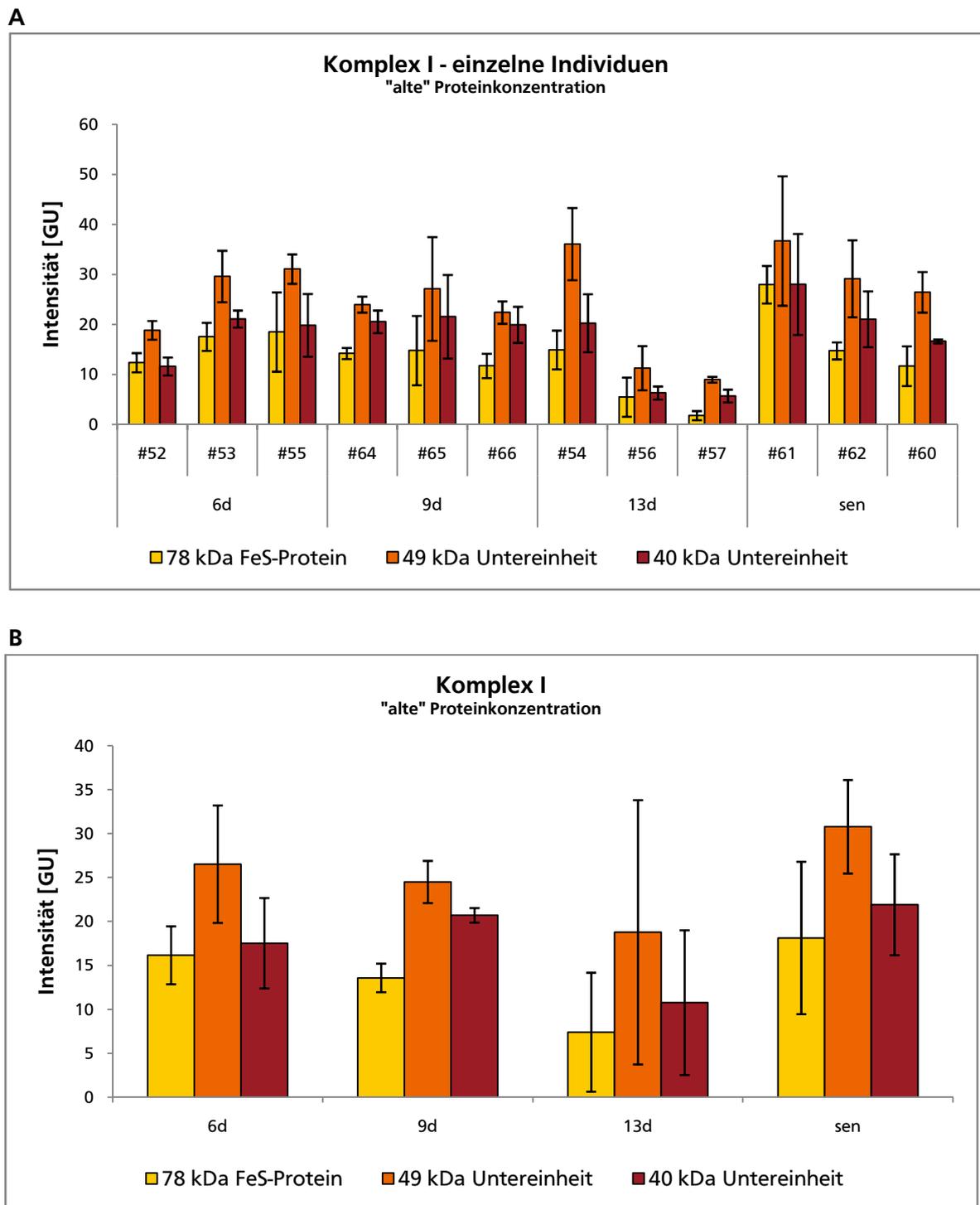
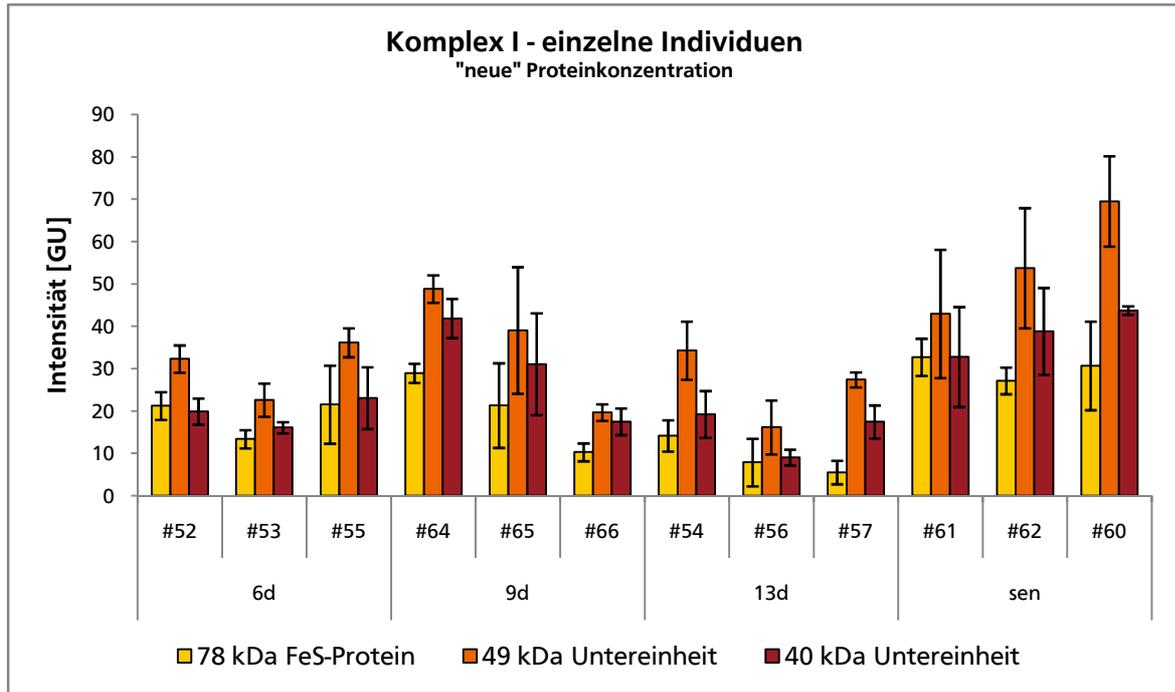


Abbildung A.61 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. A Die Intensitäten der 49 kDa Untereinheit sind stets am größten, die des 78 kDa FeS-Proteins am geringsten. Während die drei Individuen der 9 Tage alten Kulturen sehr einheitliche Intensitäten zeigen und auch bei den 6 Tage alten und seneszenten Kulturen nur verhältnismäßig geringe Intensitätsunterschiede zwischen den drei Individuen vorliegen, weist das 13 Tage alte Individuum mit der Kulturnummer #54 eine gegenüber den anderen beiden Individuen in dieser Gruppe stark erhöhte Komplex I Menge auf. B Insgesamt liegen nur geringe Unterschiede der Komplex I Menge zwischen den vier Altersstufen vor. Aufgrund der teilweise recht hohen Standardabweichungen kann bezüglich der altersabhängigen Veränderung der Komplex I Menge jedoch keine klare Aussage getroffen werden.

A



B

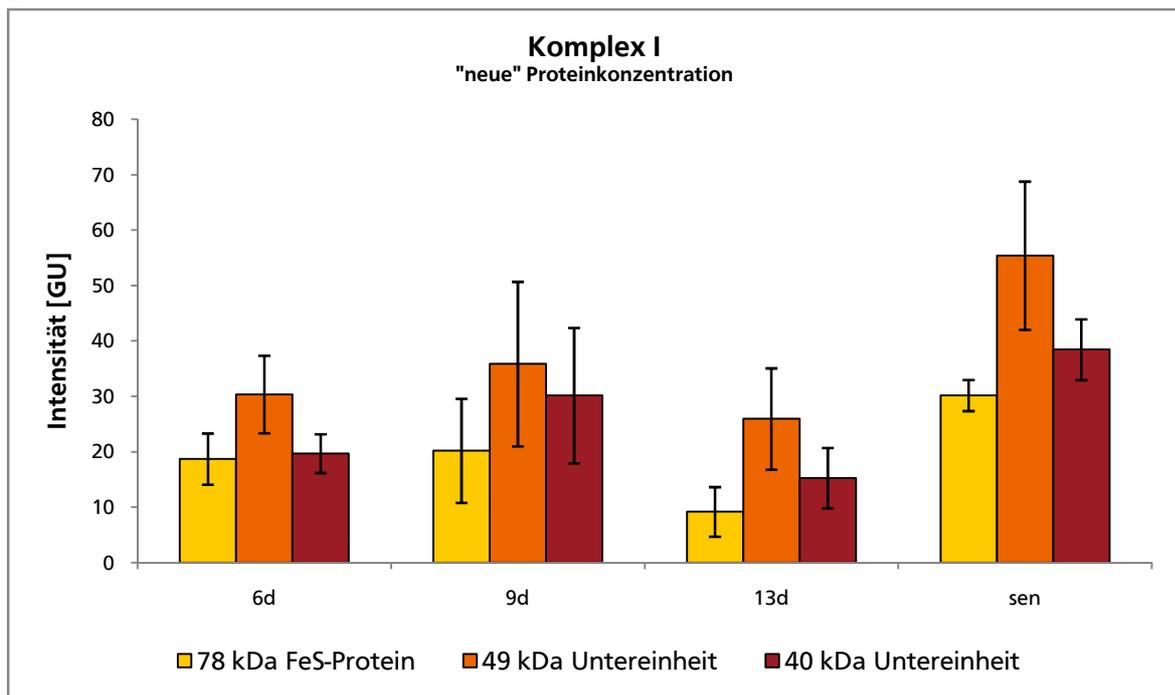
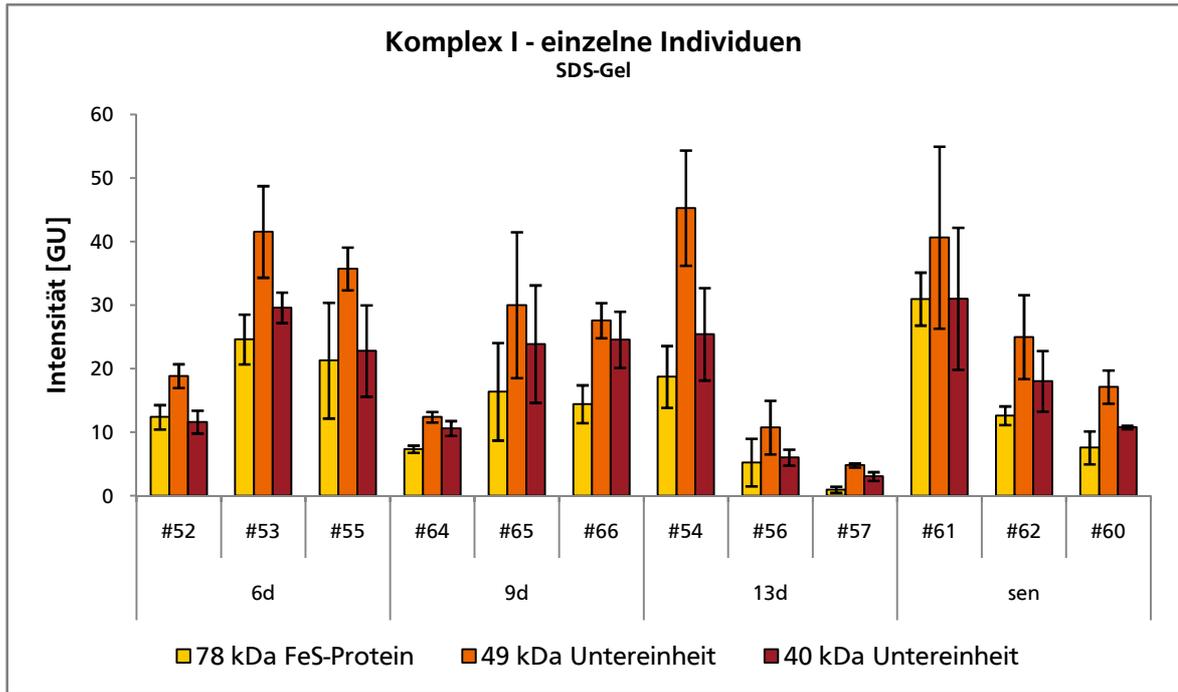


Abbildung A.62 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU für 12 Proben von *Podospira anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. A Die Intensitäten der 49 kDa Untereinheit sind stets am größten, die des 78 kDa FeS-Proteins am geringsten. Alle vier Altersstufen zeigen mehr oder weniger große Intensitätsschwankungen zwischen den jeweiligen Individuen. B Die seneszenten Kulturen scheinen mehr individuellen Komplex I zu besitzen als die 6, 9 und 13 Tage alten Proben. Durch ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) sind sie jedoch auch nicht direkt mit den jüngeren Kulturen vergleichbar.

A



B

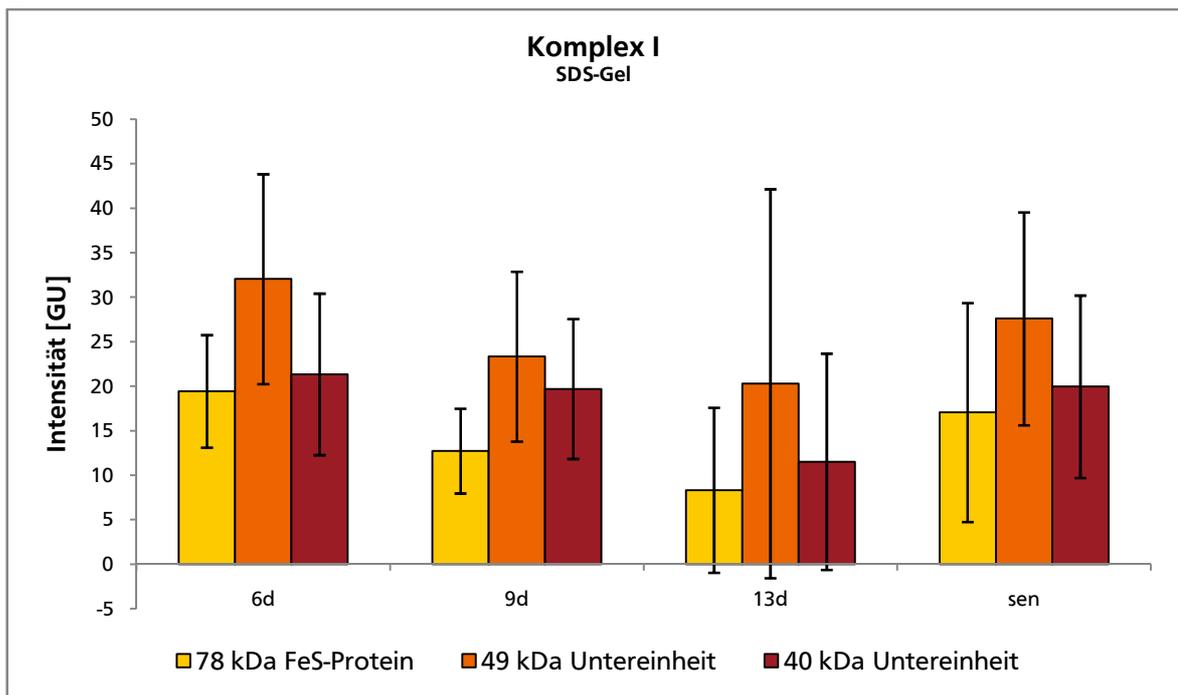


Abbildung A.63 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU für alle 12 Proben von *Podospora anserina* (A) und gemittelt für die vier betrachteten Altersstufen (B), normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und bei A zusätzlich die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. A Die Intensitäten der 49 kDa Untereinheit sind stets am größten, die des 78 kDa FeS-Proteins am geringsten. Bei allen vier Altersstufen zeigt ein Individuum eine gegenüber den anderen beiden erhöhte Komplex I Menge. B Aufgrund der teilweise sehr großen Standardabweichungen und der nur minimalen Unterschiede zwischen den vier Altersstufen kann keine klare Aussage über die altersabhängige Veränderung der Komplex I Menge gemacht werden.

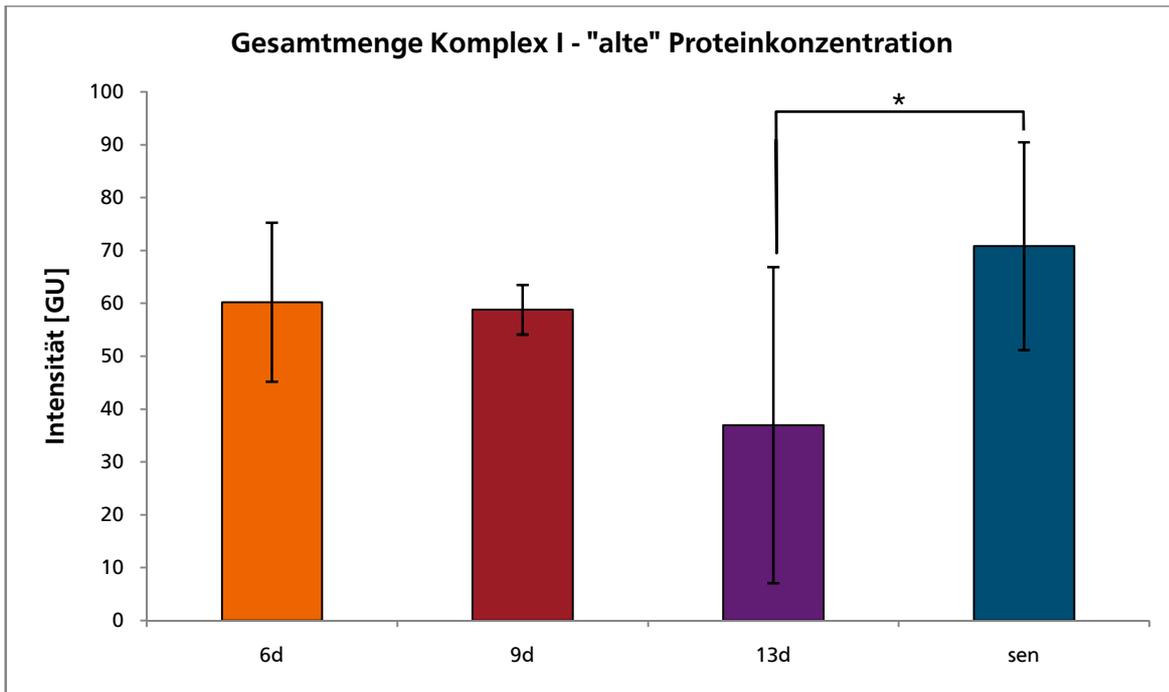


Abbildung A.64 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an individuellem Komplex I. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Während die 6 und 9 Tage alten Kulturen praktisch die gleiche Menge an individuellem Komplex I aufweisen, liegen bei den 13 Tage alten Proben 37% bzw. 39% weniger vor. Diese Abnahme ist jedoch nicht statistisch signifikant. Bei den seneszenten Kulturen liegt am meisten individueller Komplex I, vor; 92% mehr als bei den 13 Tage alten Proben ($p = 0,0380$) und im Mittel 19% mehr als bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen (nicht statistisch signifikant). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

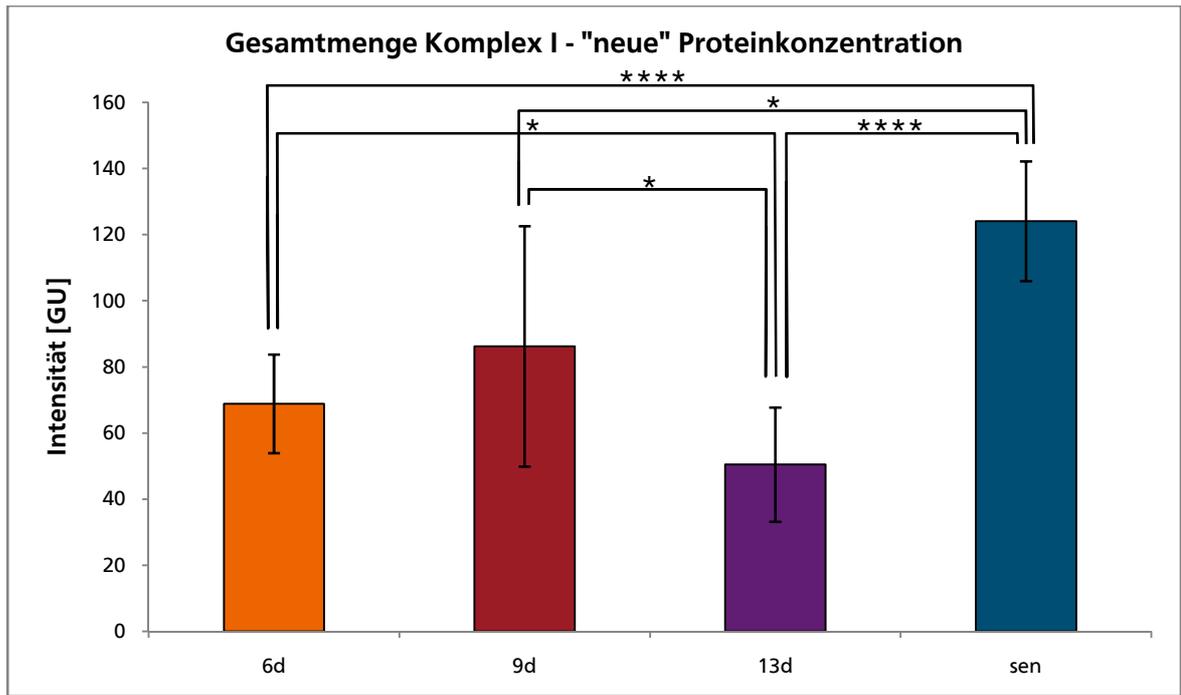


Abbildung A.65 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an individuellem Komplex I. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU, normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen liegt eine ähnliche Menge an individuellem Komplex I vor, bei den 13 Tage alten am wenigsten und bei den seneszenten Proben die größte Menge. Es zeigen sich statistisch signifikante Änderungen zwischen den 6 und 13 Tage alten (-27%, $p = 0,0380$), den 6 Tage alten und seneszenten (+80%, $p = 0,0009$), den 9 und 13 Tage alten (-42%, $p = 0,0469$), den 9 Tage alten und seneszenten (+44%, $p = 0,0243$) sowie den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen (+146%, $p = 0,0005$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

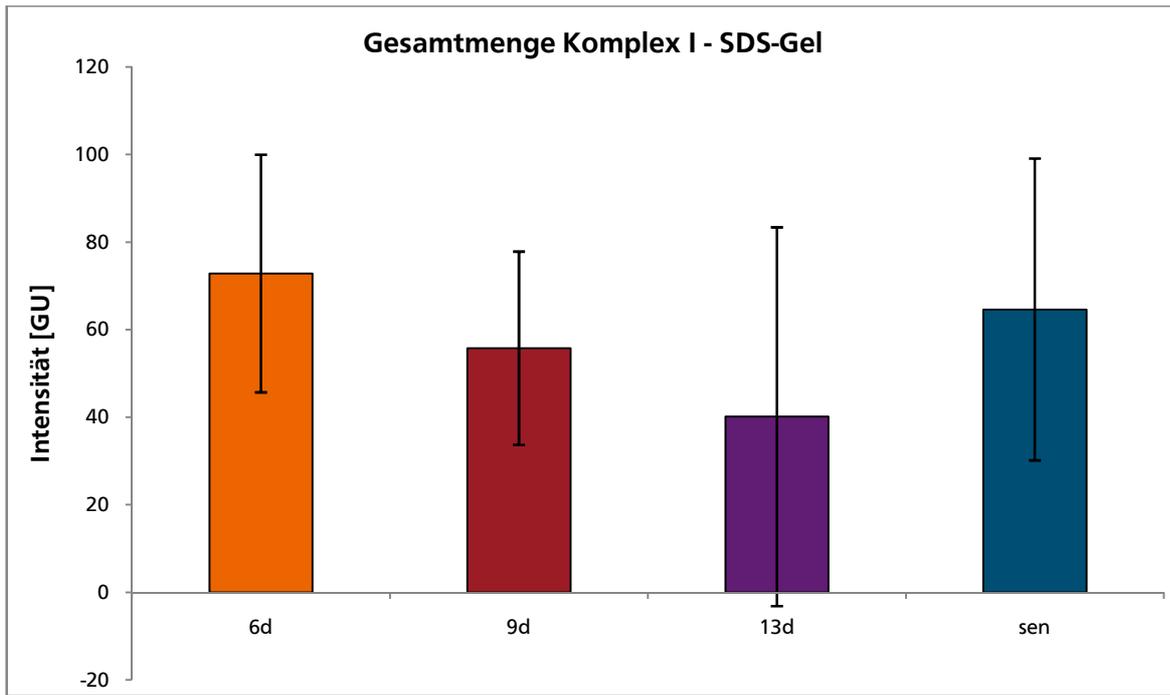


Abbildung A.66 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an individuellem Komplex I. Aufgetragen ist jeweils die Summe der Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I in GU, normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die Intensitäten für die drei Gelreplikate pro Kultur sowie die drei Individuen pro Altersstufe wurden zusammengefasst, dargestellt ist der entsprechende Mittelwert pro Altersstufe. Statistisch signifikante Änderungen sind nicht vorhanden, jedoch lässt sich als Trend eine Abnahme der Menge an individuellem Komplex I von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen erkennen. Die seneszenten Proben setzen diesen Trend nicht fort, was vermutlich mit ihrer andersartigen Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zusammenhängt.

A.1.5 Superkomplexe

Rohdaten

Tabelle A.13 Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein, sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I als Bestandteil des Superkomplexes b (I₁III₂IV₁) auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplik	Intensität [GU]		
			78 kDa FeS-Protein	49 kDa Untereinheit	40 kDa Untereinheit
6d	#52	1	33,18317	47,20253	38,18679
		2	29,20760	47,58259	38,92886
		3	40,57452	69,27872	64,69990
	#53	1	30,87047	50,93825	49,70051
		2	39,53715	52,15605	59,41067
		3	26,02808	48,20064	42,59210
	#55	1	45,98085	72,79983	57,86111
		2	27,81166	38,14730	34,10796
		3	29,57066	36,16724	45,16991
9d	#64	1	36,66705	45,02686	53,74922
		2	34,31525	46,19258	48,34548
		3	31,97987	60,38442	57,98346
	#65	1	27,62307	52,47808	56,86969
		2	24,77321	55,10474	57,68824
		3	29,64967	46,28298	57,42411
	#66	1	18,46390	38,18134	35,23954
		2	39,42509	65,71545	76,46903
		3	39,04131	73,01846	77,06003
13d	#54	1	10,56384	35,47436	30,32700
		2	16,22762	34,52959	30,06366
		3	20,46383	39,53417	45,67881
	#56	1	21,46732	49,27643	40,51031
		2	30,44820	43,35668	51,18732
		3	16,10417	37,83386	36,06621
	#57	1	12,61045	50,39483	53,91049
		2	4,91930	22,91203	21,65537
		3	4,93698	29,77482	28,56710
sen	#61	1	20,80070	36,69093	33,17574
		2	22,50405	50,88417	37,18947
		3	12,57006	30,77617	30,23050
	#62	1	32,96736	62,32605	53,88255
		2	30,41413	71,73400	65,08553
		3	26,24881	63,89310	47,25103
	#60	1	21,32799	34,93915	31,89889
		2	67,21506	60,95326	50,64833
		3	22,90005	47,22341	40,36471

Tabelle A.14 Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des Komplex III Homodimers (III₂) als Bestandteil des Superkomplexes b (I₁,III₂,IV₁) auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplik	Intensität [GU]	
			Core Protein 1	Core Protein 2
6d	#52	1	58,10736	42,23427
		2	52,06940	42,50143
		3	94,36025	77,81778
	#53	1	79,43771	56,38686
		2	83,27657	62,54435
		3	54,39008	48,69390
	#55	1	78,07663	68,91542
		2	49,16362	39,38639
		3	52,27932	40,90419
9d	#64	1	78,67594	54,57456
		2	61,99754	44,90298
		3	79,71035	56,02281
	#65	1	64,20221	50,19364
		2	69,03626	48,57632
		3	53,07749	49,85869
	#66	1	38,32917	34,97897
		2	70,09288	61,16950
		3	71,00131	63,39345
13d	#54	1	9,66177	15,19847
		2	23,56017	23,69001
		3	30,73167	30,80934
	#56	1	31,00684	32,87893
		2	23,32926	30,12119
		3	15,80890	16,60201
	#57	1	19,66737	14,25489
		2	9,17066	7,04787
		3	10,16974	11,98822
sen	#61	1	35,14218	40,85075
		2	43,49459	40,56350
		3	24,76196	28,28496
	#62	1	45,80127	52,68162
		2	59,14960	61,13124
		3	36,23552	39,41682
	#60	1	39,94293	40,25492
		2	66,81575	81,44591
		3	40,89247	45,76950

Tabelle A.15 Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein, sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I als Bestandteil des Superkomplexes c (I₁III₂IV₂) auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

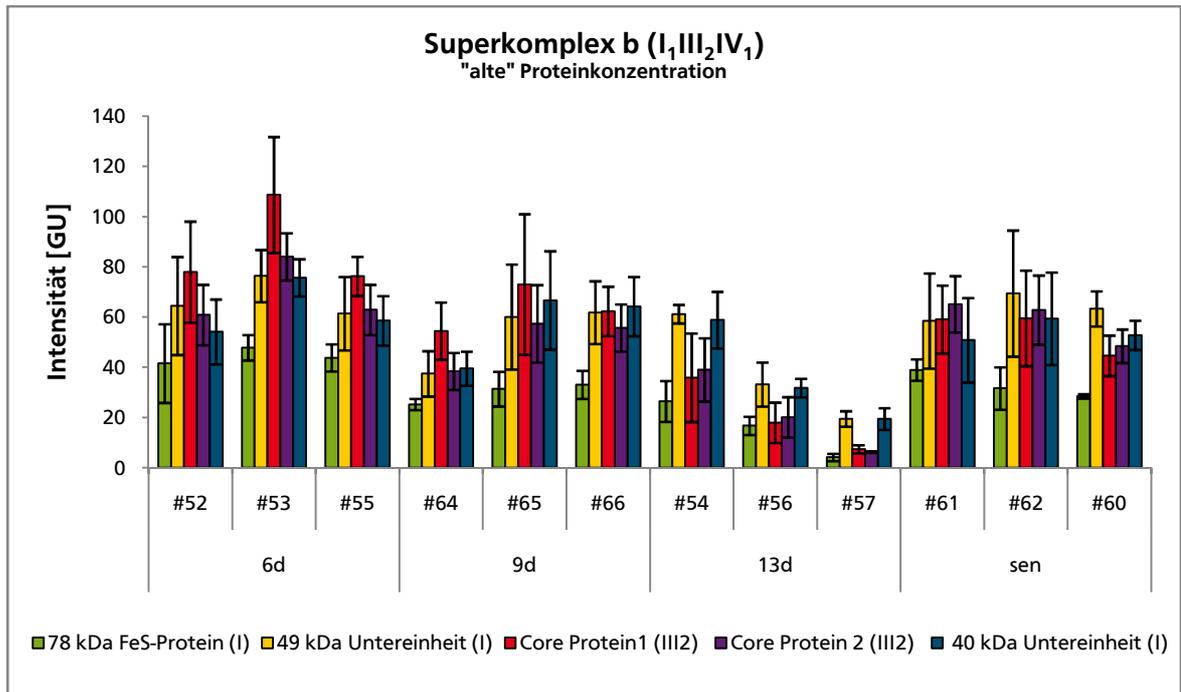
Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]		
			78 kDa FeS-Protein	49 kDa Untereinheit	40 kDa Untereinheit
6d	#52	1	1,31528	8,47008	4,89180
		2	3,84038	5,46864	5,31771
		3	7,04918	9,03349	7,44871
	#53	1	10,37644	14,59107	9,09923
		2	9,98674	19,85673	12,12505
		3	4,72744	6,55229	6,07039
	#55	1	9,60928	10,06271	11,86345
		2	4,88341	8,64088	7,63854
		3	8,56399	9,21997	7,62512
9d	#64	1	4,78079	11,59805	7,32848
		2	6,87889	7,86700	7,97140
		3	4,38563	10,62725	5,23380
	#65	1	4,57507	9,98758	8,51638
		2	4,10636	12,39503	9,72483
		3	7,74360	10,72102	11,56861
	#66	1	3,40362	9,73405	5,71400
		2	11,41056	19,49238	18,56222
		3	11,34321	18,59844	16,13043
13d	#54	1	4,57111	12,73013	8,26004
		2	3,25711	6,90440	7,43467
		3	4,22397	10,57255	7,02773
	#56	1	2,73802	4,67286	3,37516
		2	3,01146	2,99489	4,45736
		3	1,57755	4,19913	3,42390
	#57	1	0,88176	4,63510	3,31780
		2	0,42129	2,18018	1,37810
		3	0,28080	2,61318	1,15172
sen	#61	1	1,53610	5,27118	5,63091
		2	2,67770	7,42773	3,91423
		3	1,49052	6,41364	4,08701
	#62	1	2,15135	6,37739	4,44306
		2	3,47958	13,04787	6,85583
		3	2,98950	10,81953	7,44089
	#60	1	10,29120	10,86726	7,10617
		2	16,23339	18,21260	15,26004
		3	7,37313	13,32113	8,27451

Tabelle A.16 Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des Komplex III Homodimers (III₂) als Bestandteil des Superkomplexes c (I₁III₂IV₂) auf allen 36 2D-BN/SDS-Gelen von *P. anserina* in GU; vor jeglicher Normierung.

Alter	Kulturnummer	Gelreplikat	Intensität [GU]	
			Core Protein 1	Core Protein 2
6d	#52	1	16,07617	8,62554
		2	12,37952	9,40339
		3	18,60819	13,28568
	#53	1	21,80171	14,57684
		2	22,32480	14,45345
		3	12,20995	10,25745
	#55	1	30,02206	17,32200
		2	12,82470	8,19155
		3	13,82246	12,79100
9d	#64	1	12,60984	8,52296
		2	15,37604	8,80644
		3	17,52915	6,65064
	#65	1	19,13440	13,19680
		2	21,45643	8,86213
		3	18,25925	10,80491
	#66	1	10,62110	4,51000
		2	21,19324	10,69509
		3	31,58476	14,09583
13d	#54	1	4,93748	4,53654
		2	4,78350	4,72377
		3	4,97053	4,08893
	#56	1	2,14150	2,59512
		2	2,41993	1,71249
		3	2,01434	1,54965
	#57	1	2,53819	0,87239
		2	0,98540	0,45725
		3	1,50501	0,67750
sen	#61	1	7,14339	6,23200
		2	6,94197	5,78946
		3	3,65757	1,96797
	#62	1	9,37723	7,95921
		2	10,42618	8,23684
		3	7,98849	6,14586
	#60	1	13,38610	9,93745
		2	26,62300	17,61263
		3	16,96310	10,99466

Zusätzliche Daten

A



B

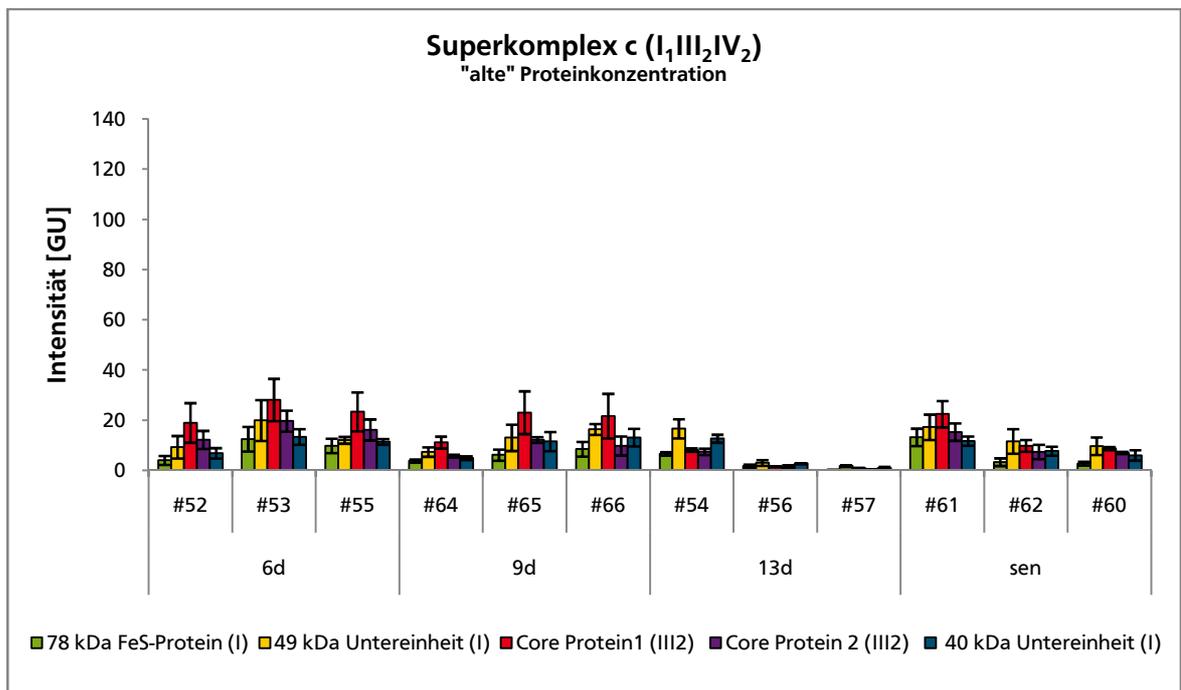
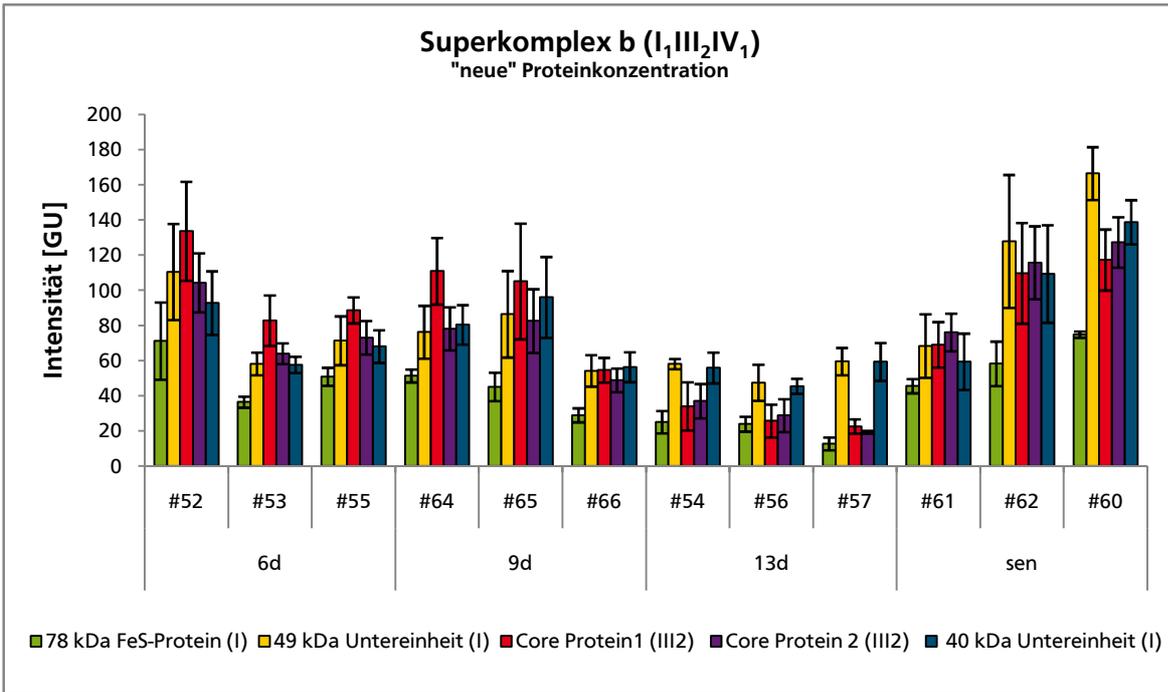


Abbildung A.67 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteil der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) (A) und c ($I_1III_2IV_2$) (B) aller zwölf Proben von *Podospira anserina* in GU, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Bei allen Proben liegt etwa 4-mal so viel Superkomplex b wie c vor, wobei das Verhältnis der beiden Superkomplexe jeweils recht konstant bleibt. Bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen weist stets das Core Protein 1 von Komplex III₂ die höchste Intensität auf, während dies bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben – mit Ausnahme des seneszenten Individuums mit der Kulturnummer #61 – für die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I gilt.

A



B

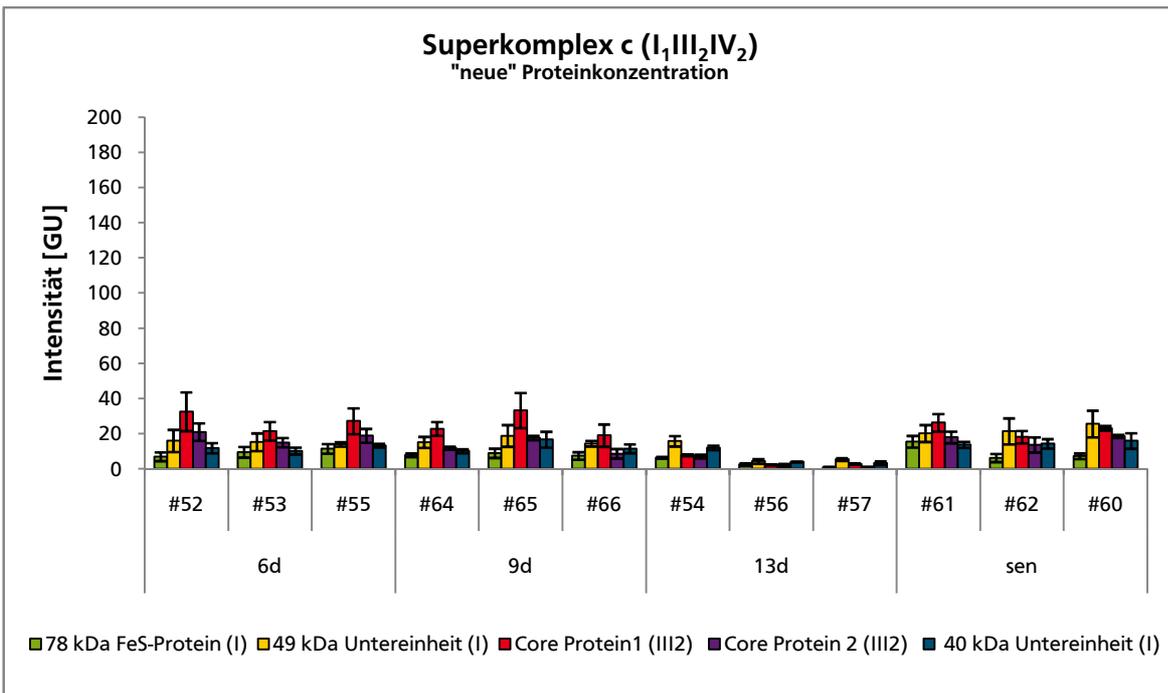
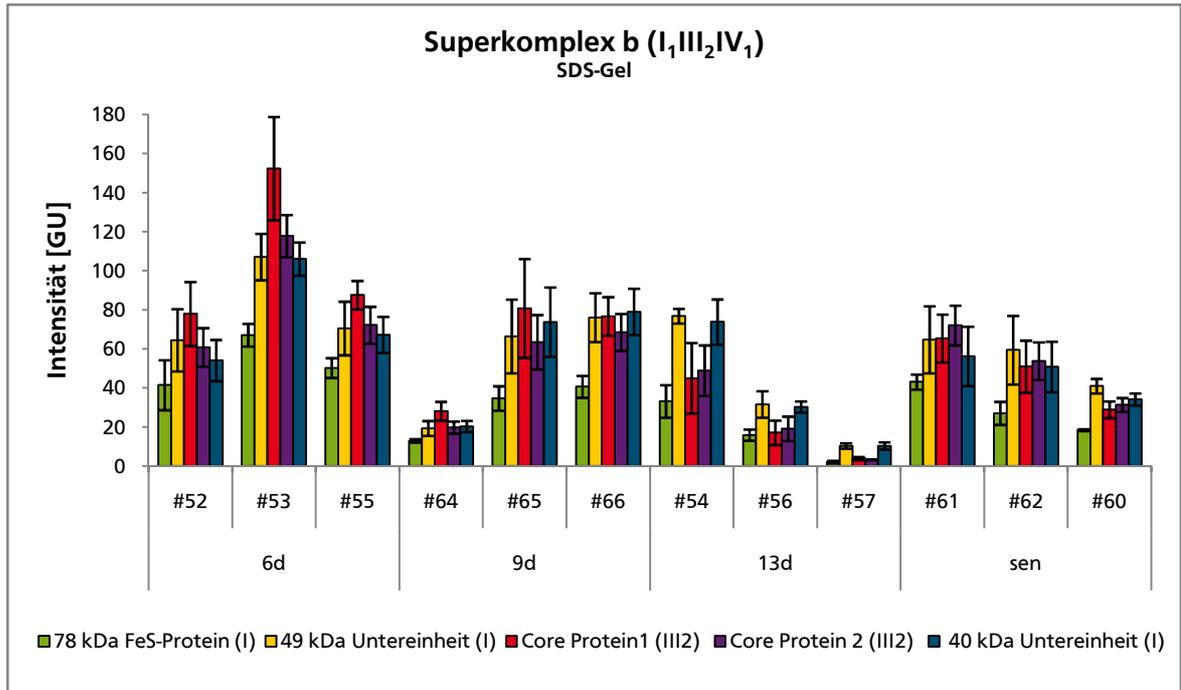


Abbildung A.68 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteil der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) (A) und c (I₁III₂IV₂) (B) aller zwölf Proben von *Podospora anserina* in GU, normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Bei allen Proben liegt etwa 4-mal so viel Superkomplex b wie c vor, wobei das Verhältnis der beiden Superkomplexe jeweils recht konstant bleibt. Bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen weist stets das Core Protein 1 von Komplex III₂ die höchste Intensität auf, während dies bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben – mit Ausnahme des seneszenten Individuums mit der Kulturnummer #61 – für die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I gilt.

A



B

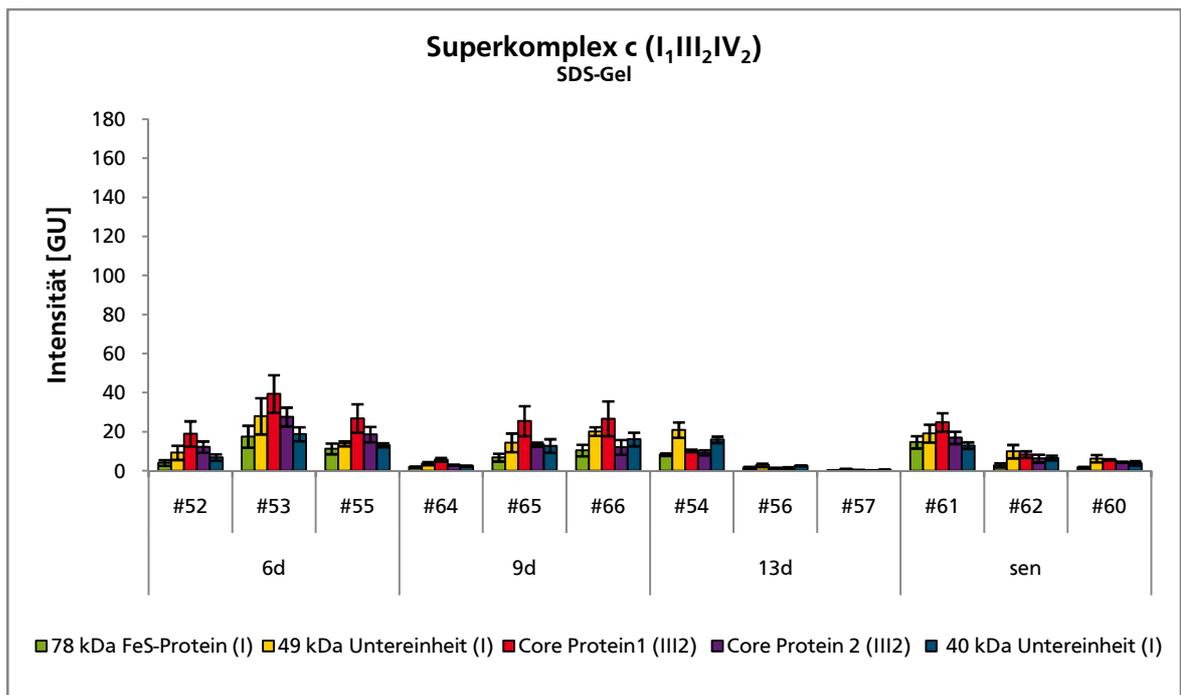
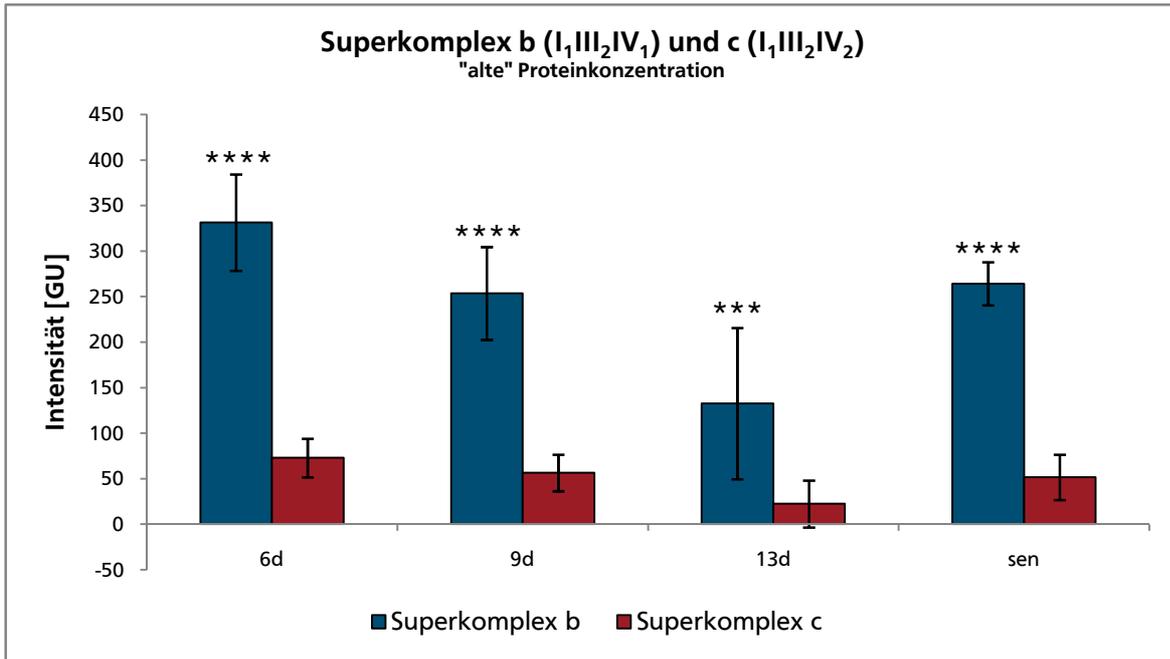


Abbildung A.69 Altersabhängige Intensitäten des 78 kDa FeS-Proteins sowie der 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I und des Core Proteins 1 und 2 von Komplex III₂ als Bestandteil der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) (A) und c (I₁III₂IV₂) (B) aller zwölf Proben von *Podospira anserina* in GU, normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter und die Kulturnummer des *P. anserina* Individuums an. Bei allen Proben liegt etwa 4-mal so viel Superkomplex b wie c vor, wobei das Verhältnis der beiden Superkomplexe jeweils recht konstant bleibt. Bei den 6 und 9 Tage alten Kulturen weist stets das Core Protein 1 von Komplex III₂ die höchste Intensität auf, während dies bei den 13 Tage alten und seneszenten Proben – mit Ausnahme des seneszenten Individuums mit der Kulturnummer #61 – für die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit von Komplex I gilt.

A



B

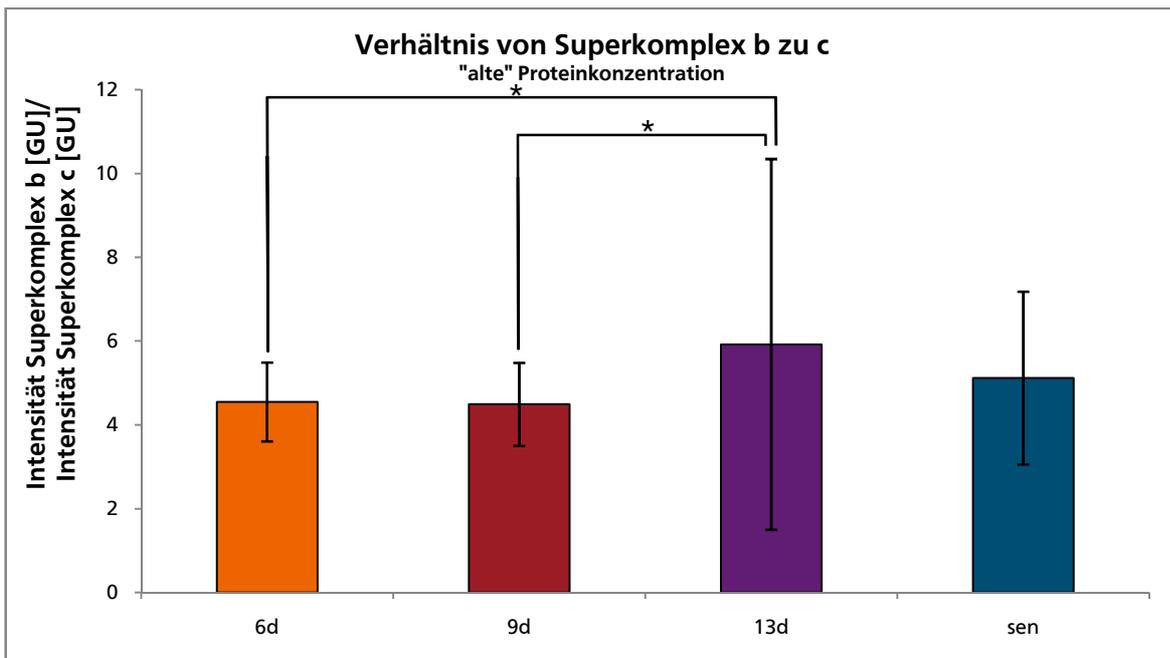
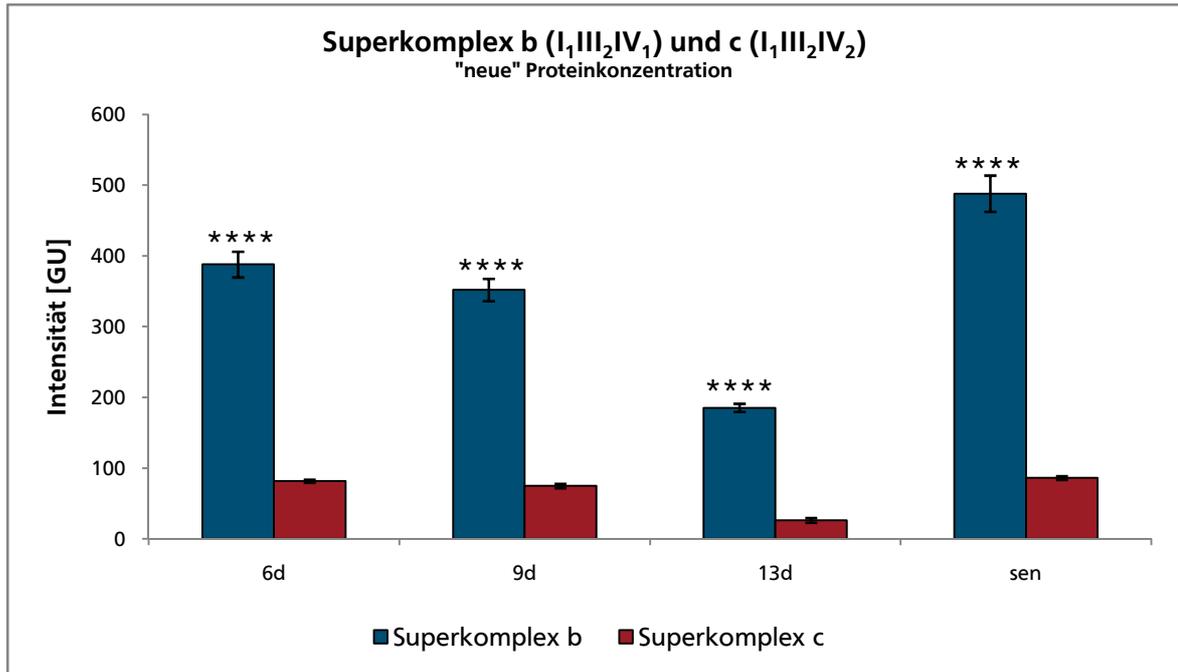


Abbildung A.70 Altersabhängige Veränderung der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) im Vergleich (A) und Altersabhängigkeit des Verhältnisses der Intensitäten von Superkomplex b und c (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Die Intensitäten für die fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 wurden addiert und die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe gemittelt. Bei allen Altersstufen liegt deutlich mehr Superkomplex b als c vor und der Unterschied der aufsummierten Intensitäten ist dabei innerhalb einer Gruppe stets statistisch signifikant (6d, 9d, sen: $p < 0,001$; 13d: $p < 0,005$). Die 6 Tage alten Kulturen scheinen insgesamt am meisten und die 13 Tage alten Proben am wenigsten Superkomplexe zu besitzen. Die 9 Tage alten und seneszenten Kulturen besitzen in etwa die gleiche Menge. (B) Verhältnis der Intensitäten von Superkomplex b zu c bei den vier Altersstufen. Gezeigt ist der Mittelwert für die drei Individuen pro Altersstufe, die Werte basieren auf der Summe der fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 . Es zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Verhältnisses von Superkomplex b zu c um 30% bzw. 32% von den 6 bzw. 9 Tage alten zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0380$ bzw. $0,0243$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

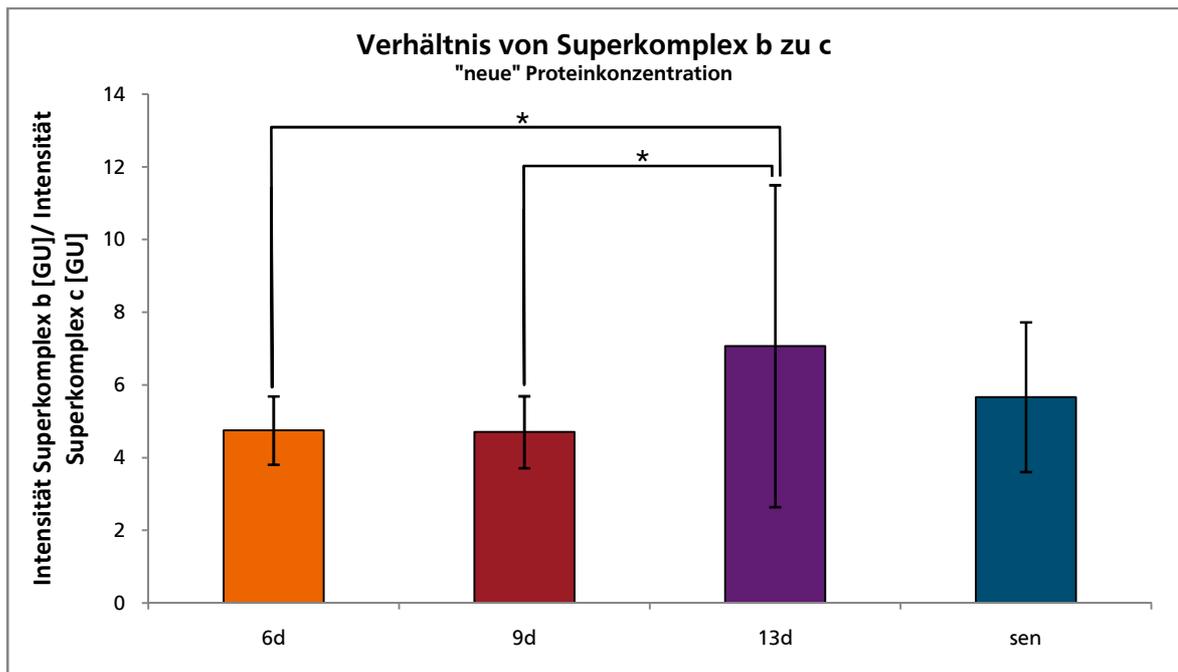
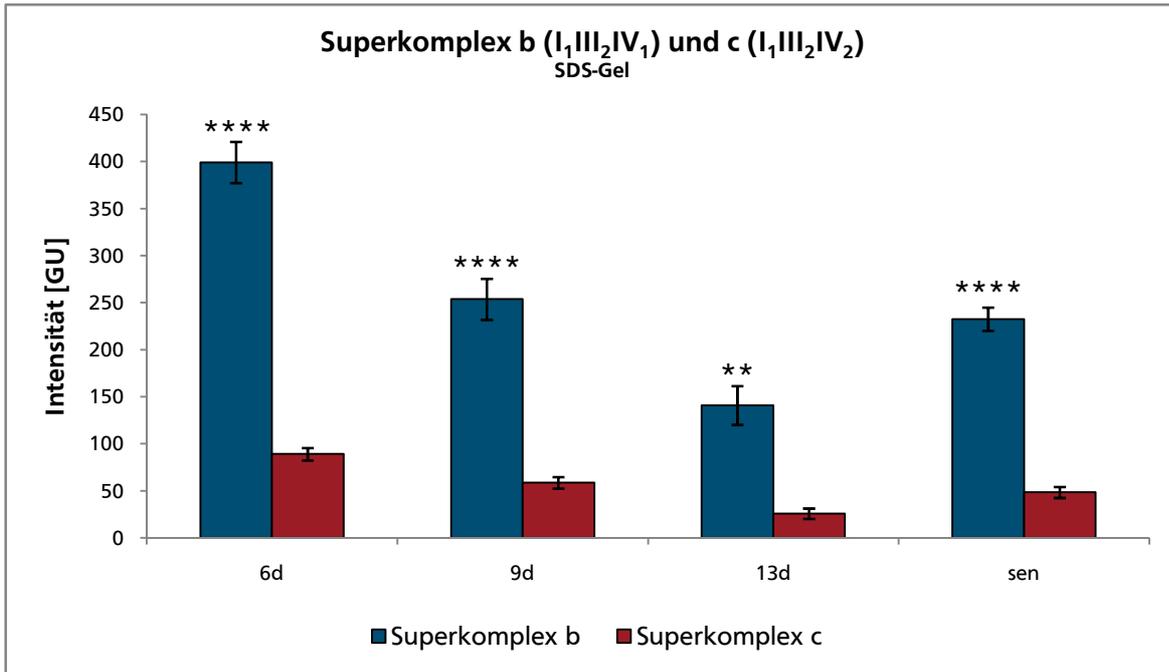


Abbildung A.71 Altersabhängige Veränderung der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) im Vergleich (A) und Altersabhängigkeit des Verhältnisses der Intensitäten von Superkomplex b und c (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Die Intensitäten für die fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III₂ wurden addiert und die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe gemittelt. Bei allen Altersstufen liegt deutlich mehr Superkomplex b als c vor und der Unterschied der aufsummierten Intensitäten ist dabei innerhalb einer Gruppe stets statistisch signifikant ($p < 0,001$). Erstaunlicherweise scheinen hier die seneszenten Kulturen am meisten Superkomplexe zu besitzen. (B) Verhältnis der Intensitäten von Superkomplex b zu c bei den vier Altersstufen. Gezeigt ist der Mittelwert für die drei Individuen pro Altersstufe, die Werte basieren auf der Summe der fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III₂. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Verhältnisses von Superkomplex b zu c um 49% bzw. 50% von den 6 bzw. 9 Tage alten zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0380$ bzw. $0,0243$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

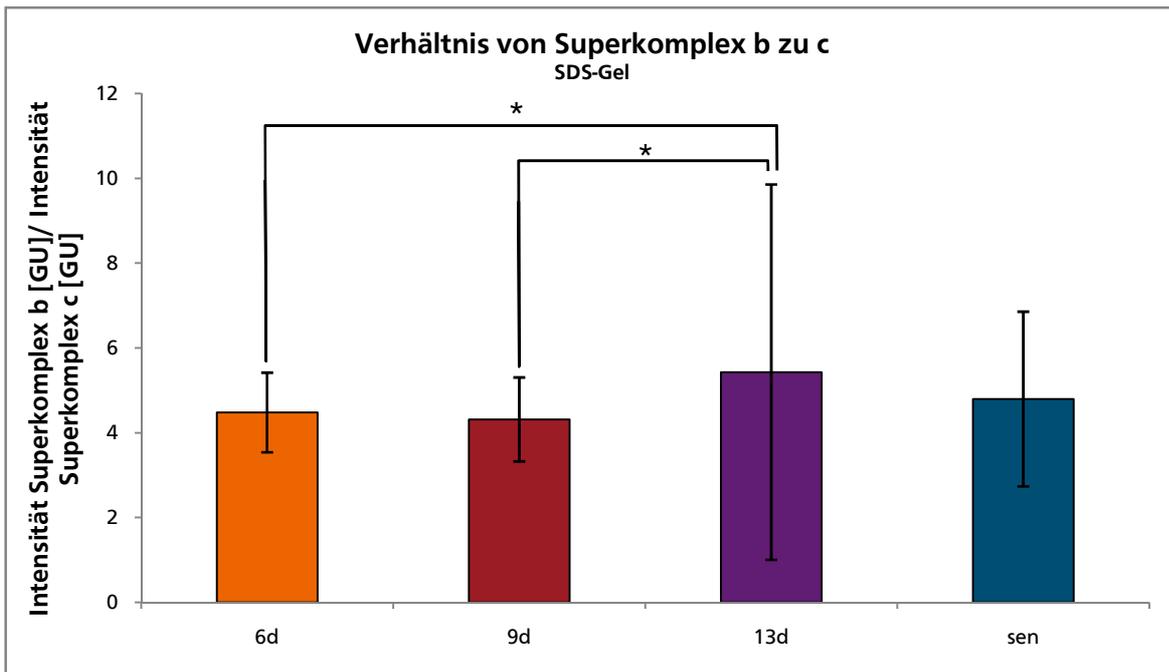


Abbildung A.72 Altersabhängige Veränderung der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) im Vergleich (A) und Altersabhängigkeit des Verhältnisses der Intensitäten von Superkomplex b und c (B), normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospira anserina* Individuen an. (A) Die Intensitäten für die fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 wurden addiert und die Werte für die drei Individuen pro Altersstufe gemittelt. Bei allen Altersstufen liegt deutlich mehr Superkomplex b als c vor und der Unterschied der aufsummierten Intensitäten ist dabei innerhalb einer Gruppe stets statistisch signifikant (6d, 9d, sen: $p < 0,001$; 13d: $p < 0,01$). Erstaunlicherweise scheinen hier die seneszenten Kulturen am meisten Superkomplexe zu besitzen. (B) Verhältnis der Intensitäten von Superkomplex b zu c bei den vier Altersstufen. Gezeigt ist der Mittelwert für die drei Individuen pro Altersstufe, die Werte basieren auf der Summe der fünf betrachteten Untereinheiten von Komplex I bzw. III_2 . Es zeigt sich eine statistisch signifikante Zunahme des Verhältnisses von Superkomplex b zu c um 21% bzw. 26% von den 6 bzw. 9 Tage alten zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0380$ bzw. $0,0243$). (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

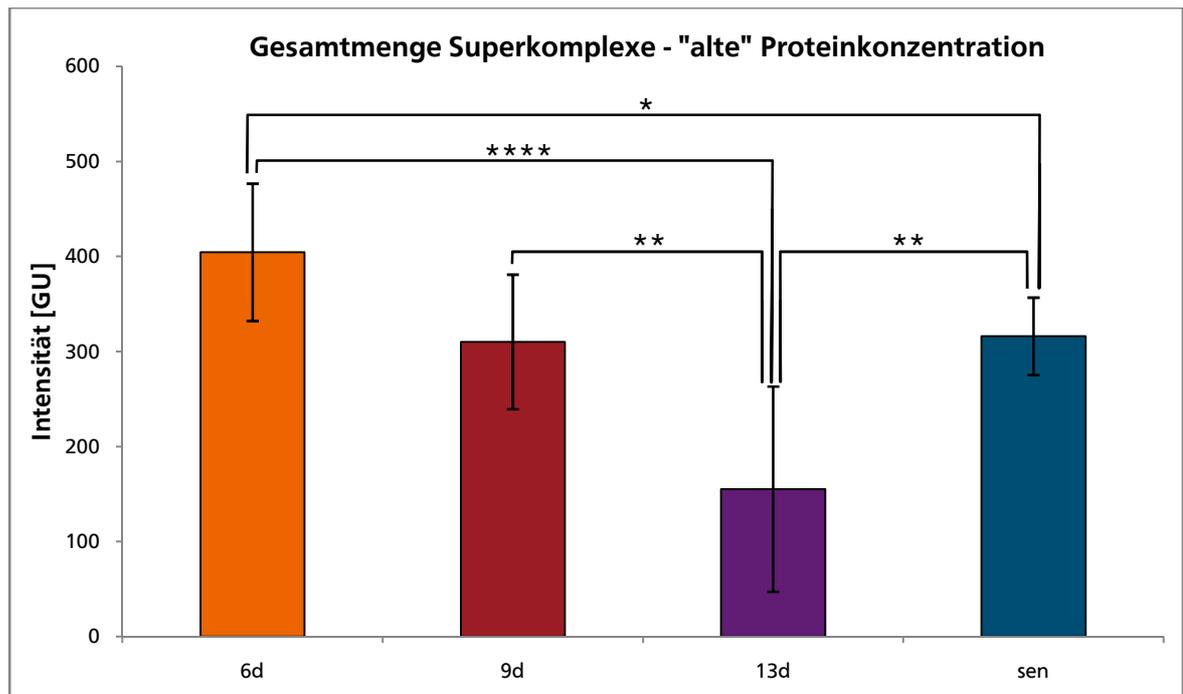


Abbildung A.73 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an Superkomplexen, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Superkomplex b ($I_{1III_2IV_1}$) und c ($I_{1III_2IV_2}$), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Die 6 Tage alten Kulturen besitzen am meisten Superkomplexe und es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme zu den 13 Tage alten (-62%, $p = 0,0007$) und seneszenten (-22%, $p = 0,0305$) Proben sowie von den 9 zu den 13 alten Kulturen (-50%, $p = 0,0071$). Am wenigsten Superkomplexe besitzen die 13 Tage alten Kulturen. Anschließend erfolgt ein statistisch signifikanter Anstieg um 104% ($p = 0,0054$), so dass die seneszenten nach den 6 Tage alten Kulturen am zweitmeisten Superkomplexe besitzen. Damit führen die seneszenten Kulturen einmal mehr den Trend einer altersabhängigen Abnahme nicht fort, was höchstwahrscheinlich auf ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen ist, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den 6, 9 und 13 Tage alten Proben gegeben ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

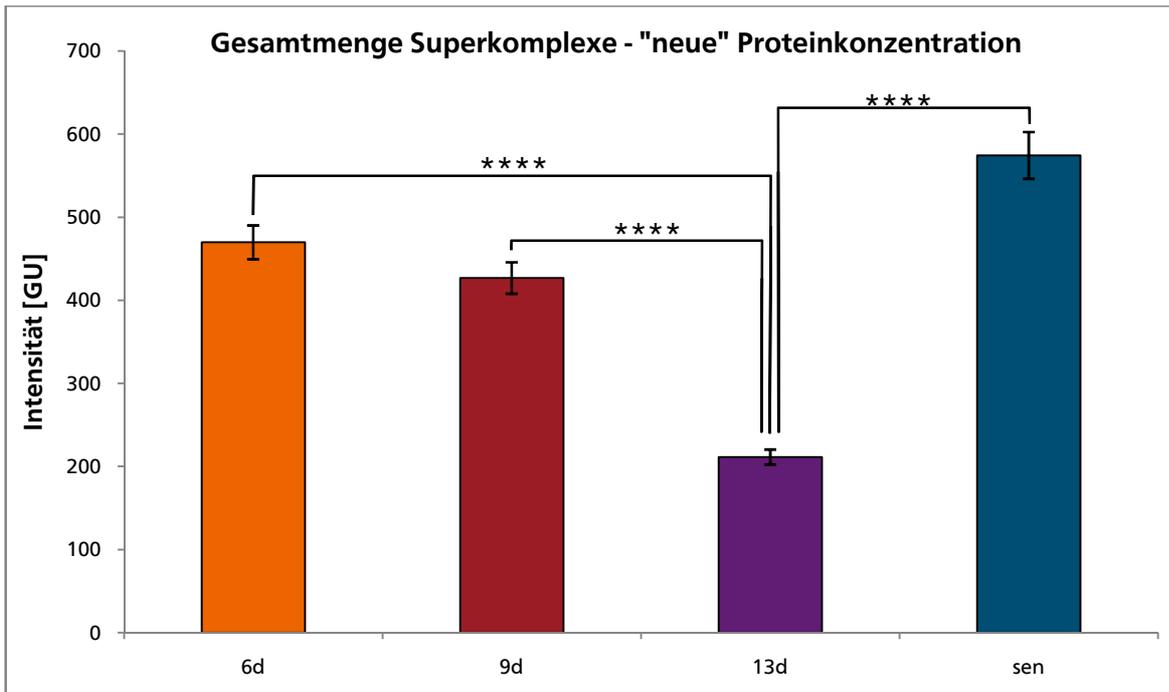


Abbildung A.74 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an Superkomplexen, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Superkomplex b ($I_{1III_2IV_1}$) und c ($I_{1III_2IV_2}$), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme von den 6 (-55%, $p = 0,0003$) und 9 Tage alten (-50%, $p = 0,0009$) zu den 13 alten Kulturen. Allerdings besitzen die seneszenten Proben am meisten Superkomplexe, so dass von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen ein statistisch signifikanter Anstieg um 172% ($p = 0,0003$) zu verzeichnen ist. Damit führen die seneszenten Kulturen einmal mehr den Trend einer altersabhängigen Abnahme nicht fort, was höchstwahrscheinlich auf ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen ist, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den 6, 9 und 13 Tage alten Proben gegeben ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

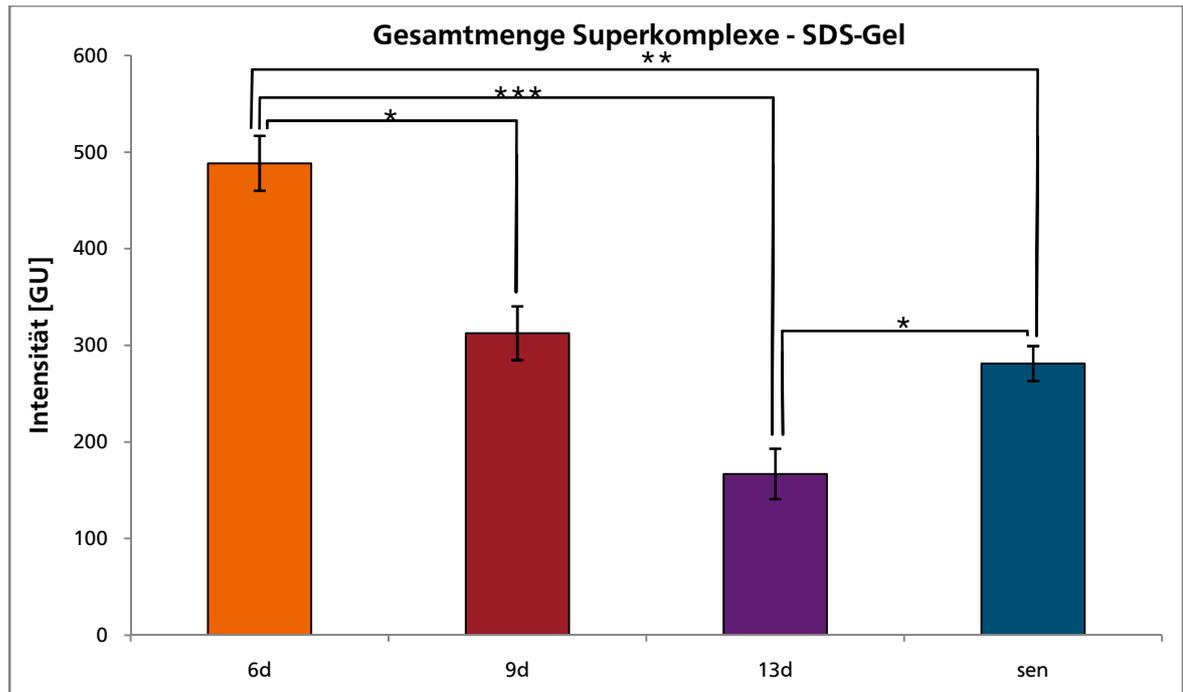
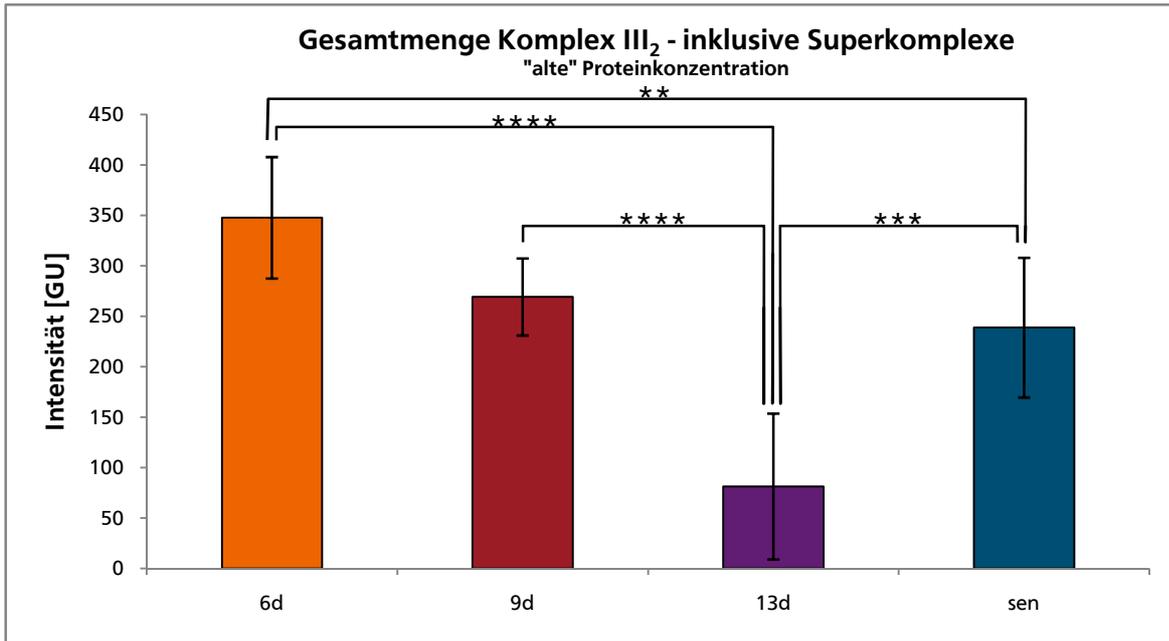


Abbildung A.75 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge an Superkomplexen, gewonnen aus der Summe der Intensitäten von Superkomplex b ($I_{1III_2IV_1}$) und c ($I_{1III_2IV_2}$), normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. Die 6 Tage alten Kulturen besitzen am meisten Superkomplexe und es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme zu den 9 (-36%, $p = 0,0469$) und 13 Tage alten (-66%, $p = 0,0017$) sowie seneszenten (-42%, $p = 0,0092$) Proben. Am wenigsten Superkomplexe besitzen die 13 Tage alten Kulturen. Anschließend erfolgt ein statistisch signifikanter Anstieg um 68% ($p = 0,0469$), so dass die seneszenten Kulturen fast die gleiche Menge Superkomplexe besitzen wie die 9 Tage alten Proben. Damit führen die seneszenten Kulturen einmal mehr den Trend einer altersabhängigen Abnahme nicht fort, was höchstwahrscheinlich auf ihre andersartige Gewinnung (siehe hierzu Abschnitt 3.5.1) zurückzuführen ist, wodurch keine direkte Vergleichbarkeit mit den 6, 9 und 13 Tage alten Proben gegeben ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

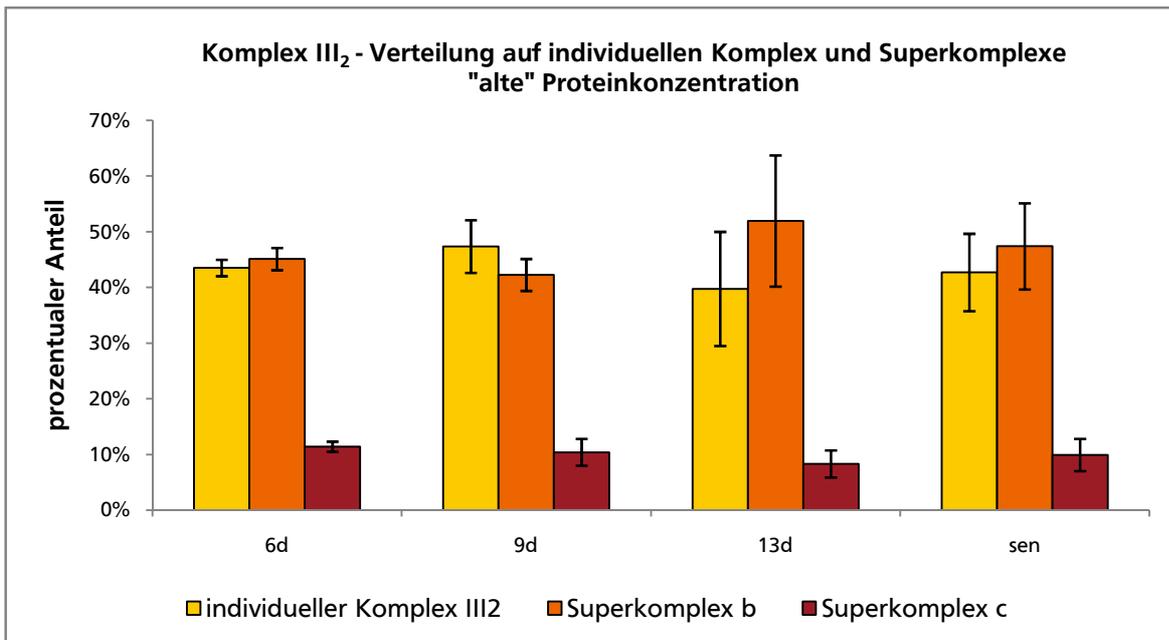
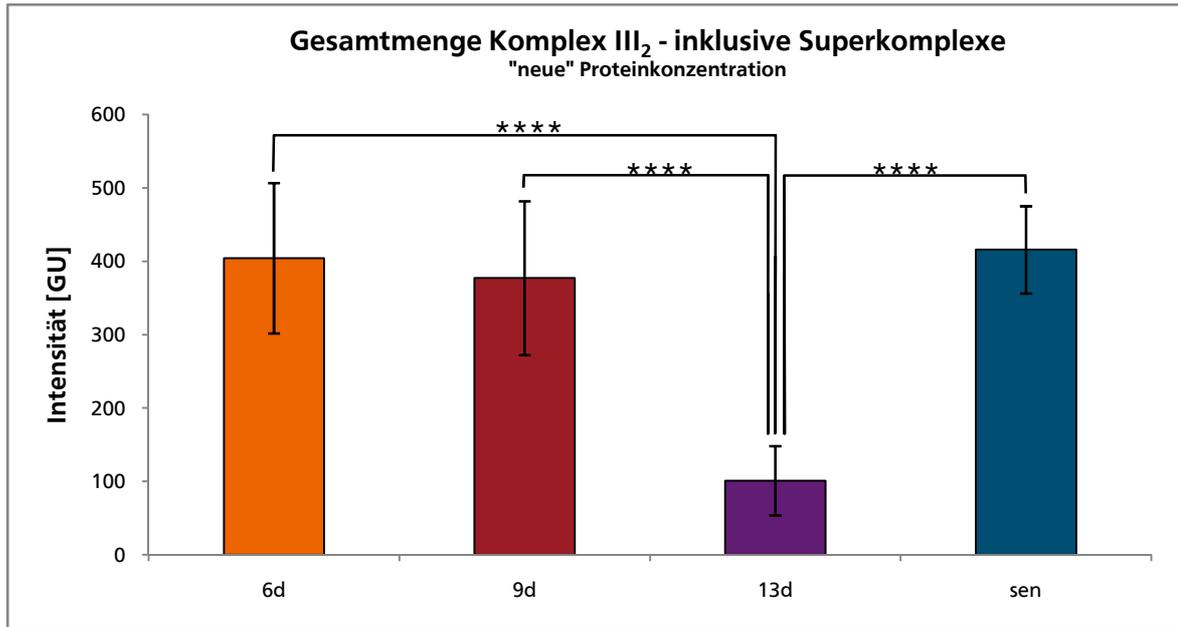


Abbildung A.76 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex III₂, bestehend aus der Summe der Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer sowie Superkomplex b und c (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge sowohl von den 6 zu den 13 Tage alten (-77%, p = 0,0003) als auch von den 6 Tage alten zu den seneszenten Kulturen (-31%, p = 0,0092). Von den 9 zu den 13 Tage alten Proben kann eine 70%-ige Abnahme (p = 0,0003) festgestellt werden; von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen nimmt die Gesamtmenge von Komplex III₂ wieder um 194% zu (p = 0,0013). (B) Es zeigt sich kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung von Komplex III₂ mit dem Alter. Im Mittel liegen 43% von Komplex III₂ als individuelles Homodimer, 47% in Superkomplex b und 10% in Superkomplex c vor. Bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen zeigt sich jedoch eine leichte Verschiebung zugunsten von Superkomplex b. Während bei den 6 und 9 Tage alten Proben nahezu der gleiche Prozentsatz von Komplex III₂ in Form von individuellem Komplex und Superkomplex b vorliegt, verzeichnet der Superkomplex bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen im Mittel 9 Prozentpunkte mehr als individueller Komplex III₂. (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,005; **** p < 0,001)

A



B

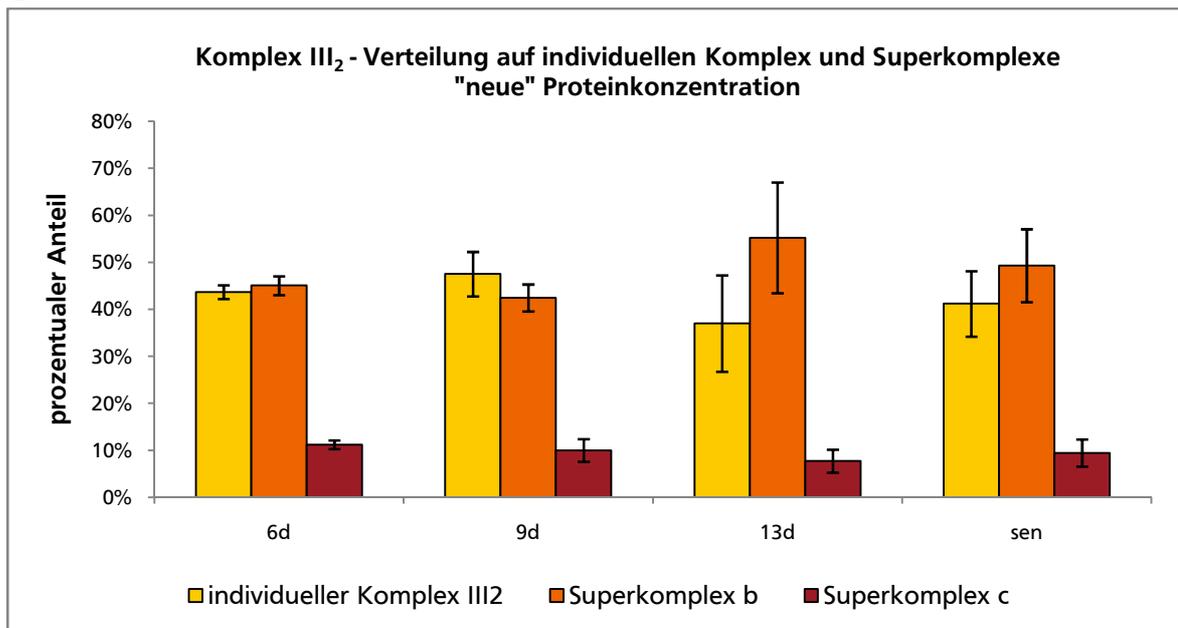
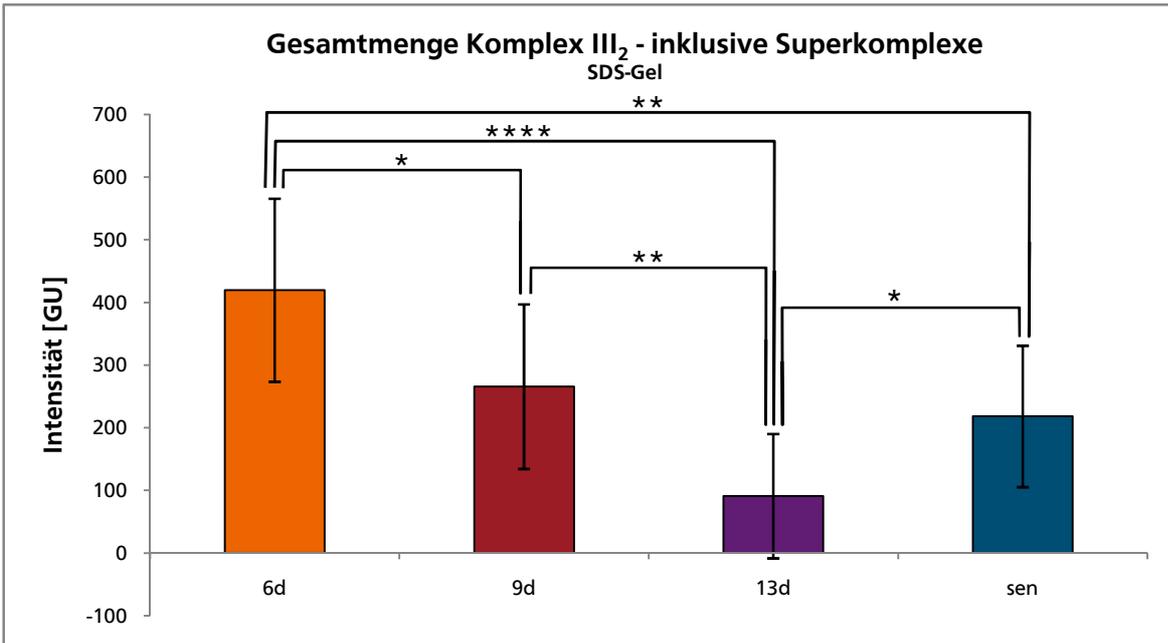


Abbildung A.77 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex III₂, bestehend aus der Summe der Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer Superkomplex b und c (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge von den 6 zu den 13 Tage alten (-75%, p = 0,0003) sowie von den 9 zu den 13 Tage alten Proben (-73%, p = 0,0003), wobei die 6 und 9 Tage alten Kulturen nahezu die gleiche Menge an Komplex III₂ besitzen. Von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen nimmt die Gesamtmenge von Komplex III₂ wieder um 311% zu (p = 0,0003), so dass die seneszenten Kulturen ebenfalls in etwa die gleiche Komplex III₂ Menge aufweisen wie die 6 und 9 Tage alten Proben. (B) Im Mittel liegen 42% von Komplex III₂ als individuelles Homodimer, 48% in Superkomplex b und 10% in Superkomplex c vor. Bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen zeigt sich eine Verschiebung zugunsten von Superkomplex b. Während bei den 6 und 9 Tage alten Proben nahezu der gleiche Prozentsatz von Komplex III₂ in Form von individuellem Komplex und Superkomplex b vorliegt, verzeichnet der Superkomplex bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen im Mittel 13 Prozentpunkte mehr als individueller Komplex III₂. (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,005, **** p < 0,001)

A



B

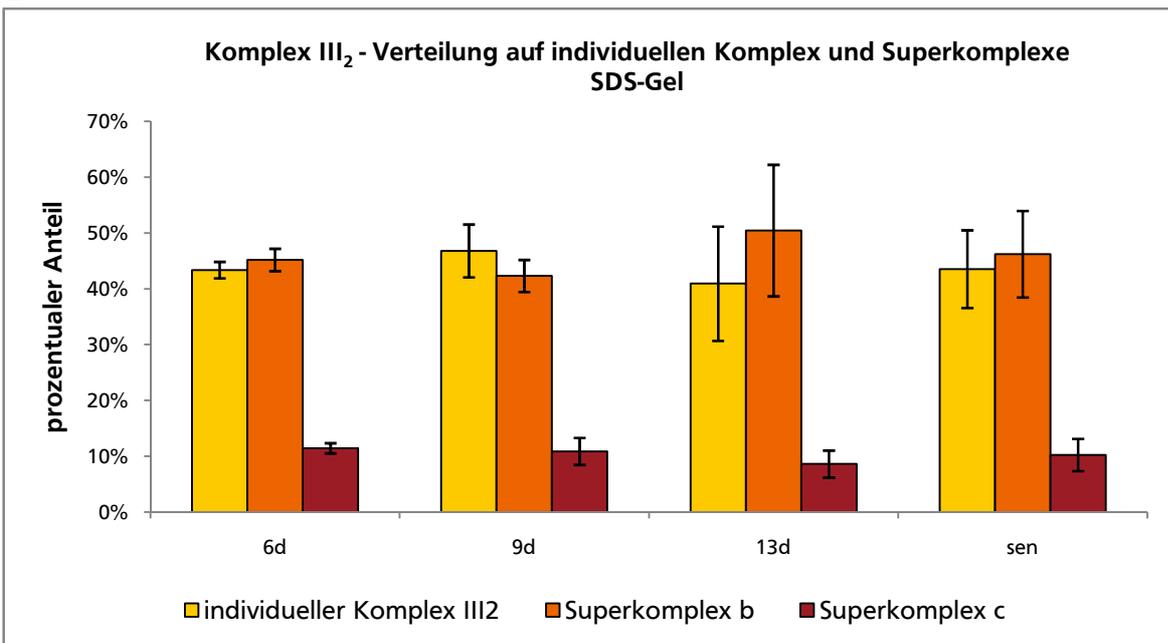
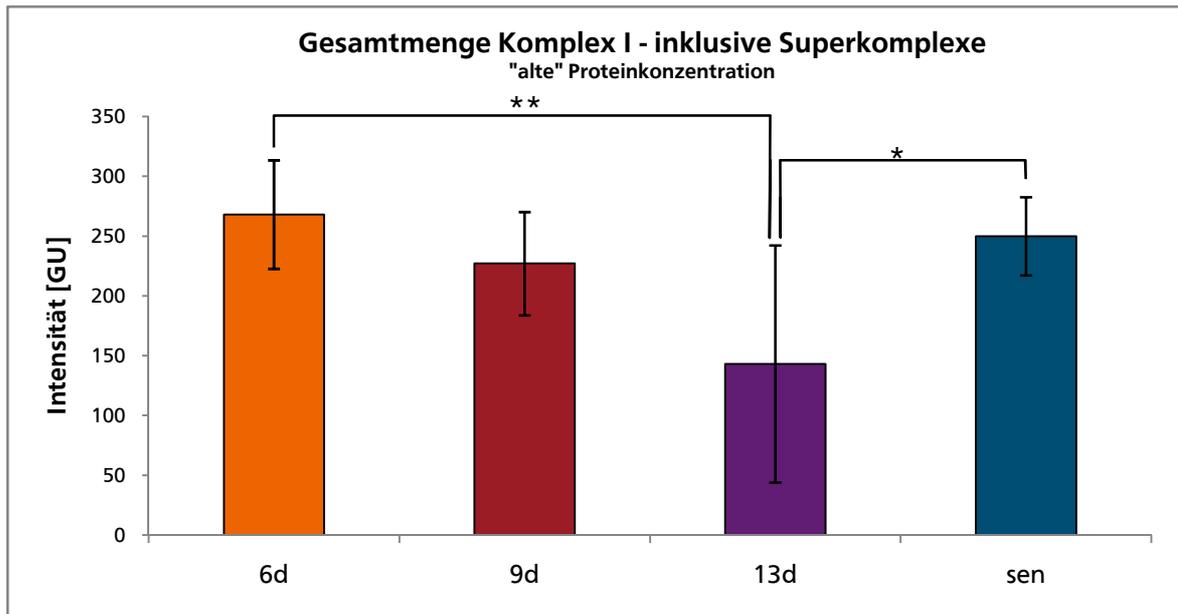


Abbildung A.78 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex III₂, bestehend aus der Summe der Intensitäten für Core Protein 1 und 2 des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex III₂ auf individuelles Homodimer Superkomplex b und c (B), normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex III₂ Menge sowohl von den 6 zu den 9 Tage alten (-37%, p = 0,0380) als auch von den 6 zu den 13 Tage alten (-78%, p = 0,0007) sowie von den 6 Tage alten zu den seneszenten Kulturen (-48%, p = 0,0071). Von den 9 zu den 13 Tage alten Proben kann eine 66%-ige Abnahme (p = 0,0092) festgestellt werden; von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen nimmt die Gesamtmenge von Komplex III₂ wieder um 140% zu (p = 0,0152). (B) Im Mittel liegen 44% von Komplex III₂ als individuelles Homodimer, 46% in Superkomplex b und 10% in Superkomplex c vor. Bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen zeigt sich eine leichte Verschiebung zugunsten von Superkomplex b Während bei den 6 und 9 Tage alten Proben nahezu der gleiche Prozentsatz von Komplex III₂ in Form von individuellem Komplex und Superkomplex b vorliegt, verzeichnet der Superkomplex bei den 13 Tage alten und seneszenten Kulturen im Mittel 6 Prozentpunkte mehr als individueller Komplex III₂. (* p < 0,05; ** p < 0,01, *** p < 0,005, **** p < 0,001)

A



B

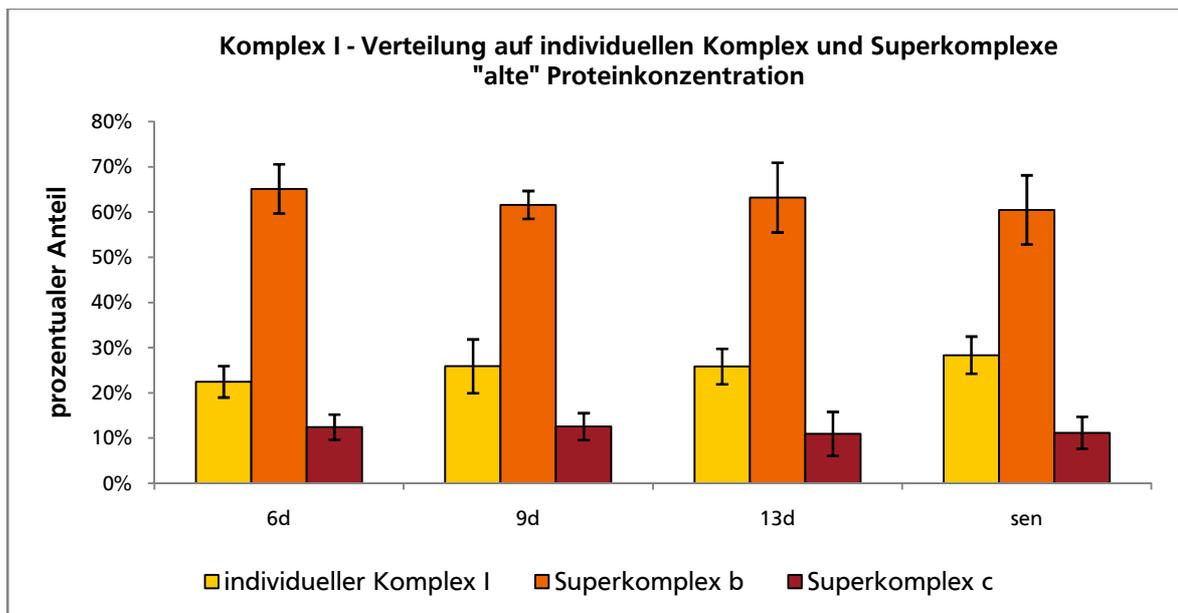
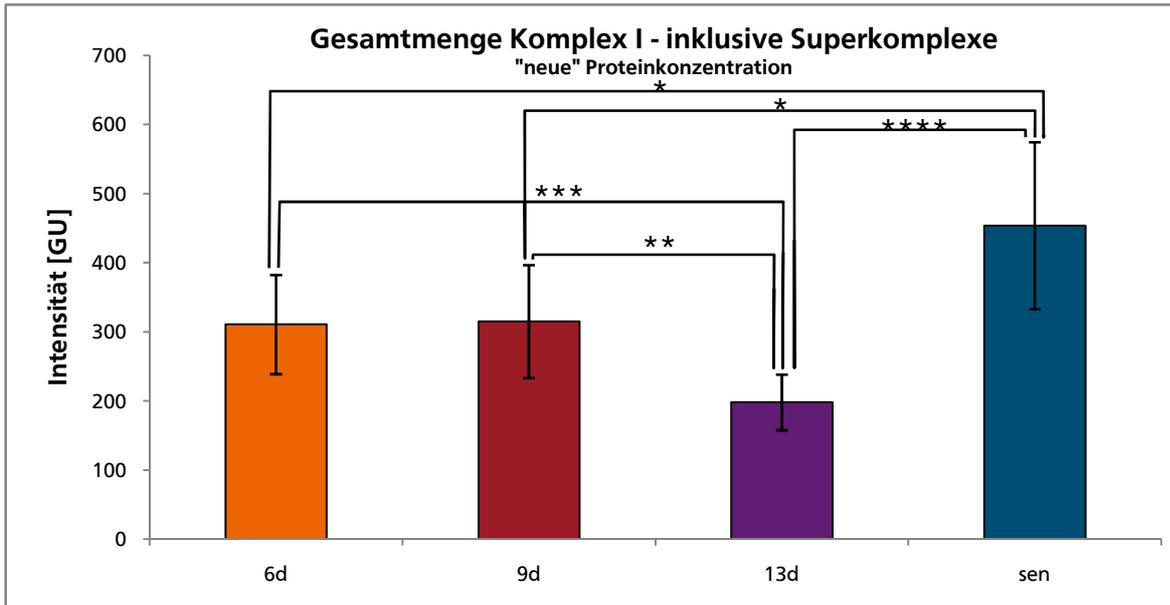


Abbildung A.79 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex I, bestehend aus der Summe der Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex, Superkomplex b und c (B), normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex I Menge um 47% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0054$) sowie eine ebenfalls statistisch signifikante Zunahme um 75% von den 13 Tage alten zu den seneszenten Kulturen ($p = 0,0243$). Somit liegt bei den seneszenten Kulturen fast die gleiche Gesamtmenge von Komplex I vor wie bei den 6 Tage alten. (B) Es zeigt sich kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung von Komplex I mit dem Alter. Im Mittel liegen 26% von Komplex I als individueller Komplex, 62% in Superkomplex b und 12% in Superkomplex c vor. Wie bei Komplex III_2 liegt auch bei Komplex I der geringste Prozentsatz als Superkomplex c vor. Anders als bei Komplex III_2 verteilen sich die restlichen Prozente jedoch nicht nahezu gleich auf individuellen Komplex und Superkomplex b, sondern letzterer enthält mit im Mittel 62% den Großteil der Gesamtmenge an Komplex I. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen kann man bei den älteren Proben einen leichten Anstieg des Prozentsatzes von individuellem Komplex I von 22% bei den 6 Tage alten auf im Mittel 27% bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben feststellen, der jedoch nicht statistisch signifikant ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

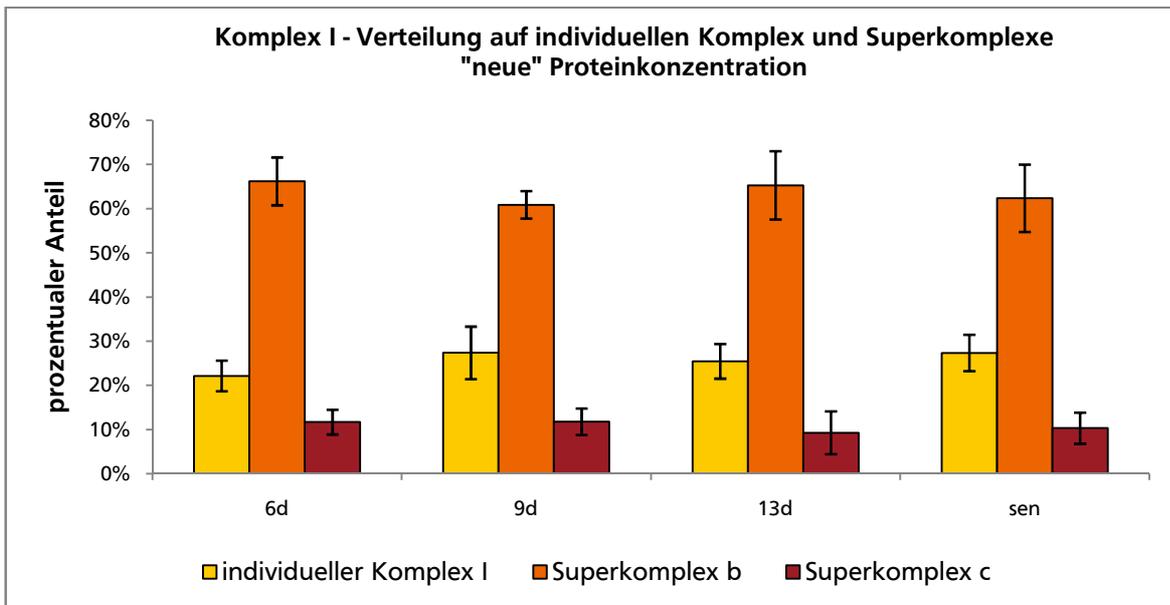
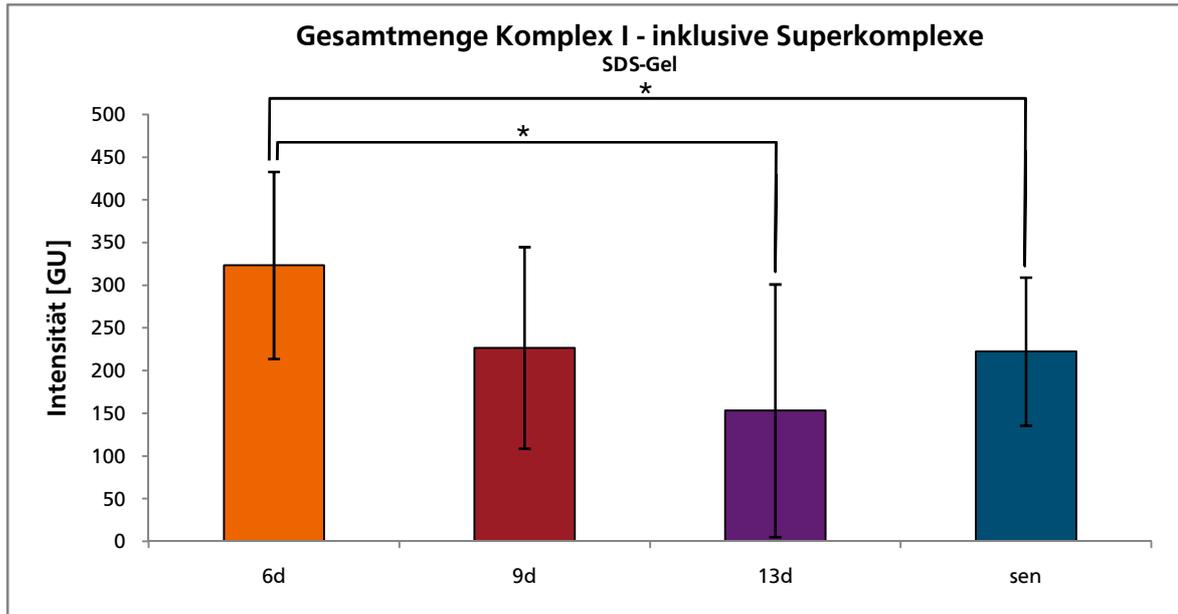


Abbildung A.80 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex I, bestehend aus der Summe der Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex, Superkomplex b und c (B), normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Die 6 und 9 Tage alten Kulturen besitzen nahezu die gleiche Gesamtmenge an Komplex I. Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex I Menge um 36% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0031$) sowie um 37% von den 9 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0054$). Die seneszenten Proben besitzen am meisten Komplex I (6d:sen +46%, $p = 0,0243$; 9d:sen +44%, $p = 0,0305$; 13d:sen +129%, $p = 0,0005$). (B) Im Mittel liegen 25% von Komplex I als individueller Komplex, 64% in Superkomplex b und 11% in Superkomplex c vor. Wie bei Komplex III₂ liegt auch bei Komplex I der geringste Prozentsatz als Superkomplex c vor. Die restlichen Procente verteilen sich jedoch nicht nahezu gleich auf individuellen Komplex und Superkomplex b, sondern letzterer enthält mit im Mittel 64% den Großteil der Gesamtmenge an Komplex I. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen kann man bei den älteren Proben einen leichten Anstieg des Prozentsatzes von individuellem Komplex I von 22% bei den 6 Tage alten auf im Mittel 27% bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben feststellen, der jedoch nicht statistisch signifikant ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

A



B

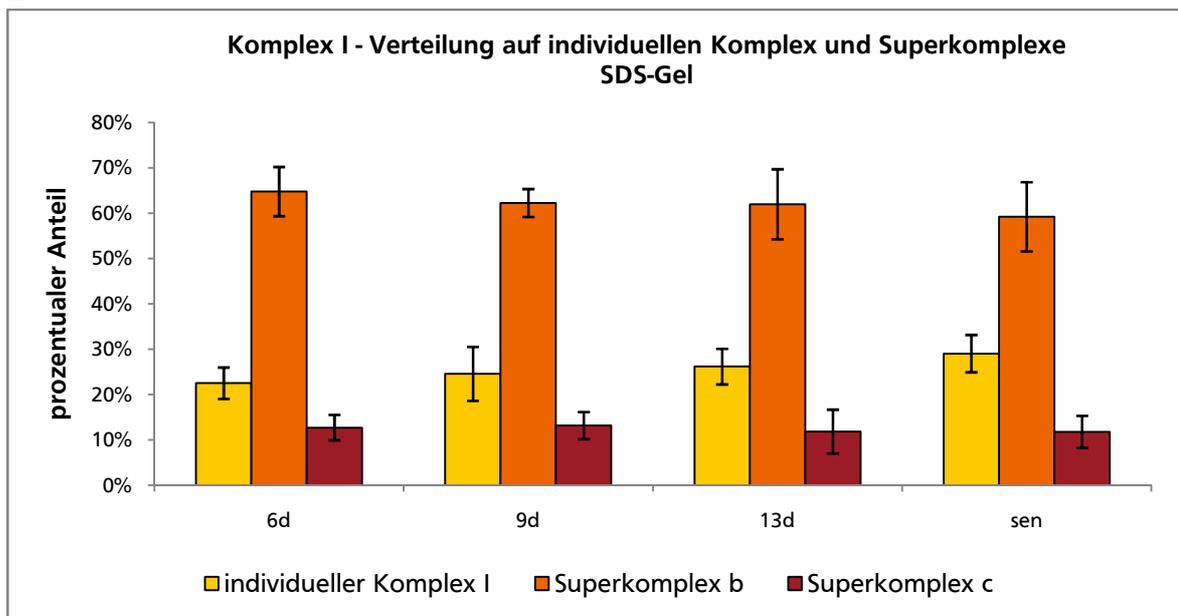


Abbildung A.81 Altersabhängige Veränderung der Gesamtmenge von Komplex I, bestehend aus der Summe der Intensitäten für das 78 kDa FeS-Protein sowie die 49 kDa und 40 kDa Untereinheit des individuellen Komplexes und der Superkomplexe b ($I_1III_2IV_1$) und c ($I_1III_2IV_2$) (A) sowie prozentuale Verteilung von Komplex I auf individuellen Komplex, Superkomplex b und c (B), normiert auf die Gesamtfärbeintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Die x-Achsenbeschriftung gibt jeweils das Alter der *Podospora anserina* Individuen an. (A) Es zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme der Komplex I Menge um 53% von den 6 zu den 13 Tage alten Kulturen ($p = 0,0152$) sowie um 31% von den 6 Tage alten zu den seneszenten Kulturen ($p = 0,0305$) (B) Es zeigt sich kaum eine Veränderung der prozentualen Verteilung von Komplex I mit dem Alter. Im Mittel liegen 26% von Komplex I als individueller Komplex, 62% in Superkomplex b und 12% in Superkomplex c vor. Wie bei Komplex III₂ liegt auch bei Komplex I der geringste Prozentsatz als Superkomplex c vor. Die restlichen Prozente verteilen sich jedoch nicht nahezu gleich auf individuellen Komplex und Superkomplex b, sondern letzterer enthält mit im Mittel 62% den Großteil der Gesamtmenge an Komplex I. Im Vergleich zu den 6 Tage alten Kulturen kann man bei den älteren Proben einen leichten Anstieg des Prozentsatzes von individuellem Komplex I von 23% bei den 6 Tage alten auf im Mittel 27% bei den 9 und 13 Tage alten sowie seneszenten Proben feststellen, der jedoch nicht statistisch signifikant ist. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$, **** $p < 0,001$)

Tabelle A.17 Altersabhängige Veränderungen in der Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung von *Podospora anserina*, ermittelt anhand von SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gelen, normiert auf die „alte“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1). Alle Veränderungen sind in Prozent bezogen auf die jüngste Altersstufe (6 Tage) angegeben. Innerhalb jeder Altersstufe standen drei Individuen zur Verfügung (siehe Tabelle 5.1.1) und es wurden jeweils drei Gelreplikate pro Individuum angefertigt. In der Regel ist eine Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter zu verzeichnen; Zunahmen sind in rot gekennzeichnet. Sämtliche Werte wurden durch Mittelung der drei Gele pro Individuum sowie der drei Individuen pro Altersstufe gewonnen; alle Veränderungen sind unabhängig von ihrer statistischen Signifikanz aufgelistet.

OxPhos		Veränderung bezogen auf die 6 Tage alten Kulturen		
		9 Tage	13 Tage	seneszent
Individuelle Komplexe	Komplex IV	+18%	-40%	+32%
	Komplex III ₂	-16%	-79%	-33%
	Komplex I	-2%	-39%	+18%
Superkomplexe	b (I ₁ III ₂ IV ₁)	-23%	-60%	-20%
	c (I ₁ III ₂ IV ₂)	-23%	-69%	-29%
ATP-Synthase	Monomer	-26%	-53%	-26%
	Dimer	-23%	-60%	-17%
	freier F ₁ -Teil	-15%	-70%	-55%
Gesamtmenge	Komplex III ₂	-23%	-77%	-31%
	Komplex I	-15%	-47%	-7%
	ATP-Synthase	-25%	-56%	-22%
	ATP-Synthase (inkl. F ₁ -Teil)	-25%	-57%	-23%
	Superkomplexe	-23%	-62%	-22%

Tabelle A.18 Altersabhängige Veränderungen in der Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung von *Podospora anserina*, ermittelt anhand von SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gelen, normiert auf die „neue“ Proteinkonzentration (siehe Tabelle 5.1.1, Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Alle Veränderungen sind in Prozent bezogen auf die jüngste Altersstufe (6 Tage) angegeben. Innerhalb jeder Altersstufe standen drei Individuen zur Verfügung (siehe Tabelle 5.1.1) und es wurden jeweils drei Gelreplikate pro Individuum angefertigt. In der Regel ist eine Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter zu verzeichnen; Zunahmen sind in rot gekennzeichnet. Sämtliche Werte wurden durch Mittelung der drei Gele pro Individuum sowie der drei Individuen pro Altersstufe gewonnen; alle Veränderungen sind unabhängig von ihrer statistischen Signifikanz aufgelistet.

OxPhos		Veränderung bezogen auf die 6 Tage alten Kulturen		
		9 Tage	13 Tage	seneszent
Individuelle Komplexe	Komplex IV	+45%	-25%	+111%
	Komplex III ₂	+1%	-79%	-3%
	Komplex I	+25%	-27%	+80%
Superkomplexe	b (I ₁ III ₂ IV ₁)	-9%	-52%	+26%
	c (I ₁ III ₂ IV ₂)	-8%	-68%	+5%
ATP-Synthase	Monomer	-11%	-42%	+16%
	Dimer	-7%	-55%	+31%
	freier F ₁ -Teil	-4%	-68%	-33%
Gesamtmenge	Komplex III ₂	-7%	-75%	+3%
	Komplex I	+1%	-36%	+46%
	ATP-Synthase	-10%	-48%	+23%
	ATP-Synthase (inkl. F ₁ -Teil)	-9%	-48%	+20%
	Superkomplexe	-9%	-55%	+22%

Tabelle A.19 Altersabhängige Veränderungen in der Menge der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung von *Podospora anserina*, ermittelt anhand von SYPRO® Ruby gefärbten 2D-BN/SDS-Gelen, normiert auf die Gesamtfärbintensität in einem Glycin-SDS-Gel (Normierungsfaktoren in Tabelle A.1). Alle Veränderungen sind in Prozent bezogen auf die jüngste Altersstufe (6 Tage) angegeben. Innerhalb jeder Altersstufe standen drei Individuen zur Verfügung (siehe Tabelle 5.1.1) und es wurden jeweils drei Gelreplikate pro Individuum angefertigt. In der Regel ist eine Abnahme der Komplexe und Superkomplexe der oxidativen Phosphorylierung mit dem Alter zu verzeichnen; Zunahmen sind in rot gekennzeichnet. Sämtliche Werte wurden durch Mittelung der drei Gele pro Individuum sowie der drei Individuen pro Altersstufe gewonnen; alle Veränderungen sind unabhängig von ihrer statistischen Signifikanz aufgelistet.

OxPhos		Veränderung bezogen auf die 6 Tage alten Kulturen		
		9 Tage	13 Tage	seneszent
Individuelle Komplexe	Komplex IV	-3%	-49%	-4%
	Komplex III ₂	-32%	-80%	-48%
	Komplex I	-23%	-45%	-11%
Superkomplexe	b (I ₁ III ₂ IV ₁)	-36%	-65%	-42%
	c (I ₁ III ₂ IV ₂)	-34%	-71%	-46%
ATP-Synthase	Monomer	-39%	-59%	-46%
	Dimer	-37%	-64%	-38%
	freier F ₁ -Teil	-27%	-72%	-66%
Gesamtmenge	Komplex III ₂	-37%	-78%	-48%
	Komplex I	-30%	-53%	-31%
	ATP-Synthase	-38%	-61%	-43%
	ATP-Synthase (inkl. F ₁ -Teil)	-38%	-62%	-44%
	Superkomplexe	-36%	-66%	-42%

A.2 Analyse posttranslationaler Modifikationen mittels Massenspektrometrie

A.2.1 Spezifische Oxidation eines Tryptophan-Restes der ATP-Synthase α -Untereinheit von *P. anserina*

Rohdaten

Tabelle A.20 *Spectral Counts* der LC-ESI-MS/MS-Analyse der juvenilen Kulturen #33 und #46 sowie der seneszenten Kulturen #40 und #47 von *Podospora anserina* (vgl. Tabelle 5.1.3) für das Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit in seiner unmodifizierten Form sowie als Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn). Verglichen werden Dimer (V_2) und Monomer (V_1) der ATP-Synthase für zwei technische Replikate.

<i>Spectral Counts</i> ATP-Synthase α -Untereinheit Peptid ILQWEADFLSHLK	Technisches Replikat 1							
	juvenil #33		seneszent #40		juvenil #46		seneszent #47	
	V_2	V_1	V_2	V_1	V_2	V_1	V_2	V_1
unmodifiziert	502	242	53	436	584	664	325	689
TrpOH	27	0	0	26	31	25	30	17
NFKyn	52	4	0	57	54	61	59	51
Kyn	8	0	0	13	8	6	9	6
<i>Spectral Counts</i> ATP-Synthase α -Untereinheit Peptid ILQWEADFLSHLK	Technisches Replikat 2							
	juvenil #33		juvenil #33		juvenil #33		juvenil #33	
	V_2	V_2	V_2	V_2	V_2	V_2	V_2	V_2
unmodifiziert	409	601	217	480	554	544	225	369
TrpOH	37	31	24	25	23	7	3	4
NFKyn	65	44	37	41	58	50	33	37
Kyn	13	2	3	7	17	4	0	3

Tabelle A.21 Peakflächen der MRM-Analyse (LTQ Orbitrap Massenspektrometer) der juvenilen Kulturen #33 und #46 sowie der seneszenten Kulturen #40 und #47 von *Podospora anserina* (vgl. Tabelle 5.1.3) für das Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit in seiner unmodifizierten Form sowie als Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn). Verglichen werden Dimer (V_2) und Monomer (V_1) der ATP-Synthase.

Peakflächen ATP-Synthase α -UE Peptid ILQWEADFLSHLK	juvenil #33		seneszent #40		juvenil #46		seneszent #47	
	V_2	V_1	V_2	V_1	V_2	V_1	V_2	V_1
unmodifiziert	576647	1471771	389559	1524538	1775217	1871465	826211	1380132
TrpOH	83011	115278	9209	22208	44558	124674	30444	40144
NFKyn	49921	101089	15789	12392	48234	145720	74588	52298
Kyn	42510	59564	0	25665	70914	41728	0	93842

A.2.2 Einfluss von SCAVEGR™ auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus *P. anserina*

Rohdaten

Tabelle A.22 *Spectral Counts* der LC-ESI-MS/MS-Analyse der Kulturen #33 (juvenil) und #40 (seneszent) von *Podospira anserina* (vgl. Tabelle 5.1.3) für das Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit in seiner unmodifizierten Form sowie als Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn). Verglichen werden Dimer (V_2), Monomer (V_1) und freier F_1 -Teil (F_1) der ATP-Synthase aus der juvenilen sowie der seneszenten Kultur, jeweils mit und ohne Zugabe des Antioxidantien-Cocktails SCAVEGR™ (Zusammensetzung in Tabelle 4.1.2) bei der Solubilisierung.

<i>Spectral Counts</i>	juvenil						seneszent					
	-SCAVEGR™			+SCAVEGR™			-SCAVEGR™			+SCAVEGR™		
	V_2	V_1	F_1									
unmodifiziert	7	8	3	11	7	0	5	5	6	5	6	1
TrpOH	0	7	0	5	5	0	3	1	1	6	3	0
NFKyn	0	4	0	4	8	0	3	1	1	1	3	1
Kyn	0	2	0	0	1	0	1	1	0	1	2	0

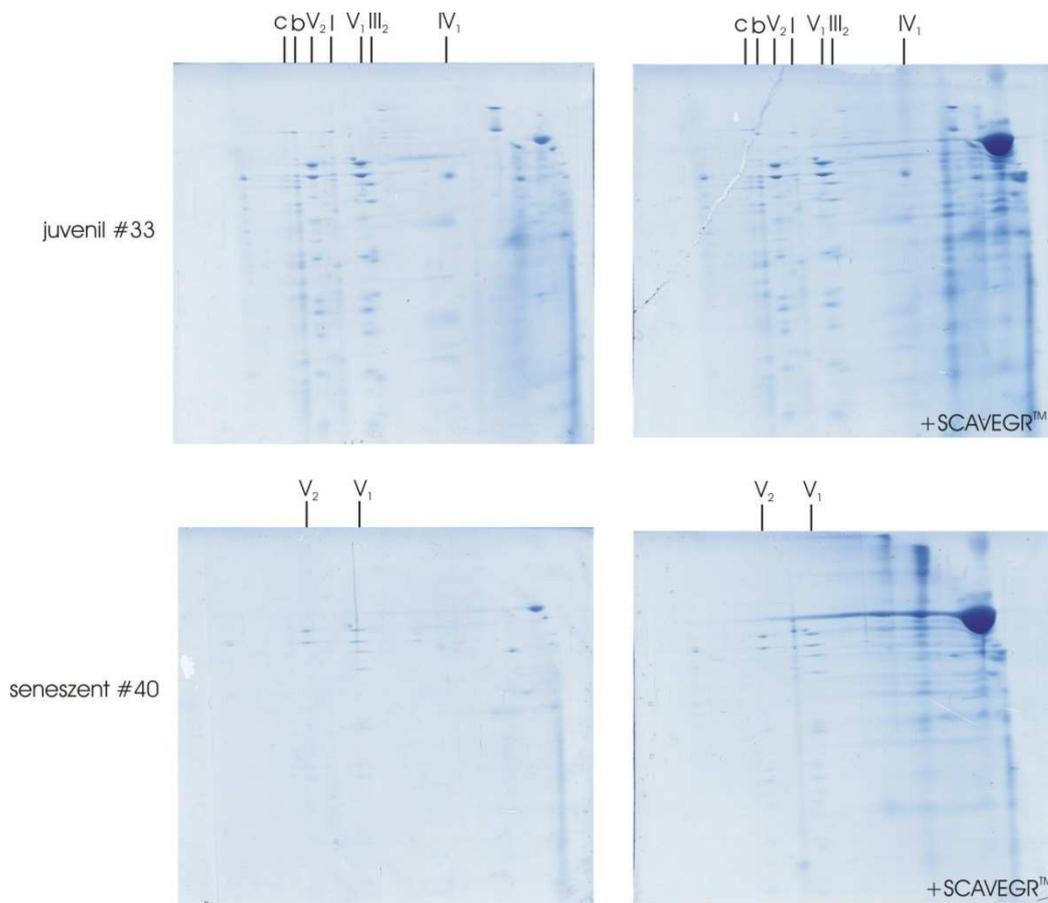


Abbildung A.82 Mit Roti®-Blue gefärbte 2D-BN/SDS-Gele der juvenilen und seneszenten *Podospira anserina* Kulturen #33 und #40. Monomer (V_1) und Dimer (V_2) der ATP-Synthase sowie die Komplexe I, III₂ und IV₁ der oxidativen Phosphorylierung und die Superkomplexe b (I₁III₂IV₁) und c (I₁III₂IV₂) sind gekennzeichnet. Die Solubilisierung erfolgte mit einem Protein/Digitonin-Verhältnis von 1:4 (w/w). Es sind 250 μ g (juvenil) bzw. 125 μ g (senes-zent) Protein aufgetragen, bezogen auf die Menge vor der Solubilisierung. Bei jeweils einer juvenilen und einer seneszenten Probe wurden dem Solubilisierungspuffer 2% (v/v) des kommerziell erhältlichen Antioxidantien-cocktails SCAVEGR™ zugefügt, was in deutlich zu erkennenden, zusätzlichen Banden resultiert, die die (quanti-tative) Analyse beeinträchtigen können.

A.2.3 Einfluss von Desferal auf die Oxidation von Tryptophan-Resten der ATP-Synthase aus *P. anserina*

Tabelle A.23 Peakflächen der MRM-Analyse der ohne Zusatz von Desferal isolierten Mitochondrien der *Podospora anserina* Kultur #81 (vgl. Tabelle 5.1.4) für das Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit in unmodifizierter Form, als Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) sowie das Referenzpeptid HSLVIFDDLK und die entsprechenden isopenmarkierten Standardpeptide. Monomer und Dimer der ATP-Synthase werden getrennt analysiert.

Peakflächen (MRM) ATP-Synthase α -UE Peptid ILQWEADFLSHLK	#81 Kontrolle					
	Monomer					
	Gel 1			Gel 2		
	MRM 1	MRM 2	MRM 3	MRM 1	MRM 2	MRM 3
unmodifiziert	51260000	51200000	41590000	55670000	48210000	60300000
TrpOH	1262000	1280000	1060000	1146000	868300	1191000
NFKyn	2755000	2874000	2494000	2592000	2067000	2873000
Kyn	828800	830700	860900	768300	619500	830700
Referenzpeptid HSLVIFDDLK	11610000	12410000	10430000	11110000	8061000	10320000
Isotopenmarkierte Standardpeptide						
unmodifiziert	10190	10040	8044	9103	8760	10720
TrpOH	8638	9451	8634	8125	6489	9305
Kyn	21930	24350	2573	18240	14620	19300
Referenzpeptid HSLVIFDDLK	36900	41670	33630	40130	29190	38800

Peakflächen (MRM) ATP-Synthase α -UE Peptid ILQWEADFLSHLK	#81 Kontrolle					
	Dimer					
	Gel 1			Gel 2		
	MRM 1	MRM 2	MRM 3	MRM 1	MRM 2	MRM 3
unmodifiziert	37210000	35830000	33190000	25090000	16300000	20210000
TrpOH	1836000	1644000	1339000	1075000	639000	827900
NFKyn	2318000	2275000	2325000	2220000	1202000	1723000
Kyn	770900	706800	704800	2752000	1559000	2089000
Referenzpeptid HSLVIFDDLK	7027000	6387000	6653000	6546000	4954000	6020000
Isotopenmarkierte Standardpeptide						
unmodifiziert	20450	18590	17940	11430	7361	9008
TrpOH	12490	12810	11430	9141	5005	7282
Kyn	3593	2727	3747	17490	9000	11350
Referenzpeptid HSLVIFDDLK	50860	47790	49400	40650	30670	37060

Tabelle A.24 Peakflächen der MRM-Analyse der mit Zusatz von Desferal isolierten Mitochondrien der *Podospira anserina* Kultur #81 (vgl. Tabelle 5.1.4) für das Peptid ILQWEADFLSHLK der ATP-Synthase α -Untereinheit in unmodifizierter Form, als Hydroxy-Tryptophan (TrpOH), *N*-Formylkynurenin (NFKyn) und Kynurenin (Kyn) sowie das Referenzpeptid HSLVIFDDLSK und die entsprechenden isotoopenmarkierten Standardpeptide. Monomer und Dimer der ATP-Synthase werden getrennt analysiert.

Peakflächen (MRM) ATP-Synthase α -UE Peptid ILQWEADFLSHLK	#81 +Desferal					
	Monomer					
	Gel 1			Gel 2		
	MRM 1	MRM 2	MRM 3	MRM 1	MRM 2	MRM 3
unmodifiziert	31370000	23880000	26470000	56550000	42150000	49410000
TrpOH	281000	276900	261700	1139000	1005000	1190000
NFKyn	777500	814000	807600	3125000	2252000	3172000
Kyn	481200	403300	437300	1637000	1136000	1404000
Referenzpeptid HSLVIFDDLSK	4789000	5777000	3998000	11280000	9393000	9734000
Isotoopenmarkierte Standardpeptide						
unmodifiziert	10290	7746	6354	14100	12790	12520
TrpOH	6091	7945	5934	10880	7174	11330
Kyn	5492	5570	2106	28080	19560	24580
Referenzpeptid HSLVIFDDLSK	26000	30820	20040	43130	35860	37130

Peakflächen (MRM) ATP-Synthase α -UE Peptid ILQWEADFLSHLK	#81 +Desferal					
	Dimer					
	Gel 1			Gel 2		
	MRM 1	MRM 2	MRM 3	MRM 1	MRM 2	MRM 3
unmodifiziert	24170000	26090000	20500000	27670000	18520000	25500000
TrpOH	534000	531100	484600	144200	113300	131400
NFKyn	1341000	1398000	1202000	433700	218500	386200
Kyn	551900	548000	859000	509000	317500	424400
Referenzpeptid HSLVIFDDLSK	5590000	5881000	5569000	4187000	3392000	4467000
Isotoopenmarkierte Standardpeptide						
unmodifiziert	16840	17870	14400	17000	10330	16050
TrpOH	12510	11640	13200	8023	6065	7543
Kyn	36350	35760	34740	2112	1155	1353
Referenzpeptid HSLVIFDDLSK	42880	48380	43760	47220	35370	47520

A.2.4 Spezifische 4-Hydroxy-2-nonenal Modifikation eines Histidin-Restes der ATP-Synthase β -Untereinheit von *P. anserina*

Tabelle A.25 *Spectral Counts* der LC-ESI-MS/MS-Analyse der Kulturen #33 (juvenil) und #40 (seneszent) von *Podospora anserina* (vgl. Tabelle 5.1.3) für das Peptid LPIHAEAPEFIEQSTTAEILVTGIK der ATP-Synthase β -Untereinheit. Verglichen wird die 4-Hydroxy-2-nonenal (HNE) Modifizierung von Dimer, Monomer und freiem F_1 -Teil der ATP-Synthase aus der juvenilen und der seneszenten Kultur.

<i>Spectral Counts</i> ATP-Synthase β -Untereinheit Peptid LPIHAEAPEFIEQSTTAEILVTGIK	juvenil			seneszent		
	Dimer	Monomer	F_1 -Teil	Dimer	Monomer	F_1 -Teil
unmodifiziert	20	31	12	12	17	6
HNE	11	17	6	5	9	4

B *Caenorhabditis elegans*

B.1 Einfluss des Alterns auf das mitochondriale Proteom des *C. elegans* Wildtyps N2 und die Mutante *daf-2(e1370)*

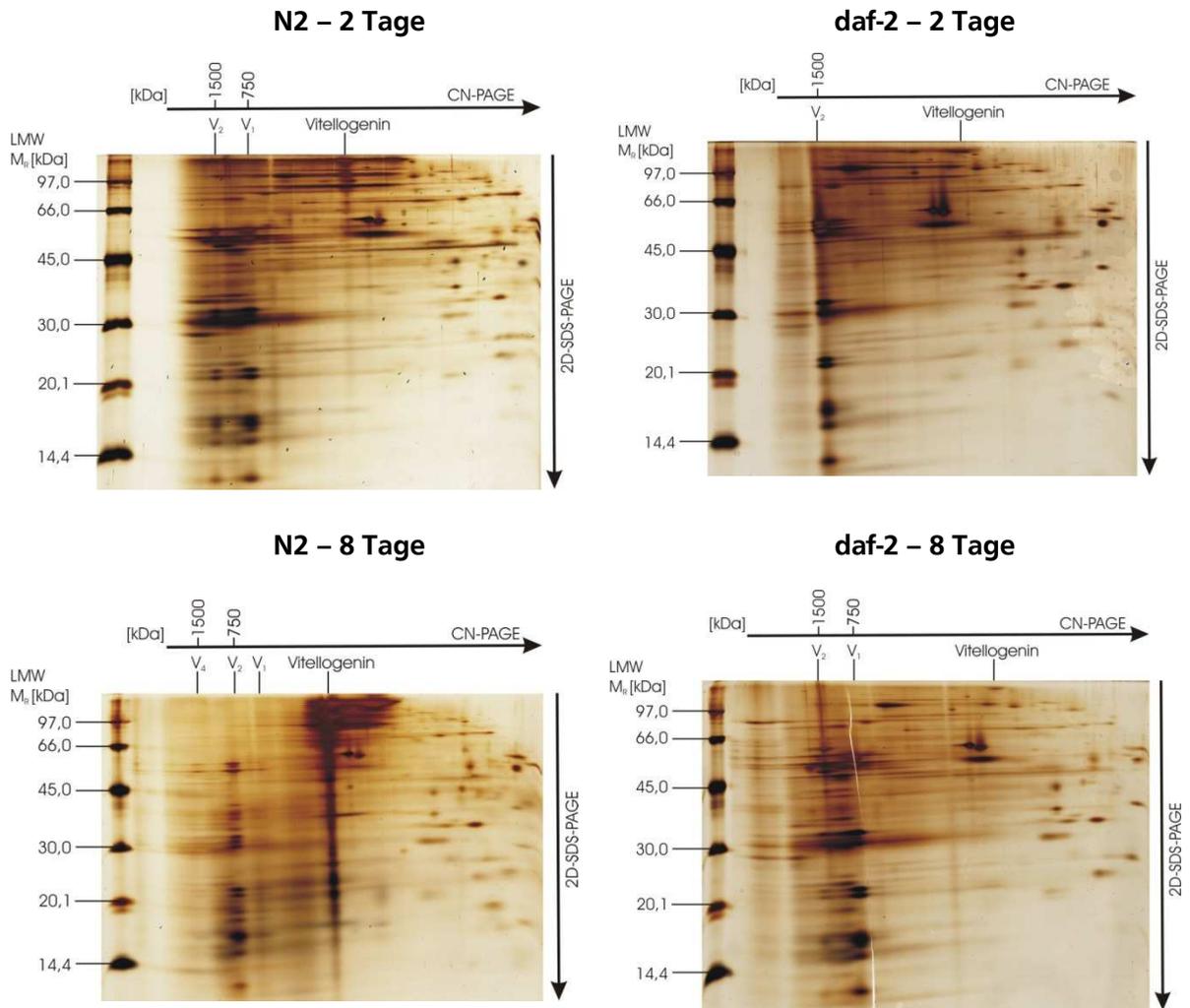


Abbildung B.1 Silbergefärbte 2D-CN/SDS-Gele der *Caenorhabditis elegans* Proben aus Tabelle 3.5.4. Für die erste Dimension werden die in Tabelle 5.2.1 aufgeführten Proteinmengen mit einem Digitonin/Protein-Verhältnis von 4:1 (w/w) solubilisiert. Links sind jeweils 2 μ L des LMW-Massenstandards aufgetragen. Durch die Verwendung der farblos-nativen Gelelektrophorese in der ersten Dimension kann auf dem Gel der 2 Tage alten *daf-2*-Mutante nur noch ATP-Synthase Dimer (V₂) detektiert werden während im entsprechenden 2D-BN/SDS-Gel Monomer und Dimer etwa im Verhältnis 1:1 vorliegen (vgl. Abbildung 5.2.1). Beim 2 Tage alten Wildtyp (N2) beträgt das Monomer-Dimer-Verhältnis unabhängig von der Verwendung von BN- oder CN-PAGE in der ersten Dimension in etwa 1:1. Beim 8 Tage alten Wildtyp verschiebt sich das Monomer-Dimer-Verhältnis der ATP-Synthase zu Gunsten des Dimers, wenn in der ersten Dimension ein CN- anstatt ein BN-Gel eingesetzt wird. Auf dem 2D-CN/SDS-Gel der 8 Tage alten *daf-2*-Mutante liegt nicht mehr nur ATP-Synthase Dimer vor, wie bei der jüngeren Mutante, sondern das Monomer-Dimer-Verhältnis beträgt in etwa 1:1 wie auch auf dem entsprechenden 2D-BN/SDS-Gel (vgl. Abbildung 5.2.1).

Eva Regine Schäfer
Odenwaldstraße 73
64367 Mühlthal

Mühlthal 27. Mai 2011

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Eva Regine Schäfer

Eva Regine Schäfer
Odenwaldstraße 73
64367 Mühlthal

Mühlthal 27. Mai 2011

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

Eva Regine Schäfer

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Eva Regine Schäfer
Adresse	Odenwaldstraße 73 64367 Mühlthal
Geburtsdatum	29. Juli 1982
Geburtsort	Darmstadt
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Akademischer Werdegang

Juli 2007 - Mai 2011	Promotion am Clemens-Schöpf Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt im Arbeitskreis von Prof. Dr. N. A. Dencher
Januar 2007 - Juli 2007	Diplomarbeit am Clemens-Schöpf Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Universität Darmstadt im Arbeitskreis von Prof. Dr. N. A. Dencher Titel der Arbeit: <i>Vergleich des mitochondrialen Rattenhirnproteoms verschiedener Altersstufen mit 2D-Gelelektrophorese und MALDI-Massenspektrometrie</i>
Oktober 2001 - Juli 2007	Studium der Chemie an der Technischen Universität Darmstadt

Schulbildung

August 1994 - Juni 2001	gymnasialer Zweig der Albert-Einstein-Schule, Groß-Bieberau, kooperative Gesamtschule des Kreises Darmstadt-Dieburg, Abitur
August 1992 - Juli 1994	Förderstufe der Dr. Kurt-Schumacher Schule, Reinheim
August 1988 - Juli 1992	Grundschule Reinheim/Ueberau

Mühlthal 27. Mai 2011

Eva Regine Schäfer
