

Mitochondrial-nukleäre Interaktionen, oxidativer Stress und
Alterungsprozesse bei dem Ascomyzeten *Podospora anserina*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Christian Quintus Scheckhuber
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2005
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. R. Wittig
1. Gutachter: Prof. Dr. H. D. Osiewacz
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Bereiter-Hahn

Datum der Disputation: 24.3.2006

Konvention

Zur Schreibweise von Genen und Proteinen in dieser Arbeit: Gene werden kursiv geschrieben, wobei die ersten zwei Buchstaben den Artnamen abkürzen, wenn sie einer bestimmten Spezies zugeordnet werden (z. B. *CeDrp-1*, *ScMdv1*, *PaCtr3*). Bei der Bezeichnung von Proteinen bestimmter Spezies wird ebenfalls zuerst der Artnamen abgekürzt. Bis auf den zweiten Buchstaben der Artabkürzung wird Großschrift verwendet (z.B. CeDRP-1, ScMDV1, PaCTR3). Folgende Ausnahmen gelten: *Grisea* (*P. anserina*-Gen) und GRISEA (*P. anserina*-Protein).

1. Einleitung	1
1.1 Definition des Alterns	1
1.2 Bedeutung der Mitochondrien für Alterungsprozesse in ausgewählten Modellsystemen	1
1.2.1 <i>S. cerevisiae</i>	2
1.2.2 <i>P. anserina</i>	4
1.2.3 <i>C. elegans</i>	8
1.2.4 Säuger	9
1.3 Bedeutung und Regulation der mitochondrialen Dynamik	11
1.3.1 Mitochondriale Fusion und Teilung	12
1.3.2 Komponenten der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsmaschinerie	15
1.3.3 Bedeutung der mitochondrialen Dynamik für apoptotische Prozesse	21
2. Problemstellung	26
3. Materialien	28
3.1 Stämme	28
3.1.1 <i>P. anserina</i>	28
3.1.2 <i>E. coli</i>	28
3.2 Plasmide und Cosmide	28
3.3 Oligonukleotide	29
3.4 Enzyme	29
3.4.1 Restriktionsendonukleasen	29
3.4.2 Weitere Enzyme	30
3.5 Medien und Lösungen für die Pilz- und Bakterienkultur	30
3.6 Allgemeine Lösungen	33
3.7 Bezugsquellen	37
3.7.1 Stoffe und Reagenzien	37
3.7.2 Geräte	39
3.7.3 Sonstige Materialien	40
4. Methoden	41
4.1 Kultivierung von <i>P. anserina</i>	41

4.2 Transformation von <i>P. anserina</i>	42
4.3 Nukleinsäuretechniken	44
4.3.1 Nukleinsäure-Isolation	44
4.3.1.1 Isolation der Gesamt-RNA aus <i>P. anserina</i>	44
4.3.1.2 Isolation der Gesamt-DNA aus <i>P. anserina</i> (nach Lecellier und Silar, 1994)	45
4.3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Mini-Präparation)	46
4.3.1.4 Isolation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Midi-Präparation)	46
4.3.2 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung	46
4.3.3 Nukleinsäure-Gelelektrophorese	47
4.3.3.1 DNA-Gelelektrophorese	47
4.3.3.2 RNA-Gelelektrophorese	48
4.3.4 DNA-Restriktion	48
4.3.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
4.3.6 Nukleinsäuretransfer	49
4.3.6.1 Southerntransfer	49
4.3.6.2 Northerntransfer	50
4.3.7 Hybridisierungsanalyse	50
4.3.7.1 DNA-Markierung	50
4.3.7.2 Hybridisierung und Detektion	51
4.3.8 DNA-Klonierung	52
4.3.8.1 Vorbereitung des Vektors	52
4.3.8.2 Synthese des zu klonierenden DNA-Fragments	52
4.3.8.3 DNA-Ligation	53
4.3.8.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	53
4.3.8.5 Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	54
4.3.9 DNA-Sequenzierung	55
4.3.10 Oligonukleotidsynthese	55
4.3.11 Polymerase-Kettenreaktion	55
4.4 Proteintechniken	56
4.4.1 Isolation mitochondrialer Proteine aus <i>P. anserina</i>	56
4.4.2 Isolation intakter Mitochondrien aus <i>P. anserina</i>	57
4.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung	58
4.4.4 Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)	58
4.4.5 Spektralphotometrische Bestimmung der Komplex I- und III-Aktivität in mitochondrialen Isolaten	61
4.5 Cytologische Techniken	61
4.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von <i>P. anserina</i> -Mitochondrien	61
4.5.2 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von <i>P. anserina</i> -Mitochondrien	62
4.5.3 Bestimmung des ATP-Gehalts in <i>P. anserina</i>	63
4.5.4 Myzelfärbungen zur qualitativen Bestimmung der Freisetzung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (modifiziert nach Munkres, 1990)	64

5. Ergebnisse	65
5.1 Untersuchungen zur Morphologie der Mitochondrien in verschiedenen Altersstadien von Wildstamm „s“ und den langlebigen Mutanten <i>grisea</i> und <i>ex1</i>	65
5.2 Untersuchungen zum Aufbau der mitochondrialen Atmungskette im Wildstamm „s“ und der unsterblichen Mutante <i>ex1</i>	69
5.3 Charakterisierung des putativen mitochondrialen Teilungsgens <i>PaDnm1</i>	74
5.3.1 Charakterisierung von <i>PaDnm1</i> auf Sequenz- und Transkriptebene	74
5.3.2 Überexpression von <i>PaDnm1</i> im Wildstamm „s“	81
5.3.2.1 Konstruktion eines Vektors zur <i>PaDnm1</i> -Überexpression	81
5.3.2.2 Transformation von Wildstamm „s“-Protoplasten mit <i>pPGpd-PaDnm1</i>	83
5.3.2.3 Verifizierung von <i>PaDnm1</i> -überexprimierenden Transformanden	84
5.3.2.4 Vergleich der Transformanden <i>PaDnm1_Ex1</i> und <i>PaDnm1_Ex2</i> mit dem Wildstamm „s“: Myzelmorphologie, Wachsrate und Fertilität	86
5.3.2.5 Bestimmung der mtDNA-Reorganisationen in den Transformanden <i>PaDnm1_Ex1</i> und <i>PaDnm1_Ex2</i>	87
5.3.2.6 Analyse der Lebensspanne von <i>PaDnm1_Ex1</i> und <i>PaDnm1_Ex2</i>	88
5.3.3 <i>PaDnm1</i> -Deletion in Wildstamm „s“	90
5.3.3.1 Herstellung eines <i>PaDnm1</i> -Deletionsvektors	90
5.3.3.2 Transformation von Wildstamm „s“-Protoplasten mit Deletionscosmid $\Delta Dnm1\#42B8$ und Southern-blot-Analysen mit putativen Transformanden	95
5.3.3.3 Analysen zur mitochondrialen Morphologie und Lebensspanne in <i>PaDnm1::ble</i> -Stämmen	97
5.3.3.4 Reversion des <i>PaDnm1::ble</i> -Phänotyps	100
5.3.3.5 Phänotypische Charakterisierung von <i>PaDnm1::ble</i> (I): Myzelmorphologie, Wachsrate, Fertilität, Sporenkeimung und Mitochondriensegregation während der Ascosporengese	102
5.3.3.6 Phänotypische Charakterisierung von <i>PaDnm1::ble</i> (II): mtDNA-Stabilität, Zusammensetzung der Atmungskette und ATP-Gehalt	105
5.3.3.7 Phänotypische Charakterisierung von <i>PaDnm1::ble</i> (III): Freisetzung von Superoxid und Wasserstoffperoxid	108
6. Diskussion	111
7. Zusammenfassung	124
8. Literatur	126
9. Anhang	140
10. Danksagung	143
11. Publikationsliste	144
12. Lebenslauf	145

1. Einleitung

1.1 Definition des Alterns

Das Altern biologischer Systeme ist durch eine progressive und irreversible Abnahme der physiologischen Leistungsfähigkeit („Fitness“) charakterisiert. Damit einhergehend tritt eine Erhöhung der Krankheitsanfälligkeit (Morbidität) und der Sterblichkeit (Mortalität) auf. Schließlich kommt es zum Tod, dem letzten Stadium der Individualentwicklung (Übersicht bei: Kirkwood und Austad, 2000).

1.2 Bedeutung der Mitochondrien für Alterungsprozesse in ausgewählten Modellsystemen

Prinzipiell hat der Alterungsprozess endogene und exogene Ursachen. Zu letzteren zählen Umwelteinflüsse wie z. B. Art und Zusammensetzung des vorliegenden Nahrungsangebots und diverse Stressfaktoren (z. B. Strahlungstress, Temperaturstress, chemische Stressfaktoren wie die Aufnahme toxischer Substanzen, usw.). Im Gegensatz dazu stellen genetische Determinanten und physiologische Prozesse endogene Faktoren dar, die den Alterungsprozess beeinflussen. Darüber hinaus legen sie in einem gewissen Umfang auch fest, wie wirksam die bereits erwähnten exogenen Faktoren auf das Altern eines Organismus sind.

Bereits die „Mitochondriale Theorie des Alterns“ klassifiziert die in eukaryotischen Zellen obligaten Mitochondrien als die für den Alterungsprozess hauptsächlich verantwortlichen endogenen Faktoren (Harman, 1972).

Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umhüllt werden. Sie haben ungefähr die Größe von Bakterien. Der Endosymbiontentheorie nach haben Mitochondrien ihren Ursprung in α -Proteobakterien, die vor ca. 1,5 Milliarden Jahren von eukaryotischen Vorläuferzellen phagozytiert wurden. Mitochondrien nehmen vielfältige Aufgaben in der Zelle wahr, so z. B. Bereitstellung von ATP durch oxidative Phosphorylierung, Biosynthese wichtiger Stoffwechselintermediate und Regulation der Kalziumhomöostase (Übersicht bei: Scheffler, 1999).

Insbesondere die während der ATP-liefernden oxidativen Phosphorylierung als toxische Nebenprodukte gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen dieser Theorie nach zu akkumulierenden Schäden an essenziellen zellulären Bestandteilen wie z. B. Nukleinsäuren, Proteinen und Lipidmembranen. Die Beeinflussung des Alterungsprozesses durch Mitochondrien geht jedoch über die Schädigung von ROS hinaus. Im Folgenden wird die Bedeutung der Mitochondrien für den Alterungsprozess einiger gerontologischer Modellsysteme an ausgewählten Beispielen skizziert.

1.2.1 *S. cerevisiae*

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* vermehrt sich durch Knospung, indem Tochterzellen von einer Mutterzelle abgeschnürt werden. Dieser Prozess hinterlässt „Knospungsnarben“ auf der Zelloberfläche. Nach 40 bis 50 Knospungen geht die Mutterzelle zugrunde. Dieses Phänomen wird als replikative Seneszenz bezeichnet (Mortimer und Johnston, 1959). In mehrfacher Hinsicht beeinflussen die Mitochondrien diesen Prozess der Alterung.

Wirkung der retrograden Antwort auf den Alterungsprozess

Ein wesentlicher Faktor der Alterung bei Hefe ist die retrograde Antwort, die insbesondere durch defekte Mitochondrien hervorgerufen wird und die Expression zahlreicher nukleärer Gene steuert (Kirchman et al., 1999). Schlüsselproteine dieses Signalweges sind der Transkriptionsfaktor ScRTG1-ScRTG3 und das diesen aktivierende ScRTG2. Nach Aktivierung wandert ScRTG1-ScRTG3 vom Cytoplasma in den Zellkern (Sekito et al., 2000) und induziert zahlreiche Gene, die hauptsächlich für Enzyme des Stoffwechsels und Stressproteine kodieren (Epstein et al., 2001). Unter ihnen sind beispielsweise Gene des Glyoxylatzyklus. In diesem werden die Kohlenstoffatome der C-Quelle Azetat konserviert. Im Gegensatz dazu gehen sie im Zitronensäurezyklus als Kohlendioxid verloren. Die nachlassende Aktivität des für die Bereitstellung von Stoffwechselintermediaten wichtigen Zitronensäurezyklus in defekten Mitochondrien kann somit ökonomisch kompensiert werden. Je größer die mitochondriale Dysfunktion ist, desto stärker ist auch die retrograde Antwort (Jazwinski, 2000). Hierdurch wird deutlich, dass dieser Signalweg den Erfordernissen der Zelle effizient angepasst werden kann. Da alte Hefezellen über zahlreiche defekte Mitochondrien verfügen (Lai et al., 2002), die durch eine erhöhte Produktion von ROS charakterisiert sind (Laun et al., 2001), ist bei ihnen auch die retrograde Antwort besonders stark ausgeprägt (Borghouts et al., 2004). Es wird spekuliert, dass dadurch *S. cerevisiae* erst die Möglichkeit erlangt, eine artspezifisch normale Lebensspanne zu erreichen (Übersicht bei: Jazwinski, 2005).

Auftreten der klonalen Seneszenz in Hefemutanten mit eingeschränkter Segregation der Mitochondrien

Eine weitere wichtige Beobachtung, die die Rolle der Mitochondrien für den Alterungsprozess von Hefe beschreibt, ist die so genannte Altersasymmetrie zwischen Mutter- und Tochterzellen. Die Nachkommen junger Mutterzellen haben hierbei eine längere Lebens-

spanne als diejenigen, die von alten Tochterzellen abgeschnürt werden (Kennedy et al., 1994). Studien von Hefemutanten, die das Phänomen der so genannten klonalen Seneszenz zeigen, verdeutlichen die Rolle der Mitochondrien als cytoplasmatische Seneszenzfaktoren bei der Altersasymmetrie (Lai et al., 2002). Da bei diesen Mutanten das Alter der Tochter- dem der Mutterzellen entspricht, werden keine juvenilen Zellen gebildet, wie es normalerweise der Fall ist. Dies hat zur Folge, dass die Kultur als Ganzes altert. Insbesondere die Charakterisierung der *ScAtp2*-Mutante, bei der durch eine Punktmutation das für die β -Untereinheit der ATP-Synthase kodierende *ScAtp2*-Gen betroffen ist, lieferte wertvolle Erkenntnisse für das Verständnis der Grundlagen der klonalen Seneszenz. Mitochondrien der Mutante zeigten mit der Zeit eine progressive Abnahme des mitochondrialen Membranpotenzials ($\Delta\Psi_m$). Darüber hinaus wurde insbesondere bei juvenilen Zellen ein Verlust der mitochondrialen Masse beobachtet. Schließlich wurden Zellen ohne Mitochondrien beobachtet (Lai et al., 2002). Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung intakter Mitochondrien für die Aufrechterhaltung der Altersasymmetrie. Darüber hinaus ist die Segregation intakter Mitochondrien auch in alten Wildstamm-Mutterzellen eingeschränkt, da mit zunehmendem Alter $\Delta\Psi_m$ niedriger wird (Lai et al., 2002).

ROS führen zu umfangreichen Reorganisationen der mtDNA

Neben der retrograden Antwort und der Altersasymmetrie zwischen Mutter- und Tochterzelle spielt oxidativer Stress eine wichtige Rolle bei der Hefealterung (Longo et al., 1996; Longo et al., 1999; Fabrizio et al., 2004; Heeren et al., 2004). Vor kurzem wurde die Rolle von ScSOD2, ScNTG1 und ScPIF1 hinsichtlich der mtDNA-Integrität bei erhöhtem endogenen und exogenen oxidativen Stress analysiert (Doudican et al., 2005). ScSOD2 ist eine manganhaltige Superoxiddismutase, die in der mitochondrialen Matrix Superoxid in Wasserstoffperoxid umwandelt (Gralla und Kosman, 1992). Das H_2O_2 kann dann z. B. durch die Glutathionperoxidase abgebaut werden. ScNTG1 ist eine N-Glykosylase, die der Reparatur oxidativ modifizierter Basen der mtDNA dient (You et al., 1998). Die DNA-Helicase ScPIF1 ist ebenfalls an der mtDNA-Reparatur beteiligt (Lahaye et al., 1993). Hefestämme, in denen eines der untersuchten Gene deletiert ist ($\Delta ScSod2$, $\Delta ScNtg1$ bzw. $\Delta ScPif1$), zeigen keine veränderte Stabilität der mtDNA (Doudican et al., 2005). Im Gegensatz dazu ist das Chondriom in Doppel- und Tripelmutanten ($\Delta ScPif1 \Delta ScSod2$ bzw. $\Delta ScNtg1 \Delta ScPif1 \Delta ScSod2$) starken Reorganisationen unterworfen. Dies hat zur Folge, dass $\Delta ScPif1 \Delta ScSod2$ -Stämme über mtDNA mit umfangreichen Deletionen (ρ^-) verfügen, während die $\Delta ScNtg1 \Delta ScPif1 \Delta ScSod2$ -Mutanten sehr schnell ihre gesamte mtDNA verlieren (ρ^0). Die Kolonien

der Mutanten zeigen „petite“-Wachstum und können nur auf Medium mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie z. B. Glucose wachsen. Diese Befunde lassen eine Beteiligung von ROS an umfangreichen Reorganisationen und Deletionen der mtDNA in Hefe erkennen. Möglicherweise treibt diese durch ROS vermittelte Wirkung den Alterungsprozess voran, obwohl bislang noch keine Daten diesbezüglich vorliegen.

1.2.2 *P. anserina*

Im Gegensatz zu den meisten anderen Hyphenpilzen ist die Lebensspanne des filamentösen Ascomyzeten *P. anserina* begrenzt (Rizet, 1953). Bei dem Wildstamm „s“ treten nach ca. 25 Tagen morphologische Änderungen auf, wie Hyperpigmentation, verringerte Bildung von Luftmyzel und Verlangsamung des Wachstums. Die Kultur stellt schließlich den Wuchs ganz ein und stirbt von der Peripherie her ab.

Frühe Untersuchungen der mitochondrialen Wirkung auf den Alterungsprozess

Bereits Anfang der 60er Jahre wurde festgestellt, dass der Alterungsprozess von *P. anserina* von einem cytoplasmatischen Faktor beeinflusst wird (Marcou, 1961). Fruchtkörper (so genannte Perithezien), die durch Befruchtung von juvenilem Myzel mit den Spermastien (männliche Gameten) eines seneszenten Stammes entstanden sind, enthalten Sporen, die juveniles Myzel hervorbringen. Im Falle der Befruchtung von älterem Myzel mit juvenilen Spermastien wurden Fruchtkörper mit entweder juvenilen oder seneszenten Nachkommen erhalten, d. h. innerhalb der in den Perithezien befindlichen Meiosporangien (Asci) kam es nicht zu einer Aufspaltung nach Mendel. Diese charakteristischen reziproken Unterschiede deuteten auf die Existenz eines cytoplasmatischen genetischen Faktors, der den Alterungsprozess beeinflusst. Hierbei handelt es sich um Mitochondrien, diese werden bei *P. anserina* maternal vererbt.

Morphologische Veränderungen der mitochondrialen Ultrastruktur im seneszenten Stadium

Eine ebenfalls Anfang der 60er Jahre durchgeführte transmissionselektronenmikroskopische Analyse zur Bestimmung zellulärer Veränderungen in seneszentem Myzel des Wildstammes zeigte, dass die mitochondriale Struktur Veränderungen unterworfen ist (Delay et al., 1963). Die Einfaltungen der inneren mitochondrialen Membran (Cristae) waren kleiner und weniger

zahlreich. In einigen Fällen konnten sie nicht mehr nachgewiesen werden. Diese strukturellen Veränderungen erschwerten in dieser Untersuchung bisweilen die sichere Identifizierung der Mitochondrien (Delay et al., 1963). Säugermitochondrien in alten Zellen liefern ein ähnliches Bild mit altersabhängiger Degeneration wie z. B. dem vollständigen Verlust der Cristae (Vanneste und van den Bosch de Aguilar, 1981; van den Bosch de Aguilar und Vanneste, 1981; Beregi et al., 1988; Jendrach et al., 2005).

Reorganisationen der mtDNA

P. anserina dient seit mehr als 20 Jahren als wertvoller Modellorganismus zum Studium altersabhängiger Umstrukturierungen des Chondrioms. Die mtDNA der Wildstämme von *P. anserina* wird während des Alterns stark reorganisiert, was zu umfangreichen Deletionen führt (Belcour et al., 1981; Kück et al., 1981; Osiewacz und Esser, 1984; Albert und Sellem, 2002) (siehe Abb. 1). Dieser Prozess wird durch homologe Rekombination zwischen Sequenzwiederholungen initiiert. Insbesondere die zirkuläre 2,5 kbp „plasmid-like“ DNA (pIDNA bzw. α -senDNA) trägt durch ihre replikative Transposition zur Bildung repetitiver Sequenzabschnitte bei (Stahl et al., 1978; Cummings et al., 1979; Osiewacz und Esser, 1984; Sellem et al., 1993; Borghouts et al., 2000).

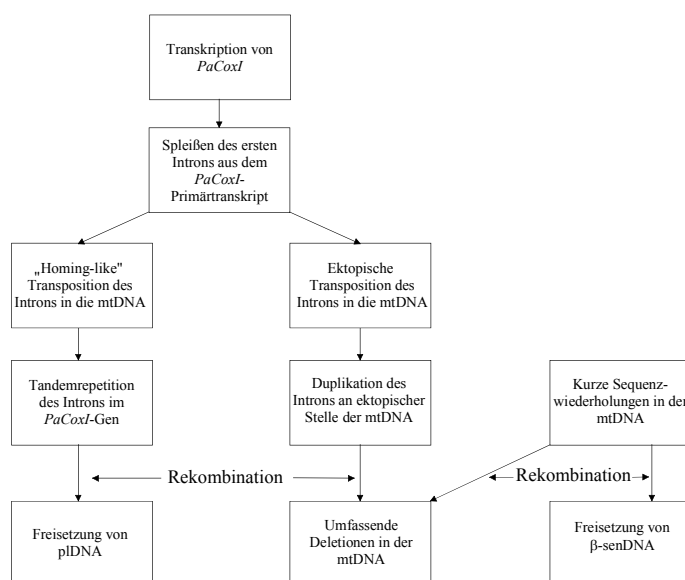


Abb. 1: Reorganisationen der mtDNA in *P. anserina*. Nach der Transkription von *PaCoxI* wird das Primärtranskript prozessiert. Das erste Intron (pl-Intron) ist ein transposables Element und kann nach reverser Transkription in die mtDNA reintegrieren („homing-like“ Integration in *PaCoxI* bzw. ektopische Integration in andere Regionen). Homologe Rekombination zwischen den pIDNA-Sequenzen kann je nach Integrationsart zur Freisetzung von pIDNA oder zu umfassenden Deletionen in der mtDNA führen. Darüber hinaus können Rekombinationen zwischen direkten kurzen Sequenzwiederholungen in der mtDNA ebenfalls an Deletionen und der Freisetzung weiterer sen-DNAs (z. B. β -sen DNA) beteiligt sein. Modifiziert nach Borghouts et al., 2000.

Zunächst wird das für die erste Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (COX) kodierende *PaCoxI*-Gen transkribiert (siehe Abb. 1). Das erste Intron dieses Gens ist hinsichtlich Größe und Sequenz identisch mit der pIDNA und wird daher auch „pl-Intron“ oder „ α -Intron“ bezeichnet. Hierbei handelt es sich um ein transposables Element, das in die mtDNA reintegrieren kann. Unterschieden wird zwischen „homing-like“-Transposition (hinter das 3'-

Ende des pl-Introns) und ektopische Transposition (in andere Akzeptorstellen in der mtDNA) unterschieden. Zwischen diesen duplizierten Sequenzen führen bei der „homing-like“-Transposition homologe Rekombinationen zur Freisetzung der zirkulären plDNA, die in seneszenten Wildstammkulturen in stark amplifizierter Form vorliegt. Homologe Rekombination zwischen plDNA-Integrationen, die durch ektopische Transposition entstanden sind, führen zu umfassenden Deletionen in der mtDNA. Das Auftreten und Wirken der plDNA wird jedoch nicht als Ursache für die begrenzte Lebensspanne von *P. anserina*, sondern als Beschleunigung der Seneszenz angesehen, weil mittlerweile eine Reihe von Mutanten existieren, die über ein stabiles Chondriom verfügen und trotzdem sterben (z. B. *grisea* [Borghouts et al., 1997], *mid26* [Begel et al., 1999] und *PaCox17::ble* [Stumpferl et al., 2004]). Bei *P. anserina* wurden darüber hinaus Rekombinationsprozesse zwischen endogenen kurzen Sequenzwiederholungen beschrieben, die zur Freisetzung von mtDNA-Subzirkeln führen (Dujon und Belcour, 1989; Jamet-Vierny et al., 1997). Die hier vorgestellten Reorganisationen der mtDNA können zum Verlust von essenziellen Genen der Atmungskette führen, wie z. B. *PaNdl-5* (Komplex I), *PaCytb* (Komplex III), *PaCoxI-III* (Komplex IV) bzw. *PaATPase6 / PaATPase8* (Komplex V) (Kück et al., 1981; Kück et al., 1985a) und somit den Alterungsprozess vorantreiben.

Induktion der alternativen Oxidase in langlebigen Mutanten

Die aus verschiedenen Gründen auftretende COX-Defizienz einer Reihe langlebiger *P. anserina*-Mutanten führt dazu, dass sie als terminale Oxidase der oxidativen Phosphorylierung eine so genannte alternative Oxidase (PaAOX) einsetzen.

Alternative Oxidasen konnten aus einer Reihe von Organismen isoliert werden, wie z. B. Pflanzen (Huq und Palmer, 1978), Pilzen (Lambowitz et al., 1989; Lorin et al., 2001), Einzellern (Jarmuszkiewicz et al., 1997) und Trypanosomen (Clarkson et al., 1989). Die eisenhaltigen Enzyme befinden sich in der inneren mitochondrialen Membran und katalysieren die Oxidation von Ubichinol zu Ubichinon, wobei die Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden (Palmer, 1976). Bei exklusiver Atmung über die AOX ist nur Komplex I am Aufbau eines Protonengradienten beteiligt; zwei weitere Protonentranslokatoren (Komplex III und IV) werden umgangen (Moore und Siedow, 1991).

Hierzu gehören beispielsweise die Mutanten *grisea* (Prillinger und Esser, 1977; Borghouts et al., 2001), *ex1* (Kück et al., 1985b; Schulte et al., 1988; Frese und Stahl, 1992; Borghouts et al., 2001), *PaCox5::ble* (Dufour et al., 2000) und *PaCox17::ble* (Stumpferl et al., 2004), die trotz der Induktion der alternativen Atmung unterschiedliche Lebensspannen aufweisen.

Dieses Phänomen beruht auf physiologischen Unterschieden in den genannten Mutantenstämmen, die im Folgenden näher beschrieben werden.

- Mutante *grisea*

Diese Mutante hat eine gegenüber dem Wildstamm „s“ um ca. 60 % verlängerte mittlere Lebensspanne (Borghouts und Osiewacz, 1998). Weitere phänotypische Merkmale sind graue Ascosporen (daher der Name *grisea*), stark reduzierte Luftmyzelbildung, schwächere Pigmentierung und stark erniedrigte weibliche Fertilität. Das für den Phänotyp der Mutante verantwortliche Gen, *Grisea*, weist eine Punktmutation auf, die zu einem Spleißdefekt führt (Borghouts et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor GRISEA kann somit in der Mutante nicht gebildet werden. Das für einen hochaffinen Kupfertransporter der Plasmamembran kodierende Gen *PaCtr3* ist eines der Zielgene von GRISEA, die in der Mutante nicht exprimiert werden können (Borghouts et al., 2002a). Die daraus resultierende Kupferdefizienz beeinträchtigt die Aktivität kupferabhängiger Enzyme wie der COX. Hauptsächlich verwendet *grisea* als Endoxidase deshalb PaAOX (Borghouts et al., 2001). Die Bildung von toxischen ROS ist bei einer AOX-abhängigen Atmung in Protoplasten der langlebigen *PaCox5::ble*-Mutante (siehe unten) erheblich niedriger (Dufour et al., 2000), was auch zur Lebensspannenverlängerung in *grisea* beitragen könnte. Darüber hinaus ist die mtDNA stabilisiert und weist nicht die im Wildstamm auftretenden Deletionen auf (Borghouts et al., 1997). Durch Zugabe von Kupfer zum Anzuchtmedium kann *grisea* hinsichtlich Fertilität, Lebensspanne und mtDNA-Stabilität wieder zum Phänotyp des Wildstammes revertiert werden (Marbach et al., 1994; Borghouts et al., 1997).

- Mutante *ex1*

Die unsterbliche Mutante *ex1* ist durch eine gegenüber dem Wildstamm verringerte Wachstumsrate gekennzeichnet (Kück et al., 1985b; Schulte et al., 1988). Ein weiteres Merkmal ist weibliche Sterilität. Durch eine umfangreiche Deletion (23 kbp) der mtDNA fehlt in *ex1* u. a. das für die COX-Aktivität notwendige *PaCoxI*-Gen. Als Endoxidase dient wie bei *grisea* PaAOX (Schulte et al., 1988; Frese und Stahl, 1992; Borghouts et al., 2001). Die Bildung der seneszenzfördernden plDNA ist durch die Deletion des pl-Introns nicht mehr möglich.

- Mutanten *PaCox5::ble* und *PaCox17::ble*

Die langlebige Mutante *PaCox5::ble* ist wie *ex1* durch eine geringere Wachstumsrate und weibliche Sterilität charakterisiert (Dufour et al., 2000). Die COX kann hier nicht assembliert werden, da das für die Assemblierung dieses Komplexes notwendige Gen *PaCox5* durch homologe Rekombination mit einer Resistenzkassette ausgetauscht wurde. Trotz des vorhandenen *PaCoxI*-Gens wird keine pDNA amplifiziert. Dies trägt vermutlich ebenso zur Lebensspannenverlängerung bei wie die verringerte ROS-Bildung durch die PaAOX-abhängige Atmung (Dufour et al., 2000).

In *PaCox17::ble* wurde die Assemblierung der COX durch Deletion von *PaCox17* unterbunden (Stumpferl et al., 2004). Dieses Gen kodiert für ein putatives Chaperon, das an dem Kupfertransport zur COX beteiligt ist. *PaCox17::ble*-Stämme zeichnen sich durch eine verringerte Wachstumsrate, weibliche Sterilität und eine stark verlängerte Lebensspanne aus. Des Weiteren ist auch bei ihnen die mtDNA stabilisiert. Im Gegensatz zu *grisea* ist eine Reversion zum Phänotyp des Wildstammes durch exogene Beigabe von Kupfer nicht möglich.

1.2.3 *C. elegans*

Die Frage, in welchem Ausmaß Mitochondrien den Alterungsprozess beeinflussen, wurde auch in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* intensiv untersucht. Hierfür ist insbesondere die Existenz zahlreicher Mutanten mit veränderter Lebensspanne von Vorteil, die hinsichtlich bestimmter Komplexe der Atmungskette defizient sind.

Mitochondriale Dysfunktion kann sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die Lebensspanne von C. elegans haben

Mittels RNA-Interferenz (RNAi) konnte die Expression von Genen, die für Untereinheiten der Atmungskette kodieren, post-transkriptionell herunterreguliert werden (Dillin et al., 2002). RNAi gegen *CeCyc-1* (Untereinheit von Komplex III) und *CeAtp-3* (Untereinheit der ATP-Synthase) führte zu einer um 60-80 % verringerten ATP-Menge. Diese war um 40-60 % im Falle der Herunterregulation von *CeNuo-2* (Komplex I) und *CeCco-1* (Komplex IV) erniedrigt. Die phänotypische Charakterisierung der Mutanten zeigte, dass die Tiere aufgrund der erniedrigten Zellgröße kleiner waren. Außerdem brauchten sie länger, um ihre adulte Größe zu erreichen. Physiologische Prozesse wie Nahrungsaufnahme und Bewegung waren ebenfalls gegenüber dem Wildtyp erniedrigt. Die RNAi-Tiere zeigten erstaunlicherweise eine

um bis zu 40 % verlängerte mittlere Lebensspanne. Weiterhin konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass Komplex III-Hemmung mit Antimyzin A ebenfalls zu einer geringfügigen aber signifikanten Lebensspannenverlängerung führt (Übersicht bei: Slater, 1983). Behandlung mit Antimyzin A führt zu einer erhöhten Produktion von ROS durch Bildung von Superoxidanionen an Komplex III (Übersicht bei: Raha und Robinson, 2000), was auch an isolierten *C. elegans*-Mitochondrien gezeigt werden konnte (Senoo-Matsuda et al., 2001). Das Paradoxon hierbei ist, dass die experimentell herbeigeführte mitochondriale Dysfunktion und erhöhte ROS-Produktion zu einer Erhöhung der Lebensspanne in *C. elegans* führt. Als Erklärung für diese Befunde werden hormetische Effekte postuliert, d. h. die Exposition des Organismus mit geringen Dosen einer toxischen Substanz führt zur Induktion einer erhöhten Stressabwehr (Cypser und Johnson, 2002). Defekte in der Atmungskette führen bei *C. elegans* jedoch nicht zwangsläufig zur Lebensspannenverlängerung, wie die Charakterisierung von mev-1, einer Komplex II-Mutante, zeigt (Ishii et al., 1990; Honda et al., 1993; Ishii et al., 1998; Senoo-Matsuda et al., 2001). Die Elektronen können aufgrund der Mutation nicht mehr von Succinat auf Ubichinon übertragen werden. Damit verbunden ist eine um 60 % erhöhte ROS-Produktion, weil Sauerstoff als Elektronenakzeptor dient. Die Schutzmaschinerie gegen ROS wird überlastet, sodass zelluläre Komponenten stark geschädigt werden. Die Mutante altert schneller (mittlere Lebensspanne um 24 % verringert) (Honda et al., 1993).

1.2.4 Säuger

Die Rolle der Mitochondrien im Alterungsprozess der Säuger wird seit mehr als 20 Jahren intensiv bearbeitet. Bereits 1981 wurden mitochondriale Änderungen in Neuronen von Ratten während des Alterns beschrieben (Vanneste und van den Bosch de Aguilar, 1981). In letzter Zeit sind einige Arbeiten veröffentlicht worden, die wichtige Beiträge zum Verständnis der altersassoziierten Veränderungen der Mitochondrien liefern.

Morphologische Änderungen der Mitochondrien während des Alterns in Säugierzelllinien

Säugermitochondrien sind während des Alterns strukturellen und morphologischen Veränderungen unterworfen. In Myokard- und Skelettmuskelzellen konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien hinsichtlich ihrer Größe eine stärkere Varianz in späten Stadien aufweisen (Sachs et al., 1977; Beregi et al., 1988). Insbesondere das Auftreten von z. T. extrem großen Mitochondrien war auffällig. In Kulturen von humanen Endothelzellen der

Nabelschnurvene (HUVECs) wurde im alten Stadium mitochondriale Aggregationen um den Zellkern beobachtet, wobei sich in der Zellperipherie filamentöse Mitochondrien normaler Größe befanden, wie sie auch in jungen Zellen auftreten (Jendrach et al., 2005). Das Membranpotenzial der „alten“ Mitochondrien war stark erniedrigt. Dies wurde durch Färbung mit dem Farbstoff DASPMI (Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodid) gezeigt, dessen mitochondriale Aufnahme vom Membranpotenzial abhängig ist (Bereiter-Hahn, 1976). Neben der mitochondrialen Aggregation im seneszenten Stadium gibt es Hinweise auf eine erhöhte mitochondriale Teilungsaktivität während der replikativen Seneszenz in der humanen Lungenfibroblastenzelllinie MRC-5 (Lee et al., 2000; Lee et al., 2002). Die Erhöhung der Mitochondrienzahl ist mit verstärkter mtDNA-Synthese verbunden und korreliert mit verstärktem oxidativen Stress während des Alterns. Möglicherweise dienen die altersabhängigen mitochondrialen Veränderungen in MRC-5-Zellen als Kompensation für eine erniedrigte Aktivität der Atmungskette. Durch die erhöhte Mitochondrienzahl nimmt die Bildung von ROS jedoch weiter zu, sodass die Zellen in einen „Teufelskreis“ geraten und sterben (Übersicht bei: Lee und Wei, 2005).

Expression einer modifizierten mtDNA-Polymerase führt in Mäusen zu einer starken Beschleunigung des Alterungsprozesses und einer frühzeitigen Induktion der Apoptose

Während des Alterns von Nagern (Khaidakov et al., 2003), Affen (Schwarze et al., 1995) und Menschen (Corral-Debrinski et al., 1992) kommt es zu einer Akkumulation von Punktmutationen und Deletionen innerhalb der mtDNA. Die Bedeutung dieser Modifikationen für den Alterungsprozess wurde kontrovers diskutiert, weil sie nur relativ selten auftreten und lediglich eine korrelative Verbindung zum Altern bestand (Wallace, 2001). Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden homozygote Mausmutanten erstellt, die eine mtDNA-Polymerase (POLGA) ohne Korrekturfähigkeit („proof reading“) exprimieren (Trifunovic et al., 2004). POLGA^{mut}/POLGA^{mut}-Mäuse zeigen eine stark verringerte mittlere Lebensspanne von nur ca. 48 Wochen gegenüber Wildtypmäusen (85 Wochen). Altersabhängige Erscheinungen wie Gewichtsverlust, Haarverlust, Kyphose (Krümmung der Wirbelsäule), Osteoporose und Einschränkung der Fertilität treten stark verfrüht auf. Die Mutanten enthielten eine vergleichbare Menge an mtDNA, wobei nur 70 % der Moleküle die Wildtyplänge aufwiesen. Die Expression von Genen der mtDNA war jedoch davon unbeeinflusst, wie die Western-Blot-Analyse der Proteine COXI und COXII zeigte. Durch PCR-Analysen wurde jedoch gezeigt, dass der Anteil an Punktmutationen in den Mutanten um das drei- bis fünffache erhöht war. Im Herzgewebe der Mutanten konnte COX-Defizienz

und eine progressive Verringerung der Atmungskettenaktivität gezeigt werden. Die Rate der ATP-Produktion war ebenfalls erniedrigt. Diese Einschränkungen werden auf die erhöhte Punktmutationsrate zurückgeführt, die wahrscheinlich auch für das frühe Eintreten in die Seneszenzphase nach nur ca. 25 Wochen verantwortlich ist (Trifunovic et al., 2004). Um den Alterungsprozess in POLGA-Mutanten von *Mus musculus* näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Gewebe auf Apoptosemerkmale hin untersucht (Kujoth et al., 2005).

Die Apoptose („programmierter Zelltod“) ist von fundamentaler Bedeutung für zahlreiche Entwicklungsprozesse und dem Aufrechterhalten der Gewebemhomöostase, indem durch sie unnötige oder fehlregulierte Zellen gezielt eliminiert werden können. Fehler in der Apoptoseregulation können z. B. sowohl zu neurodegenerativen Erkrankungen als auch zur Entstehung von Tumorzellen führen. Mehrere Signalwege können zum Eintreten des programmierten Zelltods führen (Übersicht bei: Orrenius et al., 2003). Es wird hierbei zwischen (i) extrinsischem, (ii) intrinsischem, (iii) Caspase-2-abhängigem und (iv) Caspase-unabhängigem Weg unterschieden. In allen Fällen kommt es schließlich zur Kondensation des Zellkerns und des Cytoplasmas, wobei die Plasmamembran in bläschenartige Strukturen (engl. „blebs“) zerfällt. Die Zelltrümmer werden von Nachbarzellen oder Macrophagen aufgenommen.

Bereits die Wildtypkontrollen zeigten eine Zunahme apoptotischer Merkmale wie proteolytische Aktivierung der Effektorprotease Caspase-3 und Fragmentation der nukleären DNA in verschiedenen Geweben mit steigendem Alter. In den Mutanten kam es darüber hinaus wesentlich schneller zur Apoptoseinduktion. Diese Resultate belegen, dass der Verlust von lebensnotwendigen Zellen durch Apoptose ein Charakteristikum des Alterns bei Säugern ist (Kujoth et al., 2005). Welche Faktoren letztendlich den programmierten Zelltod während des Alterns auslösen, ist jedoch noch nicht bekannt.

1.3 Bedeutung und Regulation der mitochondrialen Dynamik

Mitochondrien sind dynamische Organellen, die miteinander fusionieren und sich teilen können (Übersicht bei: Bereiter-Hahn und Vöth, 1994). In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* z. B. treten Fusions- und Teilungsereignisse im mitochondrialen Netzwerk der Wildtypzellen ungefähr alle zwei Minuten auf (Nunnari et al., 1997). Wenn Mitochondrienteilung und -fusion ausgeglichen sind, bleibt die Morphologie dieser Organellen weitgehend konstant (Nunnari et al., 1997; Sesaki und Jensen, 1999). Wenn dieses Gleichgewicht jedoch auf eine Seite verlagert wird, treten morphologische Veränderungen auf, die sowohl für die Anpassung an unterschiedliche Umweltbedingungen (z. B. Nahrungsmittelangebot) als auch während entwicklungsbiologischer Prozesse eine entscheidende Rolle spielen (siehe Kap. 1.3.1 und 1.3.3).

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Komponenten der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsmaschinerie identifiziert. Diese werden von Vertretern zahlreicher Genfamilien kodiert, sind also eine heterogene Gruppe. Die entsprechenden Faktoren aus *S. cerevisiae*, *C. elegans* und Säugern werden in Kap. 1.3.2 vorgestellt. Kap. 1.3.3 beschreibt die Rolle dieser Komponenten in der Apoptoseregulation der genannten Modellorganismen.

1.3.1 Mitochondriale Fusion und Teilung

Mitochondriale Fusion

Die mitochondriale Fusion spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen entwicklungsbiologischen Vorgängen und wird darüber hinaus als Möglichkeit der Adaption an Umweltbedingungen angesehen.

Durch mitochondriale Fusion entstandene Mitochondrienetzwerke in *S. cerevisiae* wurden bereits 1973 durch Serien von Ultradünnschnitten und Analyse im Transmissions-elektronenmikroskop identifiziert (Hoffmann und Avers, 1973). Diese sind besonders stark bei Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Glycerin ausgeprägt (Stevens, 1977; Egner et al., 2002). Auch während zahlreicher Entwicklungsprozesse wie der Paarung haploider Hefezellen, der Meiose und der Sporulation diploider Stämme kommt es zu mitochondrialen Fusionen (Miyakawa et al., 1994; Nunnari et al., 1997). Während der Spermatogenese zahlreicher Insekten, wie z. B. der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, kommt es zur Bildung von „Riesenmitochondrien“, die das flagellenartige Axonema umgeben (Tates, 1971; Fuller, 1993). Ähnliche Änderungen der mitochondrialen Morphologie während der Spermatogenese sind auch bei Pflanzen (Renzaglia und Duckett, 1989), Nematoden (Kruger, 1991) und Mollusken (Hodgson und Bernard, 1986) beschrieben worden.

Durch Fusion resultierende mitochondriale Netzwerke erlauben theoretisch eine effiziente und koordinierte ATP-Produktion durch laterale Transmission des Membranpotenzials (Skulachev, 2001). Sowohl der Intermembranraum als auch die mitochondriale Matrix sind gute Leiter, die von der inneren Mitochondrienmembran mit hohem elektrischen Widerstand getrennt werden. Auf diese Weise könnte auch in sauerstoff- bzw. nährstoffarmen Regionen der Zelle eine effiziente ATP-Produktion gewährleistet werden. Mitochondriale Netzwerke würden demnach intrazelluläre „Protonenkabel“ darstellen. Ein experimenteller Hinweis, der die Hypothese unterstützt, ist die sofortige Depolarisation des gesamten mitochondrialen Retikulums, wenn eine kleine lokale Region dieses Netzwerks durch Laserbestrahlung beschädigt wird (Skulachev, 2001). Über die Verteilung des Membranpotenzials hinaus könnte auch der Transport von Sauerstoff und Fettsäuren durch die Netzwerke wesentlich effizienter sein (Skulachev, 1990). In der Tat wurde gezeigt, dass in Zellen pH-, Sauerstoff- und ATP-Gradienten vorkommen und Mitochondrien in verschiedenen Bereichen der Zelle unterschiedliche Membranpotenziale aufweisen können (Übersicht bei: Bereiter-Hahn und Vöth, 1994).

Eine weitere wichtige Aufgabe mitochondrialer Netzwerke liegt in der effizienten Pufferung von Calciumionen, die vom endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden (Frieden et al., 2004).

Calciumionen (Ca^{2+}) sind in der Zelle an der Signalübertragung bei vielen wichtigen Prozessen beteiligt. Hierzu gehören z. B. Zelldifferenzierung, Transportvorgänge, Zellmotilität, Genexpression, Transduktion von Stresssignalen, Stoffwechsel, Zellzyklus, Pathogenität und Apoptose (Mekalanos, 1992; Clapham, 1995; Pettersson et al., 1996; Sanders et al., 1999; Szalai et al., 1999; Pinton et al., 2001; Whitaker und Larman, 2001; Ikura et al., 2002). Normalerweise ist die Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma sehr niedrig (10^{-7} M) (Campbell, 1983). Nach Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus zellulären Speichern (z. B. dem endoplasmatischen Retikulum) bzw. Einstrom von Ca^{2+} aus dem extrazellulären Raum durch Calciumkanäle steigt die intrazelluläre Konzentration kurzzeitig sehr stark an. Mitochondrien können Ca^{2+} durch einen Calcium-Uniporter aufnehmen und speichern (Kirichok et al., 2004). Hierfür ist eine räumliche Nähe der Mitochondrien mit dem endoplasmatischen Retikulum bzw. mit Stellen des Ca^{2+} -Einstroms in der Plasmamembran entscheidend (Rizzuto et al., 1998; Csordas et al., 1999). Ca^{2+} fördert die Bildung von NADH durch Stimulation Ca^{2+} -abhängiger Dehydrogenasen und führt zu einer Steigerung der mitochondrialen ATP-Synthese (McCormack et al., 1990). Darüber hinaus werden weitere Ca^{2+} -sensitive Proteine aktiviert, wie z. B. Calmodulin (CaM). Nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen kann CaM andere Proteine durch Anlagerung aktivieren (Übersicht bei: Kortvely und Gulya, 2004). Ein identifizierter Interaktionspartner von CaM ist das Myosin NINAC, das beim Sehvorgang von Fliegen eine wichtige Rolle spielt (Porter, 1995). Verlust der CaM-Bindedomänen in NINAC führt zu einem abnormalen elektro-physiologischen Verhalten der Retina.

Dies wurde experimentell in Säugerzellen gezeigt, in denen Mitochondrienfragmentierung durch Überexpression des für die Teilung dienenden *hFis1*-Gens (siehe 1.3.2) induziert wurde. Die mitochondriale Calciumaufnahme wurde stark verlangsamt und fand nur noch vereinzelt statt (Frieden et al., 2004). Darüber hinaus ist die Ca^{2+} -vermittelte Apoptose-induktion in HeLa-Zellen mit fragmentierten Mitochondrien durch Überexpression von *Drp1* (siehe 1.3.2) ebenfalls herabgesetzt (Szabadkai et al., 2004) (siehe Kap. 1.3.3).

Mitochondriale Fusion ermöglicht nach Zellfusion die Komplementation in atmungsdefizienten Stämmen von *S. cerevisiae*, die bestimmte mitochondriale Mutationen enthalten (Clark-Walker und Miklos, 1975). Die Defekte der mtDNA des einen Stammes können durch die intakten Gene des anderen Stammes ausgeglichen werden und umgekehrt. Auf diese Weise entstehen funktionsfähige Mitochondrien. Dieser Prozess konnte auch in menschlichen Zellkulturen nachgewiesen werden (Ono et al., 2001). Hierfür wurden atmungsdefiziente Zellen fusioniert, die unterschiedliche tRNA-Mutationen aufwiesen. Die isolierten Hybridzellen waren respirationskompetent und zeigten eine normale enzymatische Ausstattung der Atmungskette. Dieser Befund belegt die erfolgreiche Komplementation in den Hybridzellen durch mitochondriale Fusion. Darüber hinaus zeigten Mäuse, die sowohl intakte als auch partiell deletierte mtDNAs enthielten, in verschiedenen Geweben vergleichbare Atmungsraten, obwohl die Verhältnisse zwischen den beiden mtDNA-Spezies stark variierten (Nakada et al., 2001). Durch diese und andere Arbeiten wurde der Befund, dass die mitochon-

driale Fusion vor schädlichen mtDNA-Mutationen schützen kann, erhärtet. Inzwischen konnte die Diffusion von mtDNA in fusionierten Mitochondrien auch mikroskopisch bestätigt werden (Legros et al., 2004).

Mitochondriale Teilung

Die Teilung von Mitochondrien wird bei der Zellteilung als notwendig angesehen, damit die Organellen effizient auf die Tochterzellen verteilt werden können (Übersicht bei: Bossy-Wetzel et al., 2003). Darüber hinaus kann die mitochondriale Teilung auch durch Umgebungsbedingungen induziert werden. Mitochondrienteilung führt z. B. in *S. cerevisiae* bei niedrigen Glucosekonzentrationen im Medium zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks (Stevens, 1981; Visser et al., 1995). Bäckerhefe zeigt darüber hinaus entwicklungsabhängig regulierte Mitochondrienfragmentierung. In der Präsporulationsphase kommt es zu starker Teilungsaktivität, bevor die Mitochondrien in der Sporulationsphase wieder miteinander fusionieren (Gorsich und Shaw, 2004). In den Ascosporen tritt im späten Tetradenstadium wieder mitochondriale Fragmentierung auf.

Starke Mitochondrienteilung wird bei einigen neurodegenerativen Krankheiten beobachtet. Mutationen in *Opal*, das für einen mitochondrialen Fusionsfaktor kodiert (siehe Kap. 1.3.2), können zur autosomalen dominanten optischen Atrophie (ADOA) führen (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Die mitochondriale Teilungsrate in Ganglionzellen der Retina ist sehr hoch, was möglicherweise zum Absterben der Zellen und zu einem progressiven Verlust des Sehvermögens bei Kindern führt. Es wird spekuliert, dass durch das Fehlen von mitochondrialen Netzwerken die elektrophysiologische Aktivität der retinalen Zellen beeinträchtigt ist (Übersicht bei: Bossy-Wetzel et al., 2003).

Die altersabhängige Mitochondrienfragmentierung in humanen Lungenfibroblasten in Kultur wurde bereits beschrieben (siehe Kap. 1.2.4). Darüber hinaus kommt es insbesondere während apoptotischer Prozesse zu einer starken Fragmentierung tubulärer Mitochondrien und mitochondrialer Netzwerke (Übersicht bei Desagher und Martinou, 2000). Interessanterweise vermag eine Veränderung der Expression von Komponenten der mitochondrialen Fusions- und Teilungsmaschinerie die apoptotische Antwort auf diverse Apoptoseinduktoren nachhaltig zu verändern. Diese Befunde werden in Kap. 1.3.3 vorgestellt, nachdem in Kap. 1.3.2 eine Übersicht an Faktoren der mitochondrialen Dynamik in verschiedenen Modellsystemen gegeben wurde.

1.3.2 Komponenten der mitochondrialen Teilungs- und Fusionsmaschinerie

Faktoren der mitochondrialen Fusion

Hinsichtlich des Ablaufs der mitochondrialen Fusion wurden insbesondere in *S. cerevisiae* wichtige Erkenntnisse gewonnen. Es handelt sich um einen Prozess, der in mehreren Schritten abläuft. Nach der Verankerung der Fusionspartner kommt es erst zur Fusion der äußeren und dann der inneren mitochondrialen Membran (Meeusen et al., 2004). Die Verschmelzung der äußeren Membranen benötigt eine niedrige GTP-Konzentration, während die Fusion der inneren Membranen von der Hydrolyse großer GTP-Mengen und dem Membranpotenzial abhängig ist (Meeusen et al., 2004). Die Regulation durch GTP beruht auf die Bedeutung der GTPasen ScFZO1 und ScMGM1 während der mitochondrialen Fusion (siehe Abb. 2).

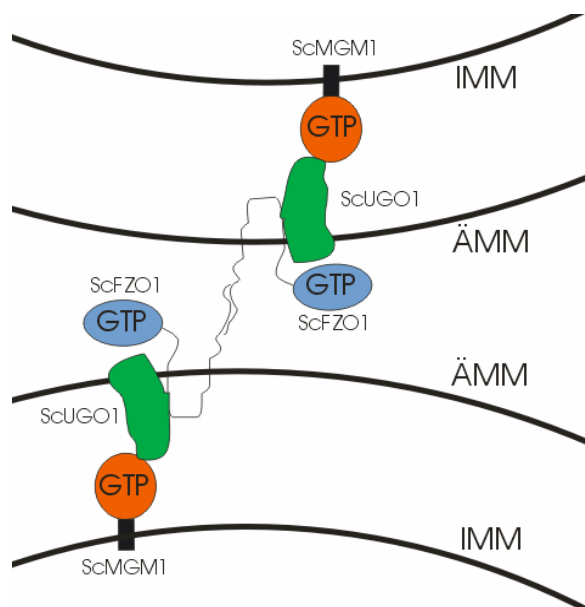


Abb. 2: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen Komponenten der mitochondrialen Fusionsmaschinerie bei *S. cerevisiae*. Zu fusionierende Mitochondrien werden durch Dimerisierung der GTPase ScFZO1 miteinander verankert. In Kooperation mit der GTPase ScMGM1 und ScUGO1 vermittelt ScFZO1 die Vereinigung der mitochondrialen Membranen. Während die Fusion der äußeren mitochondrialen Membranen (ÄMM) bei niedrigen GTP-Konzentrationen abläuft, sind für die Fusion der inneren mitochondrialen Membranen (IMM) höhere GTP-Mengen und das Membranpotenzial von Bedeutung (Meeusen et al., 2004). Modifiziert nach Pfanner et al., 2004.

ScFZO1 gehört zur Familie der großen Dynamin-verwandten GTPasen und besitzt in der Nähe des C-Terminus zwei Transmembrandomänen, mit denen sie in der äußeren mitochondrialen Membran verankert ist (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998). Die der inneren Membran zugewandte Schleife zwischen den Transmembrandomänen ist wahrscheinlich für die koordinierte Teilung der beiden Membranen notwendig (Fritz et al., 2001). Die GTPase-Domäne und ein kleiner Bereich des C-Terminus von ScFZO1 ragen in das Cytoplasma. Deletion von *ScFzo1* führt in Hefe zu einer starken mitochondrialen Fragmentierung, weil das Gleichgewicht auf die Seite der Mitochondrienteilung verlagert wird (Hermann et al., 1998). Darüber hinaus weisen $\Delta ScFzo1$ -Stämme Verlust der mtDNA auf (Rapaport et al., 1998). Durch zusätzliche Deletion des mitochondrialen Teilungsfaktors

ScDnm1 in Δ *ScFzo1*-Mutanten wird die Balance zwischen Teilung und Fusion wiederhergestellt und die Mitochondrienmorphologie normalisiert (Bleazard et al., 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Darüber hinaus ist die während der Paarung haploider Hefezellen beobachtete Mitochondrienfusion ebenfalls in den Deletionsstämmen gehemmt (Hermann et al., 1998). Zu ScFZO1 homologe Proteine wurden in Fliegen und Säugern beschrieben.

Bei dem homologen Protein von ScFZO1 aus *Drosophila melanogaster* handelt es sich um den ersten identifizierten molekularen Faktor, der für Mitochondrienfusionen notwendig ist (Hales und Fuller, 1997). DmFZO1 bindet während der Spermatogenese an Spermatidmitochondrien und trägt zur Bildung von „Riesenmitochondrien“ bei, die das flagellenartige Axonema umgeben (Tates, 1971; Fuller, 1993). *DmFzo1*-Mutantenmännchen sind steril und zeigen eine abnormale mitochondriale Morphologie während der Spermatogenese. Die Form der Spermatidmitochondrien erinnert im Querschnitt an Zwiebelschalen, woher die Bezeichnung „Fzo“ („fuzzy onions“) abgeleitet wurde (Hales und Fuller, 1997).

Säuger besitzen zwei ScFZO1-Homologe; bei Säugern wurden die Mitofusine 1 und 2 (MFN1 und MFN2) beschrieben (Santel und Fuller, 2001), die von manchen Autoren als FZO1A/FZO1B bezeichnet werden (z. B. von Sugioka et al., 2004). Beide Isoformen zeigen distinkte Expressionsmuster in unterschiedlichen Geweben von Ratten (Eura et al., 2003). *Mfn1* wird in Herz- und Hodengewebe stark exprimiert, wobei im Gehirn mehr MFN2 gebildet wird. In anderen untersuchten Geweben wie z. B. von Leber, Niere, Lunge und Magen sind die Mengen von *Mfn1* und *Mfn2* vergleichbar. Überexpression von *Mfn1* führt zu einer Verstärkung der mitochondrialen Vernetzung (Legros et al., 2002; Eura et al., 2003; Santel et al., 2003), wobei es bei *Mfn2*-Überexpression sowohl zur Bildung perinukleärer mitochondrialer Aggregate (Eura et al., 2003) als auch zu einer abnormal starken Vernetzung von Mitochondrien kommt (Santel und Fuller, 2001; Rojo et al., 2002). Deletion der Mitofusingen führt in Mäusen zu embryonaler Letalität (Chen et al., 2003), weil die mitochondriale Fusion unterbleibt (Eura et al., 2003).

Während ScFZO1 und Homologe in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind, befindet sich das zur Familie der großen Dynamin-verwandten GTPasen zählende Protein ScMGM1 (MGM: „mitochondrial genome maintenance“) im Intermembranraum und ist mit der inneren Membran assoziiert (Wong et al., 2000; Olichon et al., 2002) (siehe Abb. 2). Deletion von *ScMgm1* führt zu Mitochondrienfragmentierung mit mtDNA-Verlust; darüber hinaus kommt es nicht zur Mitochondrienfusion während der Paarung haploider Hefezellen (Sesaki et al., 2003a; Wong et al., 2003). Experimentelle Befunde deuten auf die Fähigkeit zur Homooligomerisierung von ScMGM1 hin (Shepard und Yaffe, 1999; Wong et al., 2003). Dieser Assemblierungsprozess ist für die Funktionalität des Proteins entscheidend. Zahlreiche Befunde deuten darauf hin, dass ScMGM1 durch die membranständige Serinprotease

ScRBD1 (Synonyme Bezeichnungen in der Literatur: ScPCP1, ScUGO2) proteolytisch reguliert wird, wobei das Verhältnis zwischen der großen membrangebundenen und der kleineren (d.h. geschnittenen) diffusiblen Isoform von Bedeutung für die mitochondriale Fusion zu sein scheint (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Ohne diese Protease der inneren Mitochondrienmembran kommt es zur Ausbildung eines Phänotyps, der weitgehend dem der *ScMgm1*-Deletionsmutanten entspricht.

Das ScMGM1-Homolog in Säugern, OPA1, wurde intensiv untersucht, weil Mutationen in dem kodierenden Gen schwerwiegende pathologische Konsequenzen haben (siehe Kap. 1.3.1). Erniedrigung der Menge dieses Fusionsfaktors durch siRNA führt zu starker mitochondrialer Fragmentierung (Delettre et al., 2000; Griparic et al., 2004). Die Überexpression von *Opal* führt ebenfalls zur Fragmentierung der Mitochondrien, was möglicherweise auf ein gestörtes Verhältnis zwischen kurzer und langer Isoform zurückzuführen ist (Misaka et al., 2002; Griparic et al., 2004). Bisher wurde jedoch noch nicht experimentell gezeigt, ob OPA1 ähnlich wie ScMGM1 proteolytisch reguliert wird. Da OPA1 über eine putative Erkennungssequenz für die proteolytische Prozessierung verfügt, ist eine Regulation der Aktivität des Säugerproteins wie in Hefe durchaus möglich (Übersicht bei: Bossy-Wetzel, 2003).

Neben den beiden Proteinen ScFZO1 und ScMGM1 aus der Familie der Dynaminverwandten GTPasen wurde in Hefe ein weiterer Faktor identifiziert, der für die mitochondriale Fusion essenziell ist, ScUGO1 (Sesaki und Jensen, 2001). ScUGO1 ist in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert, wobei der N-Terminus in das Cytoplasma ragt. Der C-Terminus befindet sich im Intermembranraum. ScUGO1 geht mit ScFZO1 und ScMGM1 einen ternären Komplex ein, der die innere und äußere Mitochondrienmembran miteinander verbindet (Sesaki und Jensen, 2004) (siehe Abb. 2). Zu fusionierende Mitochondrien befinden sich in räumlicher Nähe und können durch Dimerisierung der ScFZO1-Untereinheiten des „Fusionskomplexes“ miteinander verbunden werden, was eine wichtige Voraussetzung für den Fusionsprozess ist (Meeusen et al., 2004) (siehe Abb. 2). Bisher ist noch unbekannt, wie die eigentliche Vereinigung der Mitochondrien, bei der insgesamt vier Membranen koordiniert miteinander fusionieren müssen, vollzogen wird.

Faktoren der mitochondrialen Teilung

Die mitochondriale Teilung wird, wie die Fusion, von Proteinkomplexen koordiniert. In *S. cerevisiae* wurden die Faktoren ScDNM1, ScMDV1 (Synonyme Bezeichnungen in der Literatur: ScFIS2, ScGAG3 und ScNET2) und ScFIS1 (Synonyme Bezeichnung in der Literatur: ScMDV2) identifiziert, die miteinander interagieren (Tieu et al., 2002; Cervený und Jensen, 2003) (siehe Abb. 3). Wie die Fusionskomponenten ScFZO1 und ScMGM1 ist ScDNM1 ein Vertreter der Familie der großen Dynamamin-verwandten GTPasen (Gammie et al., 1995). ScDNM1 verfügt über folgende Domänen: N-terminale Dyn-N-Domäne (GTPase-Aktivität), mittlere Domäne (Dyn-M) und GTPase-Effektordomäne (Regulation der GTPase-Aktivität) (Übersicht bei: Praefcke und McMahon, 2004). Die drei genannten Domänen sind vermutlich auch an der ScDNM1-Homooligomerisierung beteiligt, die bei dem ScDNM1-Homolog der Säuger (DRP1) *in vitro* zur Bildung von ring- und spiralenartigen Strukturen führt (Smirnova et al., 1998; Shin et al., 1999; Fukushima et al., 2001; Smirnova et al., 2001). Experimente zur subzellulären Lokalisation von ScDNM1 zeigen, dass das Protein im Cytoplasma vorliegt und nach Aktivierung durch ein (bisher nicht bekanntes) Signal an die Mitochondrienmembran bindet und dort mit ScMDV1 und ScFIS1 komplexiert (Otsuga et al., 1998; Bleazard et al., 1999). Shaw und Nunnari (2002) stellten ein Modell vor, nachdem die GTP-gebundene Form von ScDNM1 oligomerisiert und einen Ring um das zu teilende Mitochondrium bildet (siehe Abb. 3). Kontraktion dieses Ringes führt zur Einschnürung und Umstrukturierung der beiden mitochondrialen Membranen. Durch Hydrolyse des von ScDNM1 gebundenen GTP kommt es schließlich zur Disassemblierung des ScDNM1-ScMDV1-ScFIS1-Komplexes und der Trennung der Mitochondrien. Wodurch geeignete Teilungsstellen auf dem Mitochondrium bestimmt werden und welche Konformation der hypothetische Teilungsring *in vivo* hat, ist jedoch noch nicht geklärt.

Die Frage, ob ScDNM1 (bzw. die jeweiligen homologen Proteine in anderen Systemen) selbst als Mechanoenzym wirkt und direkt an der Membrankonstriktion beteiligt ist oder ob es dafür zusätzliche, bisher nicht identifizierte Komponenten rekrutiert, ist ebenfalls noch ungelöst.

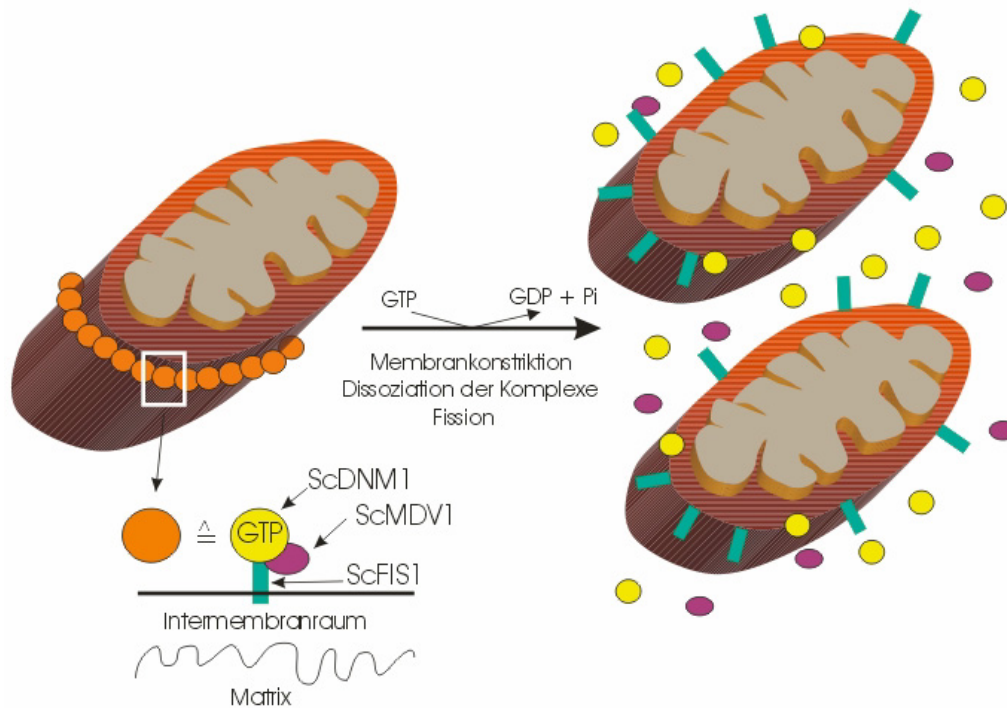


Abb. 3: Vereinfachtes Modell der mitochondrialen Teilung in *S. cerevisiae*. Die GTP-gebundene Form von ScDNM1 (gelber Kreis) bindet an ScFIS1 (grünes Rechteck) in der äußeren mitochondrialen Membran. ScMDV1 (violette Ellipse) assoziiert mit dem ScDNM1-ScFIS1-Komplex und ist ebenfalls für die mitochondriale Teilung in Hefe wichtig. ScMDV1-Homologe wurden in höheren Eukaryoten bisher jedoch nicht beschrieben. Die ScDNM1-ScFIS1-ScMDV1-Komplexe (orangefarbene Kreise) oligomerisieren mit Hilfe der Bindedomänen von ScDNM1, sodass es zur Ausbildung eines Ringes um das zu teilende Mitochondrium kommt. Nach der Konstriktion der beiden mitochondrialen Membranen kommt es zur Hydrolyse des gebundenen GTPs. Die ScDNM1-ScFIS1-ScMDV1-Komplexe dissoziieren, bevor die Teilung der Mitochondrien abgeschlossen ist. Modifiziert nach Shaw und Nunnari, 2002.

Überexpression des *ScDnm1*-homologen Gens von *C. elegans*, *CeDrp-1*, führt zu starker mitochondrialer Fragmentierung (Labrousse et al., 1999). In Hefe wird dagegen lediglich eine geringe Zunahme an Zellen mit fragmentierten Mitochondrien beobachtet, wenn *ScDnm1* überexprimiert wird (Fukushima et al., 2001). In Säugerzellen kommt es nur im Fall einer starken Überexpression des *ScDnm1*-homologen Gens *Drp1* (Synonym: *Dlp1*), zu mitochondrialer Fragmentierung (Smirnova et al., 1998; Szabadkai et al., 2004).

Hefemutanten, in denen *ScDnm1* deletiert ist, zeigen aggregierte und stark vernetzte Mitochondrien, die auf eine erhöhte Fusionsaktivität dieser Organellen aufgrund des fehlenden Teilungsfaktors ScDNM1 zurückgeführt wird (Otsuga et al., 1998; Bleazard et al., 1999). Die Balance zwischen mitochondrialer Fusion und Teilung wird wieder ausgeglichen, wenn das für die Fusion verantwortliche Gen *ScFzo1* (siehe oben) ebenfalls deletiert wird (Bleazard et al., 1999; Sesaki und Jensen, 1999). Dies bestätigt die Existenz eines dynamischen Gleichgewichts zwischen der Teilung und der Fusion der Mitochondrien. In anderen Systemen wie *Arabidopsis thaliana* (Arimura und Tsutsumi, 2002; Jin et al., 2003), dem Nematoden *C. elegans* (Labrousse et al., 1999) und Säugerzellen (Smirnova et al., 2001) führt fehlende Aktivität des ScDNM1-homologen Proteins ebenfalls zu einer verstärkten

mitochondrialen Fusion und somit zu einer veränderten Morphologie der Mitochondrien. Auf organismischer Ebene zeigen die Mutanten unterschiedliche Effekte. Während die Herunterregulation der *CeDrp-1*-Expression durch siRNA in einem frühen Entwicklungsstadium von *C. elegans* letal ist (Labrousse et al., 1999) (siehe Kap. 1.3.3), sind *ScDnm1*-Deletionsstämme lebensfähig, neigen aber insbesondere bei der Anzucht auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu mtDNA-Verlust (Hanekamp et al., 2002). Der Grund hierfür ist noch nicht bekannt. Außerdem ist bei diploiden $\Delta ScDnm1/\Delta ScDnm1$ - Stämmen die Segregation der Mitochondrien während der Ascosporengese eingeschränkt, sodass viele Nachkommen (27 %) nicht lebensfähig sind (Gorsich und Shaw, 2004). Weiterhin bilden ca. 13 % der gekeimten Sporen aufgrund der eingeschränkten Transmission von mtDNA-Nucleoiden „petite“-Kolonien aus, die nur bei Anzucht auf fermentierbaren Kohlenstoffquellen lebensfähig sind. Ähnliche Einschränkungen werden bei der Inaktivierung von ScFIS1 und ScMDV1 beobachtet (Gorsich und Shaw, 2004). In Mutanten anderer Systeme (z. B. *A. thaliana* und Säugerzelllinien), bei denen die Aktivität des ScDNM1-homologen Proteins verringert bzw. ausgeschaltet worden ist, wurde bisher nicht eingehend untersucht, ob sich die veränderte Mitochondrienmorphologie auf Parameter wie z. B. Wachstumsrate, Fertilität und Lebensspanne auswirkt.

Interaktionspartner von ScDNM1 sind, wie bereits erwähnt, ScFIS1 und ScMDV1 (Tieu und Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002; Cerveny und Jensen, 2003). Bei ScFIS1 handelt es sich um ein relativ kleines Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran (Mozdy et al., 2000). Der Großteil des Proteins ragt in das Cytoplasma, wobei drei Tetratricopeptidwiederholungen vermutlich an der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind.

Tetratricopeptidwiederholungen sind Strukturmodule mit einer Länge von ca. 34 Aminosäuren, die in zwei zusammengelagerten α -Helices angeordnet sind. Sie treten z. B. in leichten Kinesinketten, sekretorischen SNAP-Proteinen, schweren Clathrinketten und bakteriellen Aspartylphosphat-Dehydrogenasen auf (Übersicht bei: Andrade et al., 2001).

ScFIS1 ist diffus über die Oberfläche des Mitochondriums verteilt (Mozdy et al., 2000). Die mitochondriale Morphologie von $\Delta ScFis1$ -Mutanten erinnert mit dem Auftreten von aggregierten und stark vernetzten Mitochondrien an $\Delta ScDnm1$ -Stämme (Mozdy et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000). In Säugern ist ein Homolog von ScFIS1 beschrieben worden, HFIS1 (James et al., 2003; Yoon et al., 2003). Überexpression von *hFis1* führt zu mitochondrialer Fragmentierung (allerdings nur, wenn DRP1 anwesend ist), während Erniedrigung der HFIS1-Menge (z. B. durch RNAi) zu einer erhöhten mitochondrialen

Interkonnektivität und zur Ausbildung von stark elongierten Mitochondrien führt (James et al., 2003; Yoon et al., 2003; Stojanovski et al., 2004).

Im Gegensatz zu ScFIS1 wurden ScMDV1-Homologe bisher nicht in den Genomen mehrzelliger Eukaryoten gefunden (Übersicht bei: Shaw und Nunnari, 2002). Δ ScMdv1-Stämme zeigen ebenfalls eine starke mitochondriale Aggregation (Fekkes et al., 2000; Cervený et al., 2001). ScMDV1 enthält zahlreiche Domänen, mit denen das Protein mit anderen Komponenten interagieren könnte: Neben einer N-terminalen Extension sind eine „coiled coil“-Domäne und sieben WD40-Wiederholungen beschrieben worden (Fekkes et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cervený et al., 2001). ScMDV1 ist peripher mit der cytoplasmatischen Seite der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Fekkes et al., 2000; Tieu und Nunnari, 2000; Cervený et al., 2001). Möglicherweise bindet ScMDV1 an ScDNM1, nachdem dieses an ScFIS1 gebunden hat und initiiert anschließend die mitochondriale Teilung (Tieu et al., 2002).

Die bisher in diesem Kapitel beschriebenen Faktoren der mitochondrialen Teilung beziehen sich ihrer Wirkung nach auf die äußere mitochondriale Membran. Die Teilung der inneren mitochondrialen Membran wird wahrscheinlich von einer anderen Maschinerie durchgeführt. Der folgende Befund legt dies nahe: Sowohl in *C. elegans* als auch in Hefe findet die Teilung der inneren mitochondrialen Membran weiter statt, wenn CeDRP-1 bzw. ScFIS1 inaktiviert werden (Labrousse et al., 1999; Jakobs et al., 2003). Eine putative Komponente zur Teilung der inneren Membran ist das Hefeprotein ScMDM33 (Messerschmitt et al., 2003). Fehlen dieses Faktors führt u. a. zu einer ringförmigen Mitochondrienmorphologie. Ob die Aktivität von ScMDM33 mit den Proteinkomplexen zur Teilung der äußeren Mitochondrienmembran koordiniert wird und ob es zu Interaktionen zwischen den Komponenten kommt, ist bisher noch nicht bekannt.

1.3.3 Bedeutung der mitochondrialen Dynamik für apoptotische Prozesse

Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle in den meisten Formen der Apoptose (Übersicht bei: Orrenius et al., 2003). Neben mitochondrialer Fragmentierung und Verlust des Membranpotenzials setzen Mitochondrien diverse Faktoren frei, die den Ablauf der Apoptose vorantreiben. Hierzu gehören u. a. Cytochrom-c, Smac/DIABLO und AIF (Apoptoseinduzierender Faktor) (Übersicht bei: Wang, 2001). Die Beteiligung der mitochondrialen Fusions- und Teilungsmaschinerie (Kap. 1.3.2) an strukturellen Änderungen während der Apoptose wurde bisher in Säugerzellen (Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2002; Lee et al., 2004; Sugioka et al., 2004), *S. cerevisiae* (Fannjiang et al., 2004) und *C. elegans* (Jagasia et al., 2005) untersucht.

Mitochondriale Dynamik und Apoptose in Säugerzelllinien

Die Bedeutung des ScDNM1-homologen Säugerproteins DRP1 für die durch Chemikalien induzierte Apoptose wurde in COS-7-Zellen (Nierenepithelzellen von Affen) untersucht (Frank et al., 2001). Nach Stimulation der Apoptose mit dem Protein Kinase C-Inhibitor Staurosporin (STS) kam es zu mitochondrialer Fragmentierung und Translokation von DRP1 aus dem Cytoplasma zur äußeren Mitochondrienmembran. Darüber hinaus vermochte das durch Austausch einer essenziellen Aminosäure in der GTPase-Domäne inaktive DRP1_{K38A} nach STS-Stimulation die Apoptose zu inhibieren; wichtige Apoptosemarker wie Cytochrom-c-Freisetzung, Depolarisation der inneren mitochondrialen Membran und DNA-Fragmentierung im Zellkern traten in diesem Fall nicht mehr auf. Ein weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung von DRP1 an apoptotischen Prozessen ist seine Kollokalisierung mit dem proapoptotischen BAX-Protein auf der äußeren Mitochondrienmembran (Frank et al., 2001; Karbowski et al., 2002).

BAX und BAK gehören zur Familie der BCL-2-Proteine und bilden nach apoptotischer Stimulation eine oligomere Porenstruktur in der äußeren mitochondrialen Membran, wodurch diese permeabel für proapoptotische Moleküle wird (Übersicht bei: Desagher und Martinou, 2000). Dies führt zum Beispiel zur Cytochrom-c-Freisetzung und Aktivierung der Procaspase 9, die ihrerseits Effektorcaspasen aktiviert, welche die Apoptose vorantreiben.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DRP1 mit dem antiapoptotischen BCL-2-Protein um HFIS1-Bindestellen auf der äußeren Membran konkurriert (Kong et al., 2005). Verdrängung von BCL-2 durch DRP1 erhöht die Bereitschaft der Mitochondrien, proapoptotische Faktoren (siehe oben) in das Cytoplasma zu entlassen, indem der Schwellenwert für die Ca²⁺-induzierte mitochondriale Permeabilitätstransition herabgesetzt wird (Kong et al., 2005).

In HeLa-Zellen, in denen DRP1-Aktivität durch shRNA („small hairpin RNA“) stark erniedrigt ist, kommt es neben mitochondrialer Elongation zu einer Erhöhung der Apoptoseresistenz gegenüber Stimuli wie STS, Actinomycin D (Inhibitor der Transkription), Etoposid (Topoisomerasehemmer) und α -Fas (Aktivator von Apoptoseinduzierenden Fas-Rezeptoren) (Lee et al., 2004). Trotz des Verlustes von DRP1 konnte BAX an die Mitochondrienmembran binden; es kam jedoch nicht zur Freisetzung von Cytochrom-c (Lee et al., 2004). Diese Befunde deuten darauf hin, dass DRP1 bei der Cytochrom-c-Auschüttung eine wichtige Rolle spielt. In HeLa-Zellen, die DRP1 überexprimieren, wurde gezeigt, dass die Apoptosestimulation durch STS-Applikation wesentlich effizienter als im Normalfall verläuft (Szabadkai et al., 2004). Umgekehrt sind diese Zellen gegenüber der C₂-Ceramid-vermittelten Apoptose gegenüber resistenter (Szabadkai et al., 2004). C₂-Ceramid induziert

die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytoplasma (Pinton et al., 2001). Der darauf folgende Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration führt zur Permeabilitätserhöhung der äußeren Membran, zum Verlust des Membranpotenzials und schließlich zur Apoptose. In Zellen, die *Drp1* stark überexprimieren, ist das mitochondriale Netzwerk weitgehend fragmentiert, was zu einer gehemmten Ca^{2+} -Aufnahme und -Ausbreitung in den Mitochondrien führt, sodass die apoptotische Reaktion wesentlich schwächer ist (Szabadkai et al., 2004).

Ein weiterer Faktor der mitochondrialen Teilung, HFIS1, wurde wie DRP1 ebenfalls durch shRNA in HeLa-Zellen herunterreguliert (Lee et al., 2004). Dies führt neben mitochondrialer Elongation ebenfalls zu einer ausgeprägten Apoptoseresistenz, die noch wesentlich stärker als bei den DRP1-shRNA-Zellen ausgeprägt ist. Die Überexpression von *hFis1* hat hingegen in HeLa-Zellen Mitochondrienfragmentierung, Cytochrom-c-Freisetzung und schließlich Apoptose zur Folge (James et al., 2003).

Neben der Bedeutung mitochondrialer Teilungsfaktoren für die Apoptose wurden auch Fusionsproteine wie OPA1 (Olichon et al., 2003; Lee et al., 2004) und FZO1A bzw. FZO1B (Sugioka et al., 2004) getestet, ob sie den programmierten Zelltod beeinflussen. Herunterregulation von OPA1, dass für die Fusion der inneren Mitochondrienmembran dient (Kap. 1.3.2), induziert in HeLa-Zellen mitochondriale Fragmentierung, Verlust des Membranpotenzials und Cristaeaberration (Olichon et al., 2003) und führt dazu, dass ca. 25-35 % der Zellen spontan sterben (Lee et al., 2004). Interessanterweise zeigen Zellen, die HFIS1- und OPA1- depletiert sind, zwar starke mitochondriale Fragmentierung, aber auch deutliche Resistenz gegenüber der Wirkung apoptotischer Stimuli (Lee et al., 2004). Die zusätzliche Verringerung von HFIS1 in Zellen mit OPA1-Mangel bewirkt, dass das Membranpotenzial trotz der mitochondrialen Fragmentierung erhalten bleibt.

Im Falle des Fusionsprotein MFN2 konnte gezeigt werden, dass es wie das Teilungsprotein DRP1 ebenfalls mit dem proapoptotischen Faktor BAX auf der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert (Karbowski et al., 2002). Nähere Untersuchungen deuteten darauf hin, dass BAX die mitochondriale Fusion inhibiert, obwohl genauere Daten bisher noch nicht vorliegen (Karbowski et al., 2004). Proteine der mitochondrialen Fusionsmaschinerie haben eine antiapoptotische Wirkung (Sugioka et al., 2004). Herunterregulation von MFN1/2 (bzw. FZO1A/B) führt zu mitochondrialer Fragmentierung und einer Erhöhung der Sensitivität gegenüber der Etoposid-vermittelten Apoptose. Darüber hinaus führt die Überexpression der genannten Faktoren zu einer verstärkten Apoptoseresistenz (Sugioka et al., 2004).

Die an Säugern gewonnenen Daten zeigen, dass in den meisten Fällen eine verstärkte mitochondriale Fusion zu einer verbesserten Widerstandsfähigkeit gegenüber diverse apop-

totische Stimuli führt. Umgekehrt führt eine vermehrte Mitochondrienteilung zu einer gesteigerten Empfänglichkeit für Apoptoseinduktoren. Die Ausnahme dieser Regel stellt die C₂-Ceramid-vermittelte Apoptose dar.

Mitochondriale Dynamik und Apoptose in Hefe

Im Laufe der letzten Jahre wurden zahlreiche Hinweise erhalten, dass *S. cerevisiae* über apoptotische Mechanismen verfügt (Übersicht bei: Madeo et al., 2002a). Sterbende Hefezellen zeigen Merkmale apoptotischer Säugerzellen, wie z. B. Degradation der genomischen DNA, Kondensation des Chromatins und Freilegung des Plasmamembranlipids Phosphatidylserin (Madeo et al., 1997; Madeo et al., 1999). Darüber hinaus konnte belegt werden, dass in Hefe diverse Komponenten einer apoptotischen Maschinerie existieren, wie z. B. Metacaspasen (Madeo et al., 2002b). Eine wichtige Bedeutung der Apoptose für *S. cerevisiae* ist die Entfernung alter und beschädigter Zellen aus der Kultur, die ansonsten akkumuliert werden und das Wachstum der jüngeren Zellen hemmen (Herker et al., 2004).

Ähnlich wie in Säugerzelllinien wurde auch in Hefe untersucht, welchen Einfluss Komponenten des mitochondrialen Teilungs- und Fusionsapparates auf die durch chemische Stimulation hervorgerufene Apoptose haben (Fannjiang et al., 2004). Zur Elicitation der Apoptose wurden Essigsäure (signalisiert hohe Zelldichte in der Kolonie, Madeo et al., 1997) und Wasserstoffperoxid (ROS, Madeo et al., 1999) verwendet. Die Apoptosesensitivität in den Deletionsmutanten $\Delta ScFis1$, $\Delta ScDnm1$ bzw. $\Delta ScMdv1$ (siehe Kap. 1.3.2) wurde analysiert. Hierbei zeigte sich, im Gegensatz zu HFIS1-depletierten Säugerzellen, dass $\Delta ScFis1$ -Mutanten eine stark erhöhte Apoptoseempfindlichkeit gegenüber dem Wildtyp aufwiesen (Fannjiang et al., 2004). Wenn zusätzlich das Metacaspasegen *ScYca1* deletiert wurde ($\Delta ScFis1 \Delta ScYca1$), entsprach die Sensitivität gegenüber apoptotischen Stimuli wieder der des Wildstammes. $\Delta ScDnm1$ - bzw. $\Delta ScMdv1$ -Mutanten zeigen dagegen eine erhöhte Apoptoseresistenz als der Wildtyp. ScFIS1 scheint seine antiapoptotische Wirkung durch Hemmung von ScDNM1 zu entfalten. Hierfür spricht die reduzierte mitochondriale Fragmentierung in $\Delta ScFis1 \Delta ScDnm1$ - und $\Delta ScDnm1$ -Stämmen im Vergleich zu $\Delta ScFis1$ -Mutanten nach Essigsäure-vermittelter Apoptoseinduktion. Möglicherweise hat ScDNM1 neben der mitochondrialen Fragmentierung noch eine andere Aufgabe im Verlauf der Apoptose, weil es auch in $\Delta ScDnm1$ -Mutanten letztendlich zu mitochondrialer Fragmentierung kommt. Diese wird durch die *ScDnm1*-Deletion lediglich verzögert (Fannjiang et al., 2004).

Bedeutung von CeDRP-1 in der Apoptose von C. elegans

Während der Entwicklungsphase von *C. elegans* tritt apoptotischer Zelltod einer festgelegten Anzahl von Zellen auf (Sulston und Horvitz, 1977; Sulston et al., 1983). Die Beteiligung von vier Genprodukten an der Apoptose in diesem System wurde beschrieben. Hierbei handelt es sich um CeEGL-1 (proapoptotisches Protein), CeCED-9 (apoptotisches Regulatorprotein), CeCED-4 (Caspase-aktivierender Faktor) und CeCED-3 (Caspase) (Übersicht bei: Horvitz, 1999) (siehe Abb. 4).

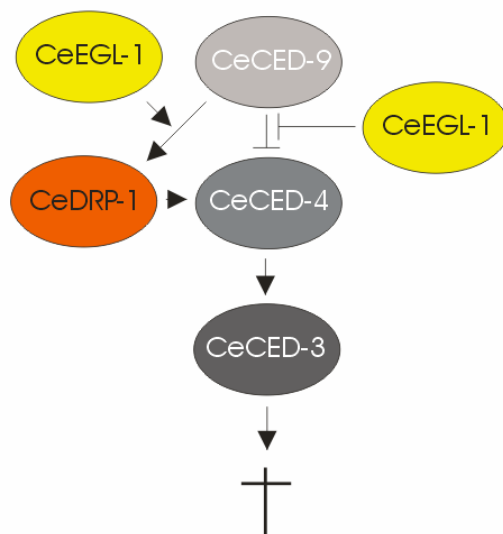


Abb. 4: Apoptoseinduktion in *C. elegans*. In Zellen, die durch Apoptose eliminiert werden sollen, ist das proapoptotische Protein CeEGL-1 aktiv. Es hemmt die antiapoptotische Funktion von CeCED-9 und führt zur Aktivierung des mitochondrialen Teilungsfaktors CeDRP-1 in Kooperation mit CeCED-9. Durch erhöhte mitochondriale Fragmentierung kann CeCED-4 effizienter aus den Mitochondrien freigesetzt werden und daraufhin die cytoplasmatische Caspase CeCED-3 aktivieren. Schließlich kommt es zum Tod der Zelle. Modifiziert nach Jagasia et al. 2005.

Während der Apoptose kommt es wie in anderen untersuchten Systemen auch in *C. elegans* zu einer Fragmentierung der Mitochondrien (Jagasia et al., 2005). Das an der mitochondrialen Teilung beteiligte CeDRP-1-Protein spielt in dem apoptotischen Prozess bei *C. elegans* eine wichtige Rolle (Jagasia et al., 2005). Dem Modell nach wird CeDRP-1 hierbei von CeEGL-1 /CeCED-9-Komplexen aktiviert und führt zur Mitochondrienfragmentierung, durch die CeCED-4 verstärkt freigesetzt wird (siehe Abb. 4). CeCED-4 aktiviert im Cytoplasma die Caspase CeCED-3, was schließlich zum Zelltod führt (Jagasia et al., 2005).

Interessanterweise kann eine verstärkte mitochondriale Fragmentierung in *C. elegans* im Gegensatz zu Säugern *per se* zur Apoptoseinduktion führen (Lee et al., 2004; Jagasia et al., 2005).

2. Problemstellung

Wie in Kap. 1.2 beschrieben, sind Mitochondrien in vielfältiger Weise an Alterungsprozessen in unterschiedlichen Modellorganismen beteiligt. Viele Mechanismen und Faktoren, die das Altern beeinflussen, scheinen konserviert zu sein. In dem in dieser Arbeit untersuchten Ascomyzeten *P. anserina* treten z. B. altersabhängige Reorganisationen der mtDNA auf, die zu einem Verlust lebensnotwendiger Gene führen können (Kap. 1.2.2). In Menschen wurden ebenfalls Umstrukturierungen des mitochondrialen Genoms in unterschiedlichen Geweben mit fortschreitendem Alter beschrieben (Cortopassi und Arnheim, 1990; Hattori et al., 1991; Katayama et al., 1991; Corral-Debrinski et al., 1992). Umgekehrt treten manche Faktoren, die die Lebensspanne beeinflussen, nur in einigen Modellsystemen auf. Hierzu gehört z. B. die Induktion der alternativen Oxidase in vielen langlebigen *P. anserina*-Mutanten, wie z. B. *grisea*, *ex1*, *PaCox5::ble* und *PaCox17::ble* (siehe Kap. 1.2.2). Diese Modifikation in der Atmungskette kann in *S. cerevisiae* und Säugern nicht beobachtet werden, da diesen Organismen eine alternative terminale Oxidase der oxidativen Phosphorylierung fehlt. Der Fragestellung, wie die Atmungskette im Falle der exklusiven PaAOX-abhängigen Respiration in der unsterblichen Mutante *ex1* hinsichtlich der Zusammensetzung und kinetischer Eigenschaften des Elektronentransports charakterisiert ist, soll in der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Über die funktionalen Eigenschaften der Mitochondrien hinaus ist auch die Morphologie dieser Organellen altersabhängiger Änderungen unterworfen. Dieser Aspekt wurde insbesondere in Säugerzelllinien untersucht (siehe Kap. 1.2.4). In *P. anserina* wurden bisher ultrastrukturelle mitochondriale Veränderungen wie z. B. der Cristaemorphologie im seneszenten Stadium analysiert (siehe Kap. 1.2.2). Hinsichtlich der Gestalt der Mitochondrien in verschiedenen Altersstadien ist nur sehr wenig bekannt. Bisher steht nur fest, dass der *P. anserina*-Wildstamm „S“ im mittelalten Stadium filamentöse Mitochondrien aufweist (Jamet-Vierny et al., 1997). Ob und in welchem Ausmaß es zu Veränderungen der mitochondrialen Morphologie während des Alterns im Wildstamm „s“ und der Mutante *grisea* kommt, wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert.

Im Rahmen der Diplomarbeit „Altersabhängige Transkriptionsprofile kupferregulierter Gene des Ascomyceten *Podospora anserina*“ wurden einige Gene identifiziert, die spezifisch in juvenilen Isolaten der Mutante *grisea* transkribiert werden, jedoch nicht in juvenilen Kulturen des Wildstammes „s“ (Tinazli, 2002). Eines dieser Gene kodiert für ein Protein, das signifikante Homologie zu mitochondrialen Teilungsfaktoren wie z. B. ScDNM1, CeDRP-1 und Säuger-DRP1 zeigt, und daher als *PaDnm1* bezeichnet wurde. In der vorliegenden Arbeit

wird *PaDnm1* als putativer mitochondrialer Teilungsfaktor charakterisiert. Insbesondere die Modulation der *PaDnm1*-Expression durch Überexpression bzw. Deletion soll zeigen, welchen Einfluss *PaDnm1* auf die mitochondriale Morphologie und andere phänotypische Parameter wie z. B. die Lebensspanne hat.

3. Materialien

3.1 Stämme

3.1.1 *P. anserina*

Wildstamm s (Esser, 1974)

Mutante grisea (Prillinger und Esser, 1977)

Mutante ex1 (Kück et al., 1985b)

3.1.2 *E. coli*

XL1Blue (Stratagene)

KS272 (pKOBEG) (Chaverroche et al., 2000)

3.2 Plasmide und Cosmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pAN7-1	enthält <i>Hph</i> -Kassette	Punt et al., 1987
pBSSK+	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor	Stratagene
p <i>PaDnmI</i>	kompletter <i>PaDnmI</i> -cDNA-Klon	diese Arbeit
p <i>DnmI</i> KO1	Austauschvektor (5'-Flanke)	diese Arbeit
p <i>DnmI</i> KO2	Austauschvektor (5'- und 3'-Flanke)	diese Arbeit
p <i>Hph</i> -1	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor	Roche
pKO3	Austauschvektor ohne Flanken	Hamann et al., 2005
pMy60	enthält <i>S. carlsbergensis</i> -rDNA	Verbeet et al., 1983
p <i>PaDnmI</i>	enthält genom. Sequenz von <i>PaDnmI</i>	Tinazli, 2002
p <i>PGpd</i>	enthält 1,9 kbp <i>PaGpd</i> -Promotor	diese Arbeit
p <i>PGpd-PaDnmI</i>	<i>PaDnmI</i> -Überexpressionsvektor	diese Arbeit
pRP81-1	enthält <i>PaGpd</i> inkl. Promotor	Ridder und Osiewacz, 1992
pSP17	enthält pIDNA	Stahl et al., 1982
Cosmid	Beschreibung	Referenz
#7C5	enthält <i>PaDnmI</i> -Locus	Tinazli, 2002
#42B8	enthält <i>PaDnmI</i> -Locus	Tinazli, 2002
#42D9	enthält <i>PaDnmI</i> -Locus	Tinazli, 2002
Δ <i>DnmI</i> #42B8	<i>PaDnmI</i> -Austauschcosmid	diese Arbeit

3.3 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Länge [bp]	Sequenz (5'-3')*
BcuI-Dnm1	25	<u>GACTAGT</u> GCTGCCGAGTGGAAAGTGG
Dyn1	18	TTTGGTAAGGATGGCGCC
Dyn2	18	TCTGAACCACGTCCTTGC
Dyn3	18	GGACGTGGTTCAGAACCG
Dyn4	18	CCCTTGTCCTGTTCAACCG
Dyn5	18	CGTAAACGAGCTCAACGC
Dyn6	18	CCAGCCCAGCTTCAGAGG
Dyn7	18	ATTCGGTAGCTAGCGGC
Dyn8	18	GGCGACGACCTATTGGCG
Dyn9	18	CCCGGTCCTTCACTGGCC
Dyn10	18	ATGGCCTAGTTCACCCCC
Dyn12	18	GCTCTGTGGTGGCGCCCG
EM7-for1	29	<u>CGGGATCCT</u> GTTGACAATTAATCATCGGC
KoDnm1	26	TT <u>GGTACC</u> ACGACTGACGATTTGCC
KoDnm2	26	CCAAGCTTGATTTTCTGTGCAGGGCC
KoDnm3	26	AA <u>ACTAGT</u> TATATTCGGGGGTCAAGG
KoDnm4	28	AAGCGGCCGCACATGATGGCGGAGAGG
KoDnm5	18	CAAGAGCCCGACCCAGGC
KoDnm6	18	GTAGTTTTGATCGGCCCC
PGpd-for	25	CG <u>CAATTGA</u> ATTCCTCACCAACCC
SmaI-Dnm1	25	<u>GCCCGGG</u> ATGGCCGCTCTCGGCGAC
SmaI-PromGpd2	26	<u>GCCCGGG</u> TGTTGGTGAAGAGAGAGAG
XhoI-Dnm1	26	GG <u>CTCGAG</u> CATCTCTCCTAGATCACC

* Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen

3.4 Enzyme

3.4.1 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas	<i>Pst</i> I	MBI Fermentas
<i>Bcu</i> I	MBI Fermentas	<i>Pvu</i> II	MBI Fermentas
<i>Bgl</i> II	MBI Fermentas	<i>Sal</i> I	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas	<i>Sma</i> I	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RV	MBI Fermentas	<i>Ssp</i> I	MBI Fermentas
<i>Hind</i> III	MBI Fermentas	<i>Xho</i> I	MBI Fermentas
<i>Kpn</i> I	MBI Fermentas		
<i>Mun</i> I	MBI Fermentas		
<i>Nco</i> I	MBI Fermentas		
<i>Not</i> I	MBI Fermentas		

3.4.2 Weitere Enzyme

Klenow-Fragment	MBI Fermentas
Lysozym	Biomol
RNase A	Serva
T 4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen

3.5 Medien und Lösungen für die Pilz- und Bakterienkultur

Ammoniumazetat-Medium

BMM
60 mM Ammoniumazetat
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

Ampicillinlösung

50 mg/ml in Wasser lösen
sterilfiltrieren

Biomalz-Mais-Medium (BMM)

250 g Maismehl
ad 5 l H₂O
über Nacht Quellung bei 60 °C
Filtration über Handtuch
Zugabe von 8 g/l Biomalz
pH 6,5 (KOH)
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

Blasticidinlösung

50 mg/ml in Wasser lösen
sterilfiltrieren

Chloramphenicollösung

10 mg/ml in 100 % Ethanol lösen
sterilfiltrieren

CM-Medium

1,0 g KH₂PO₄
0,5 g KCl
0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O
10,0 g Glucose x H₂O
3,7 g NH₄Cl
2,0 g Hefeextrakt
2,0 g Trypton
1 ml Stammlösung A
ad 1 l H₂O
pH 6,5 (KOH), autoklavieren

IPTG-Stammlösung

100 mM IPTG in Wasser lösen
sterilfiltrieren

Luria-Bertani (LB)

1 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
0,5 % (w/v) NaCl
pH 7,2 (NaOH)
bei Festmedium: 2 % (w/v) Agar
autoklavieren
nach Abkühlung der Lösung (ca. 60 °C):
LBA: 1 ml Ampicillinlösung /l
LBAB: 1 ml Ampicillinlösung + 20 ml
Blasticidinlösung /l (Medium pH: 7,0)

LBAC: 1 ml Ampicillinlösung + 2,5 ml
Chloramphenicolösung /l

LBT: 1 ml Tetrazyklinlösung /l

M2-Medium

0,25 g KH_2PO_4

0,3 g K_2HPO_4

0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 g Harnstoff

0,05 mg Thiamin

0,25 μg Biotin

2,5 mg Zitronensäure

2,5 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,5 mg $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

125 μg $\text{MnSO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$

25 μg Borsäure

25 μg Natriummolybdat

25 μg NH_4SO_4

5 g Dextrin

20 g Agar

pH 7,0 (KH_2PO_4)

ad 1 l H_2O

autoklavieren

SOC-Medium

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

2,5 ml 1M KCl

pH 7,0 (NaOH)

ad 1 l H_2O

autoklavieren

vor Gebrauch 20 ml 1M Glucoselösung
(sterilfiltriert) hinzugeben

Stammlösung 1

75,0 g KH_2PO_4

25,0 g KCl

25,0 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l H_2O

autoklavieren

Stammlösung 2

0,05 g $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,05 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

0,05 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

0,05 g $\text{MnSO}_4 \times 1 \text{H}_2\text{O}$

ad 1 l H_2O

autoklavieren

Stammlösung A

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

1,0 g FeCl_2

1,0 g MnCl_2

ad 1 l H_2O

autoklavieren

Tetrazyklinlösung

12,5 mg/ml in 50 % Ethanol lösen

sterilfiltrieren

Transformationsmedium

10,0 g Glucose x H₂O
3,7 g NH₄Cl
2,0 g Trypton
1,0 g Casaminoacids
1,0 g Hefeextrakt
342,3 g Saccharose
20 ml 50 x Stammlösung 1
20 ml 50 x Stammlösung 2
ad 1 l H₂O
pH 6,0 (KOH)
(bei Phleomycin-haltigem Medium
pH 7,5 [KOH])
Grundmedium: 1,2 % (w/v) Agar
Überschichtungsmedium:
0,5 % (w/v) Agar
autoklavieren
ggf. nach Abkühlung der Lösung (auf ca.
60 °C):
0,1 mg/ml Hygromycin B oder
6 µg/ml Phleomycin

X-Gal-Medium

LB-Medium
autoklavieren
nach Abkühlung der Lösung (auf ca.
60 °C):
0,008 % (w/v) X-Gal
0,5 mM IPTG
1 ml Ampicillinlösung / Liter Medium

X-Gal-Stammlösung

4 % (w/v) X-Gal in Dimethylformamid

3.6 Allgemeine Lösungen

AM-Puffer

350 mM Mannitol

30 mM MOPS

1 mM EDTA

pH 7,6 (NaOH)

autoklavieren

nach Abkühlung der Lösung:

0,2 % (w/v) BSA

Bleizitratlösung (nach Reynolds)

- a. 1,33 g Bleinitrat in 30 ml Wasser lösen
- b. 1,76 g Natriumzitat hinzugeben, 10 min stark schütteln, 30 min schwach schütteln
- c. 8 ml 1N NaOH zugeben und Volumen auf 50 ml auffüllen

BN-Anodenpuffer

25 mM Imidazol

pH 7,0 (HCl)

BN-Kathodenpuffer

50 mM Tricin

7,5 mM Imidazol

pH 7,0 (nicht einstellen)

0,02 % (w/v) Coomassie Blue G250 bzw.

0,002 % (w/v) Coomassie Blue G250

20 x BN-Ladepuffer

500 mM ϵ -Aminocaprinsäure

50 mM Bis/Tris

5 % (w/v) Coomassie Blue G250

pH 7,0 (nicht einstellen)

3 x BNP-Puffer

1,5 M ϵ -Aminocaprinsäure

75 mM Imidazol

pH 7,0 (HCl)

Coomassie-Entfärbelösung

20 % (v/v) Methanol

7 % (v/v) Eisessig

3 % (v/v) Glycerin

Coomassie-Färbelösung

Teil 1:

5g $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

400 ml Wasser

100 ml Essigsäure

Teil 2:

1,5 g Coomassie Blue G250

50 ml Wasser

450 ml Methanol

Teil 1 und Teil 2 sind im Verhältnis

1:1 zu mischen

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
autoklavieren

Denaturierungsmix (RNA)

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

50 X Denhardts-Lösung

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

DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)

7 % (w/v) SDS
5 x SSC
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin
2 % (w/v) Blockierungs-Reagens (Roche)
50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0)
bei 60 °C lösen
vor Gebrauch 100 µg/ml Heringssperma-DNA (vorher 10 min Aufkochen, 5 min auf Eis) zugeben

DIG-Puffer 1

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

DIG-Puffer 2

0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz (Roche)
in DIG-Puffer 1 bei 60 °C lösen

DIG-Puffer 3

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

DIG-Waschpuffer

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

DMPC-H₂O

1 ml DMPC in 100 ml 50 % Ethanol lösen,
Zugabe von 900 ml sterilem Wasser,
Inkubation für 30 min (RT), autoklavieren

6 x DNA-Ladepuffer

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

GTC-Puffer

5,5 M Guanidinthiocyanat
25 mM Natriumzitat
0,5 % (w/v) N-Lauroylsarkosin
pH 7,0 (NaOH)
autoklavieren

Komplex I-Färbelösung

1 mg /ml NBT
0,1 mg/ml β -NADH
0,1 M Tris
pH 7,8 (HCl)

Komplex IV-Färbelösung

1 mg/ml Diaminobenzidin
24 U/ml Katalase
1 mg/ml Cytochrom-c
75 mg/ml Saccharose
50mM Kaliumphosphatpuffer
pH 7,4

Messpuffer (Enzymaktivitäten)

150 mM NaCl
75 mM Imidazol
pH 7,0 (HCl)

Mitochondrienisolationspuffer

0,33 M Saccharose
10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 7,5 (HCl)
autoklavieren
ggf. nach Abkühlung der Lösung
(auf ca. 60 °C): 0,2 % (w/v) BSA

10 x MOPS

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

Neutralisierungslösung

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

PEG-Lösung

60 % (w/v) PEG 4000
50 mM CaCl₂
10 mM Tris
pH 7,0 (HCl)
autoklavieren

Radioaktiv-Hybridisierungspuffer

6 x SSC
5 x Denhardts-Lösung
50 % (v/v) Formamid
0,5 % (w/v) SDS
100 μ g/ml hitzedenaturierte Heringssperma-
DNA vor Gebrauch zugeben

RNA-Ladepuffer

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

RNase A-Lösung

10 mg/ml RNase A
0,01 M NaAc (pH 5,2)
15 min aufkochen, langsam auf RT
abkühlen lassen
1/10 Vol. 1 M Tris/HCl (pH 7,4)

RNA-CsCl-Lösung

5,7 M CsCl
 0,1 M EDTA
 pH 7,4 (NaOH)
 autoklavieren, Refraktionsindex mit
 DMPC-H₂O auf 1,400 einstellen

1,11 x Solubilisierungspuffer

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

Spurr-Einbettungsmedium

10 g Vinylcyclohexendioxid (ERL 4206)
 5 g Polypropylenglycodiglycidyl-
 äther (D.E.R. 736)
 26 g Nonenylbernsteinsäureanhydrid
 0,4 g Dimethylaminoethanol

20 x SSC

3 M NaCl
 0,3 M Natriumzitat
 pH 7,0 (HCl)

STC-Lösung

1 M Sorbit
 10 mM Tris
 50 mM CaCl₂
 pH 7,5 (HCl)
 autoklavieren

1 x STE

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

STET-Lösung

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

10 x TAE

400 mM Tris
 20 mM NaAc
 10 mM EDTA
 pH 7,8 (HAc)
 autoklavieren

1 x TE

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

TENS

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

TPS

0,8 M Saccharose
 45 mM KH₂PO₄
 5 mM Na₂HPO₄
 pH 5,5 (H₃PO₄)
 autoklavieren

Waschmedium (mito. Proteine)

300 mM Mannitol
 20 mM MOPS
 1 mM EDTA
 pH 7,2 (NaOH)
 autoklavieren
 nach Abkühlung der Lösung:
 0,2 % (w/v) BSA

3.7 Bezugsquellen

3.7.1 Stoffe und Reagenzien

Artikel	Hersteller		
Acrylamid	Roth	$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	Amersham
Agar	Invitrogen	CuSO ₄	Merck
Agarose	Roth	Cystein	Sigma
ϵ -Aminocaprinsäure	Roth	Cytochrom c	Sigma
Ammoniumazetat	Merck	DAB	Sigma
Ammoniumsulfat	Roth	D.E.R. 736	Serva
Ampicillin	Roche	Decylubichinon	Sigma
Antimyzin A	Serva	Dextrin	Sigma
APS	Sigma	Digitonin	Sigma
Arabinose	Sigma	Dimethylaminoethanol	Agar Aids
BCIP	Roche	Dimethylformamid	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma	DMPC	Sigma
β -NADH	Sigma	dNTPs	Pharmacia
Biotin	Serva	EDTA	Merck
Bisacrylamid	Roth	ERL 4206	Agar Aids
Bis/Tris	Roth	Essigsäure	Merck
Blasticidin	Invitrogen	Ethanol	Roth
Borsäure	Merck	Ethidiumbromid	Merck
Bromphenolblau	Serva	FeCl ₂	Merck
BSA	Sigma	FeSO ₄	Merck
CaCl ₂	Merck	Ficoll 400	Serva
Casaminoacids	Difco	Formaldehyd	Sigma
Chloramphenicol	Roche	Formamid	Merck
Chloroform	Merck	Glucanex	Novo Nordisk
Coomassie Blue G250	Roth	Glucose	Serva
CsCl	Invitrogen	Glutaraldehyd	Sigma
CSPD	Roche	Glyzerin	Roth

Guanidinthiocyanat	Sigma	SHAM	Sigma
Harnstoff	Serva	Sorbit	Merck
HAc	Merck	TEMED	Sigma
HCl	Merck	Tetrazyklin	Roche
H ₃ PO ₄	Roth	Thiamin	Serva
Hefeextrakt	Difco	Tris	Gibco
HEPES	Sigma	Triton X-100	Serva
Hygromycin B	Calbiochem	Trypton	Difco
Imidazol	Roth	Tween 20	Sigma
IPTG	Biomol	Uranylazetat	Sigma
Isoamylalkohol	Merck	X-Gal	Roth
Isopropanol	Roth	Xylencyanol	Serva
Katalase	Sigma	Zitronensäure	Merck
Kaliumazetat	Roth	ZnSO ₄	Merck
KCl	Merck		
KCN	Serva		
K ₂ HPO ₄	Merck		
KH ₂ PO ₄	Merck		
KOH	Merck		
Maismehl	Aurora		
Maleinsäure	Merck		
Mannitol	Merck		
Methanol	Roth		
MgSO ₄	Merck		
MnCl ₂	Merck		
MnSO ₄	Merck		
MOPS	Sigma		
NaAc	Merck		
NaCl	Merck		
Na ₂ HPO ₄	Merck		
NaOH	Merck		
Natriumcacodylat	Sigma		
Natriummolybdat	Merck		
Natriumzitrat	Roth		
NBT	Sigma		
NH ₄ Cl	Merck		
NH ₄ SO ₄	Roth		
Nonenylbernstein- säureanhydrid	Agar Aids		
OPL I	Pharmacia		
OPL II-C	Pharmacia		
Osmiumtetroxid	Sigma		
Pb(NO ₃) ₂	Merck		
Pefabloc	Roth		
Phenol	Roth		
Phleomycin	Calbiochem		
PVP	Sigma		
PVPP	Sigma		
Roti-Nanoquant	Roth		
Saccharose	Roth		
SDS	Serva		

3.7.2 Geräte

Autoklav:	GE 446 EC-1 (Getinge)
„Bead-Beater“:	1107900 (Biospec)
Brenner:	GASI (Schütt)
Brutschränke:	Kelvitron (Heraeus) Rubarth Hannover
„Crosslinker“:	UV-Stratalinker 1800 (Stratagene)
Elektroporationsgerät	Easyject Prima (Equibio)
Feinwaage:	Mettler Toledo PB 303
Fluoreszenzmikroskop:	DM LB (Leica)
Filmentwickler:	Protec 45 compact
Gelkammern:	„Mini SUB DNA Cell“ (BioRad) „Wide-Mini SUB DNA Cell“ (BioRad) Protean xi II (BioRad)
Heizblock:	Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Homogenisator:	Waring-Blendor
Hybridisierungsöfen:	Hybridization Oven/Shaker (Amersham)
Kältefalle:	Refrigerated Vapor Trap RVT 100 (Savant)
Halogenlampe:	KL 1500-T (Schott)
Luminometer:	Victor (Perkin Elmer)
Magnetrührer:	Ikameg Reo
Mikroskop:	Laborlux S (Leitz)
Netzgeräte:	GPS 200/400 (Pharmacia) Powerpac 3000 (BioRad)
PCR-Gerät:	TGradient 96 (Biometra)
pH-Meter:	Calimatic 761 (Knick)
Photometer:	DW 2000 (SLM Aminco) Gene Quant II RNA/DNA Calculator (Pharmacia) LKB-Ultrospec III (Pharmacia)
Pumpen:	EconoPump (BioRad) LKB VacuGenePump (Pharmacia)
Schüttelinkubator:	HT-Infors
Stereolupe:	Wild M3Z (Heerbrugg bzw. Leica)
Sterilbänke:	NSF 49 (Clean Air) LF 460 EC (Clean Air)
Transilluminator:	Cybertech CSI
Transmissionselektronen- mikroskop	EM 09 (Zeiss)
Ultramikrotom:	Ultracut S (Reichert)
Vakuum-Transferapparatur:	LKB VacuGene XL (Pharmacia)
Vakuumzentrifuge:	SpeedVac Plus SC 110A (Savant)
„Vortex“:	Vortex Genie 2 (Scientific Ind.)
Waage:	LC 82 (Sartorius)
Wasserbäder:	1083 (GFL), MP, U3 (Julabo)
Wasseraufbereitung:	Milli-Q Plus (Millipore)
Zentrifugen:	5403 (Eppendorf) mit 16A4-44 (Ausschwingrotor) bzw. 16F24-11 (Festwinkelrotor) 5415 C (Eppendorf) mit F-45-18-11 (Festwinkelrotor)

5417 R (Eppendorf)
mit FA-45-24-11 (Festwinkelrotor)

Sorvall RC5B (DuPont)
mit Festwinkelrotoren:
Super-Lite GSA SLA-1500 bzw.
Sorvall SS34

Sorvall Ultra Pro 80 (Dupont)
mit Ausschwingrotor TH 641

Varifuge 3.0 (Heraeus)

3.7.3 Sonstige Materialien

Filterpapier:	3MM (Whatman)
Hybridisierungsmembran:	Hybond-N (Amersham)
Hybridisierungsröhren:	Amersham
Quarzküvette:	105.210.001-QS (Hellma)
Röntgenfilm:	Hyperfilm MP (18 x 24 cm) (Amersham)
Röntgenfilmkassetten:	(Rego)
Verstärkerfolie:	Suprema (Dr. Goos)

4. Methoden

4.1 Kultivierung von *P. anserina*

- Anzucht, Bestimmung der Wachsrates

Sofern nicht anders angegeben, wurden Isolate der verwendeten *P. anserina*-Stämme auf Petrischalen mit BMM bei 27 °C im Dauerlicht angezogen. Zur Bestimmung der Wachsrates (in cm/d) wurde die Wuchsstrecke, die das Myzel auf einer Platte zurückgelegt hat, durch die dafür benötigte Zeit dividiert.

- Regeneration, Bestimmung der männlichen und weiblichen Fertilität

- Regeneration von *P. anserina*-Isolaten: Homokaryotische Myzelien mit unterschiedlichem Kreuzungstyp wurden in der Mitte einer BMM-Platte im Abstand von ca. 3-4 cm angeimpft. Nach ca. zwei Wochen waren Perithezien erkennbar, die mit einer Präpariernadel auf eine Präparieragarplatte (8 % Agar in H₂O) überführt und geöffnet wurden. Nach Vereinzelung der freigelegten Asci wurden homokaryotische Sporen, die kleiner als die heterokaryotischen sind, isoliert und, sofern nicht anders angegeben, auf eine mit 60 mM Ammoniumazetat supplementierte Platte überführt. Die Sporenkeimung erfolgte im Dunkeln bei 27 °C. Nach zwei Tagen wurde ein Myzelstück von der Ammoniumazetat-Platte auf eine BMM-Platte überführt und wie in unter „Anzucht“ (siehe oben) beschrieben inkubiert.

- Bestimmung der männlichen Fertilität: Eine BMM-Platte wurde zentral mit einem Myzelstück beimpft und bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert, bis der Pilz die Platte vollständig überwachsen hatte. Die Spermastien (männliche Gameten) wurden mit 2 ml Wasser abgeschwemmt. Die Spermastien suspension wurde in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt und zentrifugiert (10 min, 14000 Upm, RT, F-45-18-11). Der Überstand wurde vorsichtig bis auf 0,2 ml entfernt und das Sediment in dem Flüssigkeitsrest resuspendiert. Die Spermastienzahl wurde schließlich mikroskopisch mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

- Bestimmung der weiblichen Fertilität: Zunächst wurden Spermastien des Wildstammes s wie oben beschrieben gewonnen, wobei 3 ml zur Abschwemmung dienten. Jeweils 400 µl dieser Suspension wurde auf homokaryotisches Myzel des zu untersuchenden Stammes (entgegengesetzter Kreuzungstyp) pipettiert. Nach einer Minute Inkubation wurde der Tropfen vorsichtig abpipettiert. Das spermastienisierte Myzel wurde bei 27 °C im Dauerlicht für fünf bis sechs Tage inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Fruchtkörper (Perithezien)

sichtbar, die durch Befruchtung der Protoperithezien entstanden sind. Die kreisförmigen Regionen mit den Perithezien wurden durch „Einscannen“ der Platte dokumentiert und mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms „Photoshop 5.0“ (Adobe) ausgewertet.

- Bestimmung der Lebensspanne von *P. anserina*

Um die Lebensspanne von *P. anserina*-Isolaten zu bestimmen, wurden das Myzelstück einer juvenilen Kultur (Alter: 3-4 Tage) von der Keimungsplatte an den Rand einer BMM-Platte mit 30 ml Medium überimpft. Die Inkubation des Myzels erfolgte wie unter „Anzucht“ beschrieben (siehe oben). Wenn das Isolat den Rand der Platte erreichte, wurde ein Myzelstück aus der Front entnommen und auf eine frisches Medium überführt. Alle zwei bis drei Tage wurde die Wachstumsfront der Kultur bis zum Tod des Pilzes markiert.

4.2 Transformation von *P. anserina*

- Anzucht des zu transformierenden Myzels

Jeweils 10-20 Myzelstückchen des zu transformierenden Stammes wurden auf BMM-Platten (5-6) angeimpft und für zwei bzw. drei Tage bei 27 °C inkubiert. Das Myzel wurde von den Platten in jeweils einen Kolben mit 200 ml CM überführt und für 1,5 Tage bei 27 °C geschüttelt (143 Upm).

- Protoplastierung des Myzels

Um die für die DNA-Aufnahme hinderliche Zellwand enzymatisch zu entfernen, wurde das Myzel mit Glucanex (Novo Nordisk Ferment AG) protoplastiert. Das Myzel wurde durch zwei Lagen Mull filtriert und anschließend mit TPS-Puffer gespült. Nach Aufnahme von ca. 20 g (Feuchtgewicht) Myzel in Glucanexlösung (20 mg/ml in TPS) (Gesamtvolumen: 100 ml) wurde das Gemisch in einem Mixer (Waring) homogenisiert. Anschließend erfolgte die Inkubation des Homogenats für 1,5 Stunden bei 35 °C unter Schwenken im Wasserbad. Nach Filtration der Suspension über zwei Lagen Mull wurde ein- bis zweimal durch Glaswolle filtriert. Das klare Filtrat wurde in 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und abzentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT, Varifuge 3.0). Die Protoplastensedimente wurden vorsichtig in insgesamt einem ml TPS-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT, F-45-18-11) und in einem ml TPS-Puffer aufgenommen. Danach wurde wieder zentrifugiert (10 min, 4000 Upm, RT, F-45-18-11). Diese Waschung wurde dreimal

wiederholt, bevor alle Protoplasten in einem Milliliter TPS-Puffer vereinigt wurden. Die Bestimmung der Protoplastenzahl erfolgte unter dem Mikroskop in der Thoma-Zählkammer.

- Transformation der Protoplasten

Jeweils 1×10^7 Protoplasten wurden in vier 2 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Nach Zentrifugation (10min, 4000 Upm, RT, F-45-18-11) wurden die Protoplastensedimente in 200 µl eiskaltem STC-Puffer resuspendiert und auf Eis gehalten. Zu dem Transformationsansatz wurden 10 µg DNA gegeben, zur Positivkontrolle im Falle der Selektion auf Hygromycin B-haltigem Medium 10 µg des Plasmids pAN7-1 (Punt et al., 1987). Wenn die Selektion auf Phleomycin durchgeführt werden sollte, wurden 10 µg pKO3-DNA (Hamann et al., 2005) eingesetzt. Zur Negativkontrolle wurden 10 µg des Vektors *pHph-1* (Roche) gegeben. Der Regenerationskontrolle wurde keine DNA zugesetzt. Diese Kontrolle zeigt an, wie stark die Protoplasten durch die Transformationsprozedur geschädigt worden sind (siehe unten).

Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde zu den Ansätzen 50 µl eiskalte PEG-Lösung gegeben und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden nun in 10 ml-Polypropylen (PPN)-Röhrchen überführt; danach wurde 2 ml PEG-Lösung (4 °C) in ein ml-Schritten hinzugefügt. Zwischen den Schritten wurde vorsichtig gemischt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (30 min) und anschließend bei RT (10 min) erfolgte die Zugabe von jeweils 4 ml STC-Puffer (4 °C). Der Transformationsansatz wurde vollständig ausplattiert. Hierfür wurde jeweils ein Milliliter des Ansatzes in ein PPN-Röhrchen mit 4 ml Selektionsüberschichtungsmedium (Inkubation der Röhrchen bei 50 °C im Wasserbad) pipettiert. Der Inhalt des Röhrchens diente zum Überschichten einer Platte mit Hygromycin B (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) bzw. Phleomycin (Endkonzentration: 6 µg/ml) im Transformationsmedium. Für die Positiv- und Negativkontrolle wurde jeweils ein ml der jeweiligen Ansätze auf vier bzw. zwei Platten mit dem jeweiligen Selektionsmarker wie zuvor beschrieben ausplattiert. Der Ansatz für die Regenerationskontrolle wurde 10^{-1} - 10^{-6} sowohl in Wasser als auch in STC verdünnt. Die STC-Verdünnungen enthalten ggf. noch Zellen mit intakter Zellwand. Um den Anteil dieser nicht transformierbaren Zellen zu bestimmen, werden die Wasserverdünnungen ausplattiert, da hier die eigentlichen Protoplasten wegen der osmotischen Verhältnisse platzen. Jeweils 1 ml der einzelnen Verdünnungen wurden in ein PPN-Röhrchen mit Überschichtungsmedium (ohne Selektionsmarker) gegeben und anschließend auf jeweils einer Platte mit Transformationsmedium (ebenfalls ohne Selektionsmarker) ausplattiert.

Nach Inkubation bei 27 °C für drei bis vier Tage wurde die Regenerationskontrolle zur Ermittlung der Regenerationsrate der Protoplasten ausgewertet. Die Regenerationsrate gibt den Prozentsatz der Protoplasten an, die nach der Protoplastierung über die Fähigkeit zur Regeneration eines Myzels verfügen. Sie sollte erfahrungsgemäß zwischen ein und drei Prozent liegen. Liegt sie wesentlich niedriger, sind die Protoplasten während der Protoplastierung vermutlich stark geschädigt worden. Die eigentliche Transformation sowie Positiv- und Negativkontrolle wurden nach 7-14 Tagen ausgewertet. Zur Berechnung der Transformationseffizienz wurde die Anzahl der erhaltenen Transformanten durch die eingesetzte DNA-Menge dividiert. Sie liegt normalerweise im Bereich von 15-21 Transformanten pro µg DNA (Osiewacz et al., 1991).

4.3 Nukleinsäuretechniken

4.3.1 Nukleinsäure-Isolation

4.3.1.1 Isolation der Gesamt-RNA aus *P. anserina*

- Anzucht des Myzels

Jeweils 10-20 Myzelstückchen wurden auf zwei BMM-Platten angeimpft und für drei Tage bei 27 °C inkubiert. Juveniles und mittelaltes Myzel wurde von den Platten in jeweils ein Kolben mit 200 ml CM überführt und für zwei bis drei Tage bei 27 °C geschüttelt (143 Upm). Seneszenten Myzel wurde in Fernbachkolben mit 150 ml CM überführt und für drei bis vier Tage bei 27 °C ohne Schütteln inkubiert.

- Aufarbeitung der Gesamt-RNA

Das Myzel wurde durch zwei Lagen Mull filtriert und ausgedrückt. Nach Bestimmung des Feuchtgewichts (ca. 5-10 g) wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff gründlich zermörsert und in ein Becherglas überführt. Nach Verrühren des Pulvers in 20 ml 60 °C warmer GTC-Lösung wurde die Suspension zügig in ein SS34-Röhrchen mit 277 µl β-Mercaptoethanol gefüllt und gemischt. Nach Inkubation des Röhrchens für 10 min bei 60 °C zur Lyse der Zellen wurde zentrifugiert (10 min, 10000 Upm, RT, SS34). Ca. 8 ml des Überstands wurden vorsichtig auf ein 5,7 M CsCl-Kissen (3 ml) in einem TST41.14-Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Die RNA wurde durch Ultrazentrifugation (18 h, 34000 Upm, 20 °C, TH-641) pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das RNA-Sediment drei Mal in 70 % Ethanol/DMPC (4 °C) gewaschen und anschließend in 500 µl DMPC-H₂O bei 60 °C resuspendiert. Die gelöste RNA wurde in ein 2 ml-Reaktionsgefäß

überführt und mit 1/10 Vol. 3 M NaAc/DMPC (pH 5,0) und 2 Vol. absolutem Ethanol (4 °C) für 30 min bei -80 °C gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol/DMPC (4 °C) gewaschen. Der Ansatz wurde zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) und luftgetrocknet. Das RNA-Sediment wurde schließlich je nach Sedimentgröße in 100-200 µl DMPC-H₂O bei 65 °C für ca. 30 min gelöst.

4.3.1.2 Isolation der Gesamt-DNA aus *P. anserina* (nach Lecellier und Silar, 1994)

- Anzucht des Myzels

Jeweils 10-20 Myzelstückchen wurden auf mit einer Cellophanfolie beschichteten BMM-Platte angeimpft und für zwei bis drei Tage bei 27 °C inkubiert.

- Aufarbeitung der Gesamt-DNA

Das Myzel wurde mit einem Spatel von der Cellophanfolie abgeschabt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von einem ml frisch angesetztem TENS-Extraktionspuffer wurden die Folgenden dem Zellaufschluss dienenden Schritte drei Mal durchgeführt: 30 sec mischen (Vortex), Inkubation für 30 sec in flüssigem Stickstoff, Inkubation im Wasserbad bei 70 °C für 10 min. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, RT, F-45-18-11) wurde der Überstand abgenommen und in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von einem Vol. Phenol wurde der Ansatz gemischt und zentrifugiert (5 min, 8000 Upm, RT, F-45-18-11). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 8000 Upm, RT, F-45-18-11) wurde der Überstand wieder abgenommen und in einem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) erneut extrahiert. Dann wurde eine DNA-Fällung mit einem Vol. Isopropanol (RT) durchgeführt und anschließend zentrifugiert (20 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11). Nach Lösen des Sediments in 90 µl Wasser + 10 µl 3 M NaAc (pH 5,2) bei 37 °C wurde die DNA mit zwei Volumen eiskaltem absolutem Ethanol für 30 min bei -80 °C erneut gefällt. Nach Zentrifugation (20 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) wurde das DNA-Sediment in 500 µl 70 % Ethanol (4 °C) gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Das DNA-Sediment wurde je nach Größe in 20-50 µl TE-Puffer mit RNase A (0,1 mg/ml) für ca. 30 min bei 37 °C gelöst.

4.3.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Mini-Präparation)

Diese Methode diente der Isolation von geringen Mengen Plasmid-DNA (10-20 µg) aus *E. coli*-Zellen. Nach Anzucht der Bakterien in einer 5 ml LBA-Kultur über Nacht bei 37 °C im Inkubator wurde diese abzentrifugiert (10 min, 3500 Upm, 16A4-44). Das Zellsediment wurde in 150 µl STET-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. 12 µl einer LysozymbLösung (10 mg/ml) wurden hinzugegeben. Während der anschließenden Inkubation bei 90 °C für 90 Sekunden erfolgten Zell-Lysis und die Denaturierung von genomischer DNA und der Proteine. Nach einer Zentrifugation (10 min, 15000 Upm, 16F24-11) wurde das resultierende Sediment entfernt. Der die Plasmid-DNA enthaltene Überstand wurde mit 150 µl Isopropanol versetzt und für fünf Minuten bei -80 °C gefällt. Danach wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11). Der Überstand wurde verworfen und das Plasmid-DNA-Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation (5 min, 15000 Upm, 4 °C, 16F24-11) wurde das Sediment unter Vakuum getrocknet und in 50 µl TE (+ 0,1 mg/ml RNase A) resuspendiert.

4.3.1.4 Isolation von Plasmid- und Cosmid-DNA aus *E. coli* (Midi-Präparation)

Für die Isolation größerer Mengen reiner Plasmid- und Cosmid-DNA (50-100 µg) wurde ein „Midi-Prep-Kit“ (Qiagen) eingesetzt. Ausgehend von einer Einzelkolonie erfolgte die Anzucht zunächst in 5 ml-Flüssigmedium mit Selektionsmarker (z. B. Ampicillin) für 8-10 Stunden bei 37 °C und 180 Upm. Die Vorkultur wurde anschließend in 150 ml Flüssigmedium (ebenfalls mit Selektionsmarker) überführt (Hauptkultur) und über Nacht bei 37 °C und 180 Upm inkubiert. Die Isolation der DNA wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Resuspension der Plasmid-DNA erfolgte in 100 µl TE-Puffer.

4.3.2 Nukleinsäure-Konzentrationsbestimmung

- Plasmid- und Cosmid-DNA, RNA

Nukleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Mit einem UV-Photometer lässt sich die optische Dichte (OD) einer Nukleinsäure-Präparation bestimmen. Aus der OD errechnet sich die DNA-bzw. RNA-Konzentration wie folgt:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times V$$

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times V$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm, V: Verdünnungsfaktor

Als Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation dient der Quotient A_{260}/A_{280} , dieser sollte $\geq 1,7$ sein.

- Lineare DNA-Fragmente, Genomische DNA

Die Konzentration genomischer DNA wurde mittels Videodensitometrie bestimmt: Ein μl der Probe wurden mit 250 ng *Hind*III restringierter λ -DNA (MBI Fermentas) auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Das Programm „WinCam“ (Cybertech) errechnet anhand der Bandenintensität die DNA-Konzentration der zu analysierenden Proben. Als Berechnungsgrundlage diente die jeweilige DNA-Menge der sieben *Hind*III-Fragmente des λ -Markers.

- Oligonukleotide

Um die Stoffmengenkonzentration von einzelsträngigen Oligonukleotiden zu bestimmen, wurden nach Messung der Absorption bei 260 nm folgende Formeln angewendet (Tullis et al., 1989):

$$\text{Oligonukleotidkonzentration [mol/l]} = A_{260}/E_m$$

wobei der molare Extinktionskoeffizient E_m wie folgt bestimmt wurde:

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

A, T, G, C: Anzahl der Adenin-, Thymin-, Guanin-, und Cytosin-Basen im Oligonukleotid

4.3.3 Nukleinsäure-Gelelektrophorese

4.3.3.1 DNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten für Analysezwecke erfolgte in 1% Agarosegelen. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Die aufzutrennende DNA-Probe wurde mit 1/6 Volumen 6 x DNA-Ladepuffer gemischt und in eine Tasche des Agarosegels pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte für 1-1,5 Stunden bei 80 V. Für eine bessere Auftrennung wurde die Elektrophorese über Nacht bei 12 V unterzogen. Als Größenstandard diente entweder eine 100 bp-Leiter oder das mit *Hind*III-restringierte Genom des Bakteriophagen λ . Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurde das Gel ca. 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (1 $\mu\text{g/ml}$ EtBr in Wasser) gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in Nukleinsäuren und wird durch UV-Strahlung auf dem Transilluminator zur

Fluoreszenz angeregt. Die aufgetrennten DNA-Fragmente erscheinen als horizontale Banden im Gel und wurden zur Dokumentation fotografiert.

4.3.3.2 RNA-Gelelektrophorese

- Herstellung eines denaturierenden Agarose-Gels

Gelträger und -kamm wurden gründlich mit Ethanol gereinigt. Für ein 1,35 % Agarosegel wurde nach dem Aufkochen von 1,5 g Agarose in 80 ml DMPC-H₂O und Abkühlung auf ca. 60 °C 11 ml 10 x MOPS und 20 ml Formaldehyd hinzugesetzt. Anschließend wurde das Gel gegossen.

- Vorbereitung der Proben

10-20 µg RNA wurde mit DMPC-H₂O auf ein Volumen von 12 µl eingestellt. Anschließend wurde 29 µl RNA-Probenpuffer hinzupipettiert. Danach folgte eine 10-minütige Inkubation bei 65 °C im Heizblock; dann 5 min auf Eis. Diese Schritte dienen der Denaturierung der RNA. Dann wurden 5 µl RNA-Ladepuffer hinzupipettiert. Alle Proben wurden in jeweils zwei Taschen des denaturierenden Agarosegels geladen, da eine Gelhälfte auf dem Transilluminator analysiert und die andere auf eine Nylonmembran transferiert wurde. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in 1 x MOPS-Laufpuffer bei einer Spannung von 60 V für 2,5 Stunden.

- Analyse des RNA-Gels auf dem Transilluminator

Zunächst wurde eine Gelhälfte 15-30 min im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml EtBr in Wasser) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfärbung über Nacht im Wasserbad. Das Gel wurde dann auf dem Transilluminator analysiert und fotografiert.

4.3.4 DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen erkennen bestimmte DNA-Sequenzen und hydrolysieren Phosphorsäurediesterbindungen. Dies führt zur Spaltung der DNA in spezifische Fragmente. DNA-Restriktionen finden eine Reihe von Anwendungen:

- Fragmentierung von DNA als Voraussetzung für Hybridisierungsanalysen
- Gewinnung von Fragmenten für Klonierungen bzw DNA-Markierungen
- Analyse der Restriktionsmuster von Plasmid-, Cosmid- und genomischer DNA.

Es wurden Enzyme und die entsprechenden Puffer von MBI Fermentas verwendet. Für $< 1 \mu\text{g}$ DNA wurden in der Regel 2,5 U des jeweiligen Enzyms eingesetzt. 5 U bzw. 10 U wurden für $\geq 1 \mu\text{g}$ DNA gewählt. Die Inkubationszeit des Restriktionsansatzes bei 37°C betrug für $< 1 \mu\text{g}$ DNA 2-4 Stunden; größere Mengen und genomische DNA wurden über Nacht restringiert.

4.3.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Isolation linearer DNA-Fragmente wurde das entsprechende Plasmid zunächst enzymatisch restringiert. Der Restriktionsansatz wurde anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

Das in einer Ethidiumbromidlösung gefärbte Gel wurde auf dem Transilluminator analysiert und das betreffende DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Gel und dessen Reinigung wurde das „NucleoSpin Extract 2-in-1“-Kit (Macherey-Nagel) nach der Anleitung des Herstellers eingesetzt.

4.3.6 Nukleinsäuretransfer

4.3.6.1 Southerntransfer

DNA-Fragmente wurden aus Agarosegelen durch Southerntransfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N [Amersham]) übertragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt, auf dem Transilluminator analysiert und photographiert. Nach 10 min Inkubation in Wasser wurde es auf zuvor eine min in $2 \times \text{SSC}$ äquilibrierte Membran platziert und luftdicht in einer Vakuum-Transferapparatur (Pharmacia) eingespannt. Nach Überschichten des Gels mit $0,25 \text{ M HCl}$ zur Depurinierung der DNA wurde ein Unterdruck von 50 mbar angelegt. Nach 20-30 min Inkubation in $0,25 \text{ M HCl}$ wurde das Gel für 20-30 min mit Denaturierungslösung überschichtet, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Eine abschließende Überschichtung in Neutralisierungslösung für 20-30 min diente dem Absenken des pH-Werts unter 9. Dies ist für die Bindung von DNA-Sonden in Hybridisierungsanalysen bedeutend. Für den Transfer der DNA wurde das Gel zwei Stunden mit $20 \times \text{SSC}$ bedeckt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran 1 min in $2 \times \text{SSC}$ gewaschen und auf „Whatman“-Papier getrocknet. Zur kovalenten Fixierung der DNA wurden beide Seiten der Membran im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) behandelt. (Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“.) Das Gel wurde nach erneuter Färbung im Ethidiumbromidbad auf dem Transilluminator auf DNA-Rückstände untersucht.

4.3.6.2 Northerntransfer

Der Northerntransfer dient dem Transfer von RNA aus einem denaturierenden Agarosegel auf eine Nylonmembran. Die Membran (Hybond-N [Amersham]) wurde zunächst kurz in 2 x SSC (DMPC) äquiliert. Anschließend wurde das RNA-Gel in einer Transferapparatur (Pharmacia) platziert. Ein Unterdruck von 50 mbar wurde angelegt und das Gel für etwa drei Stunden mit 20 x SSC (DMPC) überschichtet. Danach wurde die Membran kurz in 2 x SSC gewaschen und luftgetrocknet. Beide Seiten der Membran wurden mit UV bestrahlt (UV-Stratalinker „1800“ [Stratagene], Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“.)

4.3.7 Hybridisierungsanalyse

4.3.7.1 DNA-Markierung

Sonden für die Analyse von DNA und RNA wurden entweder mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham) oder mit DIG-dUTP (Roche) durch „Random-Priming“ markiert. Die zu markierende DNA wurde zunächst durch Restriktion des entsprechenden Plasmids und elektrophoretischer Auftrennung gewonnen. Das gewünschte Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit dem „NucleoSpin Extract 2-in-1“ Kit (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

- DIG-Markierung

Die Markierungsreaktionen wurden mit dem „DIG-DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche) durchgeführt. 15 μl der zu markierenden DNA (0,5-1 μg) wurden 10 min in kochendem Wasser denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 2 μl Hexanukleotidgemisch (10 x), 2 μl dNTP-Markierungsgemisch und 1 μl Klenow-Fragment (2 U/ μl) (MBI Fermentas). Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Reaktion wurde schließlich durch Zugabe von 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Um die Konzentration der markierten DNA abzuschätzen, wurden 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 0,1 pg DIG-markierte Kontroll-DNA auf eine Nylonmembran pipettiert. Anhand der Menge der eingesetzten DNA-Matrize und der Reaktionsdauer wurde die theoretische Konzentration an markierter DNA nach der Anleitung des Herstellers berechnet und eine Verdünnungsreihe markierten Probe auf die Membran pipettiert. Für die Detektion wurde die Membran entsprechend 4.3.7.2 inkubiert und anschließend mit einer Farbsubstratlösung überschichtet, die 17,5 μl BCIP und

22,5 µl NBT in 5 ml DIG-Puffer 3 enthielt. Der Ansatz wurde 2-3 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die durch den Substratumsatz der mit alkalischen Phosphatase konjugierten DIG-Antikörper beobachtete Farbentwicklung wurde bei Kontroll-DNA und markierter Probe verglichen und diente als Maß für die Markierungseffizienz.

- $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP-Markierung

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

4.3.7.2 Hybridisierung und Detektion

- Hybridisierung und Detektion (DIG-markierte DNA-Sonde)

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte mindestens zwei Stunden in DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“) bei 65 °C. Die Hybridisierung mit einer thermisch denaturierten Sonde (15-20 ng/ml in DIG-Hybridisierungspuffer) erfolgte über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurden zwei Waschschritte in 2 x SSC, 0,5 % SDS bei RT für jeweils 5 min durchgeführt. Für die Stringenzwaschungen wurde die Membran zwei Mal in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C für jeweils 15 min inkubiert. Die folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Zunächst Inkubation in DIG-Puffer 2 für mindestens 60 min. Anschließend wurde die Membran 30 min in 10 ml DIG-Puffer 2 mit Anti-DIG-AP-Konjugaten (1:10000) inkubiert. Danach erfolgte zwei Waschungen in DIG-Waschpuffer für jeweils mindestens 15 min. Die Membran wurde zwei Mal für jeweils 5 min in DIG-Puffer 3 äquilibriert und mit 500 µl Substratlösung (1:100 CSPD in DIG-Puffer 3) für 5 min bedeckt. Nach der Entfernung überschüssiger Substratlösung wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm (Amersham) für

1-5 Stunden bei RT auf die Membran gelegt. Zur DIG-Entfernung wurde die Membran kurz in Wasser inkubiert und anschließend zwei Mal für jeweils 20 min in 0,2 M NaOH, 0,1 % SDS bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Waschung der Membran in 2 x SSC (mind. 2 x 15 min).

- Hybridisierung und Detektion (radioaktiv markierte DNA-Sonde)

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

4.3.8 DNA-Klonierung

4.3.8.1 Vorbereitung des Vektors

10 µg des Vektors (z. B. pBSSK von Stratagene) wurden über Nacht enzymatisch restringiert. Um die Restriktionsendonukleasen aus dem Ansatz zu entfernen, wurde anschließend eine Aufreinigung des Vektors mit „Strataclean“ (Stratagene) nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. „Strataclean“ ist eine Matrixsuspension, die Restriktionsendonukleasen und modifizierende Enzyme aus den Reaktionsansätzen entfernt.

4.3.8.2 Synthese des zu klonierenden DNA-Fragments

Zu klonierende DNA-Fragmente wurden mittels PCR (Kap. 4.3.11) synthetisiert. Hierbei enthalten die zur Amplifikation eingesetzten Oligonukleotide, die die gewünschte Sequenz flankieren, entsprechende Schnittstellen für weitere Klonierungsschritte. Das Amplifikat wurde anschließend mit dem „NucleoSpin Extract 2-in-1“-Kit (Macherey-Nagel) nach der Anleitung des Herstellers aufgereinigt.

4.3.8.3 DNA-Ligation

Ligationen von DNA-Fragmenten wurden mit der T4-DNA-Ligase von MBI Fermentas durchgeführt. Das molare Verhältnis von Vektor zu Fragment betrug, sofern nicht anders angegeben, 1:5. In einem 10 µl Ansatz befanden sich weiterhin 1 x Ligationspuffer (MBI Fermentas) und 5 U T4-DNA-Ligase. Die Ligation wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Inkubation bei 65 °C für 10 min gestoppt. Für die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen wurden 5 µl des Ligats eingesetzt.

4.3.8.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

- Kompetente Zellen für die Transformation mit Hilfe eines Hitzeschocks

Eine frisch auf LBT gewachsene *E. coli*-Einzelkolonie des Stammes XL1Blue (Stratagene) diente zum Animpfen einer 10 ml LBT-Kultur. Nach ca. 16 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde diese Vorkultur in 500 ml LBT überführt. Diese 500 ml-Hauptkultur wurde für ca. 3,5 Stunden bei 37 °C und 180 Upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 inkubiert. Nach einer Zentrifugation (10 min, 3500 Upm, 4 °C, GSA) wurde das Sediment in 500 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ aufgenommen. Nach einer Stunde Inkubation der Hauptkultur auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation (10 min, 3500 Upm, 4 °C, GSA). Im Anschluß an die vorsichtige Resuspension in 50 ml CaCl₂ (4 °C) wurde die Bakterien-Suspension für 24 Stunden auf Eis aufbewahrt. Für die Herstellung von Gefrierkulturen der kompetenten Bakterien wurden diese mit eiskaltem Glycerin (Endkonzentration: 15 %) versetzt. Diese Suspension wurde zu 350 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

- Kompetente Zellen für die Transformation durch Elektroporation

Diese Prozedur wurde zur Herstellung kompetenter *E. coli* des Stammes KS272 (pKOBEG, Cosmid #42B8) durchgeführt (Hamann et al., 2005). Eine frisch auf LBAC gewachsene *E. coli*-Einzelkolonie diente zum Animpfen einer 5 ml LBAC-Kultur mit 0,2 % Arabinose zur Induktion des „red“-Locus auf pKOBEG. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert, da pKOBEG temperatursensitiv ist. Die Vorkultur diente zum Beimpfen einer 150 ml LBAC-Hauptkultur (+ 0,2 % Arabinose). Die Hauptkultur wurde bei 30 °C und 180 Upm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,8 inkubiert. Alle weiteren

Schritte wurden im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 5300 Upm, 4 °C, GSA) wurde das Sediment in einem Volumen eiskaltem Wasser resuspendiert, diese Schritte wurden zwei Mal wiederholt. Die Bakteriensuspension wurde dann erneut zentrifugiert (10 min, 5300 Upm, 4 °C, GSA) und in 1/12,5 Vol. eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach abschließender Zentrifugation (10 min, 5800 Upm, 4 °C, SS34) erfolgte die Resuspension der Zellen in 1/333,3 Vol. eiskaltem 10 % Glycerin. Diese Suspension wurde zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C.

4.3.8.5 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

- Transformation mit Hilfe eines Hitzeschocks

5 µl des Ligationsansatzes bzw. 2,5 ng Plasmid-DNA (z. B. pBSSK) für die Positivkontrolle wurden auf ein Volumen von 50 µl mit 1 x TE aufgefüllt. Die kompetenten Zellen wurden 15 min auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 µl der Zellsuspension zur DNA. Dieses Gemisch wurde für 40 min auf Eis und anschließend für 3 min bei 42 °C inkubiert. Danach wurde ein ml LB-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und dieser für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend zentrifugiert (10 min, 6000 Upm, 16F24-11). Das Bakteriensediment wurde in 300 µl LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde vollständig (3 x 100 µl) auf LB- bzw. X-Gal- Medium (+ Selektionsmarker) ausplattiert. Bei der Positiv-Kontrolle wurde auf die letzte Zentrifugation verzichtet und jeweils 100 µl der 1:10 verdünnten Zellsuspension auf LBA ausplattiert. Die Transformationseffizienz (TEZ) der Positiv-Kontrolle sollte ca. 2-3 x 10⁶ Transformanden pro µg DNA betragen und wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{TEZ [T/}\mu\text{g DNA]} = (\text{T} \times \text{V}_g) / (\text{M} \times \text{V}_a)$$

T: Transformantenzahl, V_g [ml]: Gesamtvolumen, V_a [ml]: ausplattiertes Volumen, M: Menge der eingesetzten DNA [µg]

- Transformation durch Elektroporation

Die zu transformierende DNA wurde zur Entsalzung 2 x 15 min gegen Wasser dialysiert (Dialyse-Membran von Millipore). 50 µl kompetente Zellen (*E. coli* KS 272 [pKOBEG, Cosmid #42B8]) und 20 µl DNA (ca. ein µg) wurden in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Das Gemisch wurde im Elektroporationsgerät „Easyject Prima“ (Equibio) mit einem 2500 V-Spannungsimpuls behandelt. Anschließend erfolgte die sofortige Zugabe von einem ml SOC-Medium. Nach Inkubation für eine Stunde bei 30 °C erfolgte die Ausplattierung von 80 µl des Transformationsansatzes auf LBAB-Medium.

4.3.9 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma „Scientific Research & Development GmbH“ (Frankfurt) nach der Kettenabbruchmethode durchgeführt.

4.3.10 Oligonukleotidsynthese

Die Synthese von Oligonukleotiden wurde von der Firma Roth (Karlsruhe) durchgeführt.

4.3.11 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. „Polymerase Chain Reaction“ [PCR]) dient der spezifischen Amplifikation von DNA. Nach thermischer Denaturierung der Matrizen-DNA können Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden Abschnitt flankieren, bei der Anlagerungstemperatur hybridisieren. Die Anlagerungstemperatur T_a eines Oligonukleotids lässt sich näherungsweise mit folgenden Formeln berechnen (nach Wu et al., 1991):

$$L = 2 \times (G + C) + A + T$$

$$T_a [^{\circ}\text{C}] = (22 + 1,46 \times L) - 5 \text{ } ^{\circ}\text{C}$$

A, T, G, C: Anzahl der Adenin-, Thymin-, Guanin-, und Cytosin-Basen im Oligonukleotid

Die angelagerten Oligonukleotide werden von der hitzestabilen DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* als Startstellen für die Synthese der komplementären Matrizen-Stränge erkannt. In der Synthesephase können pro Minute ca. 1000

Nukleotide verknüpft werden. Nach diesem Schritt wird die DNA wieder denaturiert; ein weiterer Reaktionszyklus beginnt. Nach n Zyklen wird der von den Oligonukleotiden flankierte Bereich der Matrizen-DNA theoretisch um den Faktor 2^n vervielfältigt. Die jeweils verwendeten PCR-Programme befinden sich in den entsprechenden Abbildungslegenden im Ergebnisteil.

Ein üblicher 50 μ l PCR-Ansatz enthält folgende Komponenten: Matrizen-DNA (10 ng Plasmid-DNA, 20 ng Cosmid-DNA oder 100 ng genomische DNA), zwei Oligonukleotide (jeweils 0,5 μ M), 1 x PCR-Puffer (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen), dNTP-Lösung (0,2 mM) und *Taq*-Polymerase (2,5 U, Invitrogen).

Für eine „Kolonie-PCR“ wurde Zellmaterial einer über Nacht herangewachsenen Bakterienkolonie mit einer sterilisierten Impflanzette in das Reaktionsgefäß mit den PCR-Komponenten überführt. Die initiale Denaturierung wurde für 4 Minuten bei 95 °C durchgeführt.

Zur Aufreinigung von PCR-Amplifikaten wurde das „NucleoSpin Extract 2-in-1-Kit“ (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4.4 Proteintechniken

4.4.1 Isolation mitochondrialer Proteine aus *P. anserina*

- Anzucht des Myzels

Auf fünf BMM-Platten wurden jeweils 15-20 Myzelstückchen angeimpft und für drei Tage bei 27 °C inkubiert. Das Myzel wurde anschließend abgeschabt und, nach Vereinigung in einem Kolben mit 200 ml CM, in einen 5 l Schikanekolben mit 1,5 l CM überführt. Dieser Ansatz wurde für 3-4 Tage bei 27 °C geschüttelt (120 Upm).

- Aufarbeitung

Nach Filtration des Ansatzes über zwei Lagen Mull wurde überschüssiges Medium ausgepresst und das Feuchtgewicht des Myzels (ca. 15-20 g) bestimmt. Das Myzel wurde in flüssigem Stickstoff gründlich gemörsert. Nach Überführung des Pulvers in einen GSA-Becher erfolgte die Zugabe von 5 ml eiskaltem AM-Puffer mit 30 mg Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und 6,3 mg L-Cystein, wobei sich die Angaben auf ein Myzelfeuchtgewicht von einem g beziehen. Das Gemisch wurde für eine Stunde bei 4 °C gerührt und danach zentrifugiert (10 min, 3000 Upm, 4 °C, GSA). Der Überstand wurde

durch zwei Lagen Mull filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert (30 min, 10000 Upm, 4 °C, GSA). Die Aufnahme des Sediments erfolgte in 10 ml eiskaltem Waschpuffer. Die Suspension wurde gründlich mit einem Homogenisator behandelt. Nach Zugabe von 10 ml Waschmedium (4 °C) wurden 8 ml 0,6 M Saccharoselösung (vorgelegt in einem SS34-Röhrchen) mit der homogenisierten Lösung überschichtet. Nach Zentrifugation (20 min, 9500 Upm, 4 °C, SS34) wurde das Mitochondriensediment je nach Größe in 200-300 µl eiskaltem Suspensionspuffer (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,2) aufgenommen.

4.4.2 Isolation intakter Mitochondrien aus *P. anserina*

- Anzucht des Myzels

Auf fünf bis sieben mit je einer Cellophanfolie beschichteten BMM-Platten wurden jeweils 25-40 Myzelstückchen angeimpft und für 1,5 Tage bei 27 °C inkubiert. Juveniles und mittelaltes Myzel wurde von den Platten in jeweils einen Kolben mit 200 ml CM überführt und für zwei Tage bei 27 °C geschüttelt (143 Upm). Seneszenten Myzel wurde in Fernbachkolben mit 150 ml CM überführt und für drei bis vier Tage bei 27 °C ohne Schütteln inkubiert.

- Aufarbeitung

Nach Filtration des Myzels über zwei Lagen Mull wurde überschüssiges Flüssigmedium ausgepresst und das Feuchtgewicht (ca. 15-20 g) bestimmt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Das Myzel wurde anschließend mit Mitochondrienisolationpuffer (+ 0,2 % BSA) versetzt und verrührt, bis eine breiartige Konsistenz erhalten wurde. Das Myzel (d. h. ca. 1/3 der Gesamtmenge) wurde in die Kammer eines „Bead-Beaters“ (Biospec) überführt, die zur Hälfte mit sterilen Glasperlen (0,5 mm, Biospec) gefüllt war. Die Kammer wurde mit Puffer aufgefüllt. Zur Unterbindung von Schaumbildung wurden einige Tropfen „Antifoam“-Lösung (Sigma, 1:5 in Wasser verdünnt) auf der Flüssigkeitsoberfläche verteilt. Das Myzel wurde anschließend im „Bead-Beater“ zerrieben (2 x 15-20 Sekunden), wobei zwischen den Schritten eine Pause von zwei Minuten zur Abkühlung der Probe eingehalten wurde. Das Homogenat wurde über ein Nesseltuch filtriert und anschließend zentrifugiert (5 min, 2000 Upm, 4 °C, GSA). Der Überstand wurde durch einen Glaswolltrichter filtriert. Das Filtrat wurde

zentrifugiert (20 min, 11500 Upm, 4 °C, SS34). Das Sediment wurde in Isolationspuffer (ohne BSA) resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Zeit (ca. 1-2 Minuten) bildete sich ein Sediment (vermutlich Zellwandreste und Vakuolen). Der mitochondrienhaltige Überstand wurde in ein SS34-Gefäß überführt und mit Isolationspuffer versetzt, bis das Gefäß zu 3/4 gefüllt war. Nach einer weiteren Zentrifugation (20 min, 11500 Upm, 4 °C, SS34) wurde der Überstand und der dunkle Zentralbereich des Sediments (vermutlich Vakuolen) verworfen. Der helle Sedimentrand (Mitochondrien) wurde in Isolationspuffer (ohne BSA, ca. 200-300 µl) aufgenommen. Die Probe wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

4.4.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Zunächst erfolgte die Aufnahme einer Eichgeraden mit verschiedenen konzentrierten BSA-Lösungen. Hierzu wurden 0, 2,5, 5 und 10 µl einer BSA-Stammlösung (5 mg/ml) mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Zu jeder Verdünnung wurden 800 µl Roti-Nanoquant (Roth) (1:5 in Wasser verdünnt) pipettiert. Die Absorptionen bei 450 und 590 nm der BSA-Lösungen wurden gegen Wasser als Referenz im Photometer gemessen. Die Quotienten A_{590}/A_{450} wurden gegen die BSA-Konzentration aufgetragen. Die durch lineare Regression ermittelte Gerade diente als Eichgerade für die nachfolgenden Messungen. Die Proteinprobe mit einer unbekanntem Konzentration wurde ggf. mit Wasser verdünnt. Zu der in Wasser aufgenommenen Probe (Gesamtvolumen: 200 µl) wurden 800 µl Roti-Nanoquant pipettiert, bevor die Absorptionen bestimmt wurden.

4.4.4 Blau-native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Durch BN-PAGE lassen sich membranständige Proteinkomplexe (z. B. Atmungskettenkomplexe der mitochondrialen Membran) auftrennen und analysieren (Schägger und von Jagow, 1991). Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die schonende und vollständige Solubilisierung der Membranproteine. Hierfür ist das Detergenz Digitonin hervorragend geeignet (Schägger und Pfeiffer, 2000).

- Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine

Pro Spur eines BN-Gels wurden 100 µg Protein eingesetzt. Proteine und Arbeitslösungen wurden stets gekühlt aufbewahrt. Das Probenaliquot wurde zunächst aufgetaut und sorgfältig resuspendiert (durch auf- und abpipettieren). Die entsprechende Proteinmenge

(100 µg) wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einem ml 1,11 x Solubilisierungspuffer versetzt. Nach der anschließenden Zentrifugation (8 min, 14000 Upm, 4 °C, FA 45-24-11) wurde der Überstand verworfen. Das Mitochondriensediment wurde in 1 ml 1,11 x Solubilisierungspuffer aufgenommen. Nach der Zentrifugation (8 min, 14000 Upm, 4 °C, FA 45-24-11) wurde der Überstand sorgfältig entfernt. Das gewaschene Sediment wurde in 1,11 x Solubilisierungspuffer (+ 0,5 mM Proteaseinhibitor Pefabloc [Roth]) resuspendiert. Das Volumen richtete sich nach der Digitonin-Menge im Ansatz. Stets wurde im Massenverhältnis 4:1 (Digitonin : Protein) solubilisiert, wobei eine 10 % Digitonin-Stammlösung eingesetzt wurde. Die Digitonin-Endkonzentration sollte geringfügig über 1 % für eine vollständige Solubilisierung liegen. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die solubilisierten Membranproteine befanden sich nach Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, 10 min, 4 °C) im Überstand, der in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser wurde mit 1 x BN-Ladepuffer versetzt.

- Herstellung von BN-Gradientengelen

Tab. 1: Zusammensetzung der Trenngel (TG)-Mischungen und des Sammelgels (SG) für die BN-PAGE.

	TG 4 %	TG 13 %	SG 3,5 %
Glyzerin	-	2,41 ml	-
30 % Acrylamid	1,92 ml	713,6 µl	1697,5 µl
40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	-	4,28 ml	-
2 % Bisacrylamid	889 µl	-	787,5 µl
3 x BNP-Puffer	4,95 ml	4,94 ml	5 ml
Wasser	7 ml	2,24 ml	7,39 ml
TEMED	6,8 µl	4,1 µl	11,9 µl
10 % APS	68 µl	41 µl	119 µl

Zur Auftrennung der solubilisierten Proben wurden Gradiententrenngel (4-13 %) mit 3,5 % Sammelgelen verwendet. Die folgenden Schritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Zunächst wurden die zwei Trenngelmischungen angesetzt (siehe Tab. 1). Mit Hilfe einer Mischapparatur zum Gießen von Gradientengelen wurde ein 4-13 %-Trenngel gegossen. Die Polymerisation erfolgte bei RT. Das Trenngel wurde anschließend mit einer 3,5 % Sammelgelmischung überschichtet. Nach Einsetzen des Kammes (BioRad) wurde gewartet, bis das Sammelgel auspolymerisiert war. Nach Entfernen des Kammes wurde das Gel in die Halterung der Elektrophoreseapparatur (Protean II xi [BioRad]) eingespannt. Die Taschen wurden sorgfältig mit 1 x BNP-Puffer gespült.

- Elektrophoretische Auftrennung der Proben im BN-Gel

Die Elektrophorese wurde im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Zum Einlauf der Proben betrug die Spannung 100 V für 90 Minuten, wobei der Strom auf 10 mA limitiert wurde. Der zweite Schritt der Elektrophorese wurde für 100 Minuten bei 500 V durchgeführt (Stromlimit: 15 mA). Vor dem dritten und letzten Schritt (500 V für 150 Minuten, Stromlimit: 15 mA) wurde der 0,02 % (w/v) Coomassie Blau enthaltende BN-Kathodenpuffer mit hellerem (0,002 % [w/v] Coomassie Blau) Kathodenpuffer gewechselt, damit Proteinbanden bereits während der Elektrophorese sichtbar wurden.

- Färbung des BN-Gels zum Nachweis von Proteinen

Zur Protein-Gesamtfärbung wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden die Proteine durch 30 Minuten Inkubation in Coomassie-Entfärber fixiert. Die Färbung erfolgte durch Inkubation des Gels für 30 Minuten in Coomassie-Färbelösung. Anschließend wurde das gefärbte Gel kurz mit Wasser abgepült, bevor es über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert wurde. Proteine werden durch Blaufärbung im Gel nachgewiesen.

Zum Nachweis von NADH-Dehydrogenase-Aktivität im Gel (Jung et al., 2000) wurde es nach der Elektrophorese bei RT in einer Färbelösung inkubiert, die β -NADH (Sigma) als Elektronendonator und NBT (Sigma) als Oxidationsmittel enthält. Durch NADH-Dehydrogenase-Aktivität im Gel wird NBT zu einem violetten Formazan reduziert, das ein unlösliches Präzipitat bildet.

Zum Nachweis von Cytochrom-c-Oxidase (COX)-Aktivität im Gel (Jung et al., 2000) wurde das BN-Gel nach der Elektrophorese bei RT in einer Färbelösung inkubiert, die u. a. oxidiertes Cytochrom-c und Diaminobenzidin (DAB) enthält. DAB wird durch Cytochrom-c oxidiert. An Orten mit COX-Aktivität wird Cytochrom-c schnell reoxidiert. Auf diese Weise kann das oxidierte DAB polymerisieren und ein unlösliches braunes Präzipitat im Gel bilden.

4.4.5 Spektralphotometrische Bestimmung der Komplex I- und III-Aktivität in mitochondrialen Isolaten

Die zunächst durchgeführte Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine (100 µg) wurde jeweils in unterschiedlichen Massenverhältnissen Digitonin : Protein (0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1) für 10 min auf Eis in Messpuffer durchgeführt. Eine Probe wurde jeweils nicht solubilisiert. Die enzymatischen Aktivitäten wurden anschließend spektralphotometrisch (DW 2000 [SLM Aminco]) bei RT in Gegenwart von KCN und SHAM (jeweils 2 mM) zur Hemmung der Endoxidasen COX bzw. AOX bestimmt. Das Spektralphotometer war mit einem Küvettenrührer (H+P Labortechnik) ausgerüstet. Zur Messung von Komplex I-Aktivität wurde die 2-*n*-Decylchinazolin-4-yl-amin (DQA, 20 µM)-abhängige Oxidation von β-NADH (200 µM) bei 340 minus 400 nm bestimmt, wobei Decylubichinon (75 µM) als Elektronenakzeptor diente. Komplex III-Aktivität wurde als Antimyzin A (40 µM)-abhängige Reduktion von Cytochrom-c (70 µM) bei 550 minus 540 nm gemessen, wobei Decylubichinol (75 µM) als Elektronendonator diente. Die gekoppelte enzymatische Aktivität der Komplexe I und III wurde sowohl mit als auch ohne Beigabe von 50 µM Decylubichinon durch Bestimmung der DQA- und Antimyzin A-abhängigen Reduktion von Cytochrom-c (70 µM) in Gegenwart von 200 µM β-NADH als Elektronendonator bei 550 minus 540 nm gemessen.

4.5 Cytologische Techniken

4.5.1 Fluoreszenzmikroskopische Analyse von *P. anserina*-Mitochondrien

Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1 % Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchteammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien in Hyphen wurde eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (DM LB, λ_{ex} 515-560 nm, λ_{em} > 590 nm, Leica) analysiert. Die Bilder wurden photographisch (Powershot S40, Canon) festgehalten.

Zur Analyse der mitochondrialen Segregation während der Ascosporengengese wurde der Farbstoff DASPMI (Dimethylaminostyrylpyridiniumiodid) (25 µg/ml in H₂O) angewendet, dessen Aufnahme vom mitochondrialen Membranpotenzial abhängig ist. Zunächst wurden unreife Perithezien der analysierten Kreuzungen auf Präparationsagar mit einer Impfnadel geöffnet. Anschließend folgte die Überführung des Perithezieninhalts (d.h. unreife Ascii) auf einen Objektträger. Die DASPMI-Lösung wurde auf das Präparat pipettiert. Nach kurzer

Inkubationszeit (2 min) wurden die Ansätze mit dem Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} 450-490 nm, $\lambda_{\text{em}} > 515$ nm) analysiert.

4.5.2 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse von *P. anserina*-Mitochondrien

- Anzucht des Myzels

Auf einer mit Cellophanfolie beschichteten BMM-Platte wurden jeweils 15-25 Myzelstückchen angeimpft und für zwei Tage bei 27 °C inkubiert. Das Myzel wurde von der Platten in einen Kolben mit 200 ml CM überführt und für drei Tage bei 27 °C geschüttelt (143 Upm).

- Fixierung der Probe

Aus der Flüssigkultur entnommene Myzelpellets (ca. 100 mg Feuchtwicht) wurden zunächst für 10 min bei RT und anschließend über Nacht bei 4 °C in 3 % (v/v) Glutaraldehyd (in 0,2 M Natriumcacodylatpuffer, pH 7,5) inkubiert. Anschließend wurden die Pellets mit Cacodylatpuffer gewaschen und zur weiteren Fixierung bzw. Kontrastierung in 2 % Osmiumtetroxid (4 % [w/v] Stammlösung in Cacodylatpuffer) für 1,5 Stunden bei RT behandelt. Nach der gründlichen Waschung mit Cacodylatpuffer wurden die Proben dehydriert.

- Dehydrierung der Probe

Zur Entwässerung wurden die fixierten Myzelpellets jeweils für 10 min bei RT in den folgenden Acetonverdünnungen inkubiert (jeweils % [v/v]): 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 und 100.

- Einbettung der Probe in eine Kunststoffmatrix

Die Einbettung der Proben erfolgte in Spurr-Medium. Folgende Schritte (bei RT) wurden hierzu durchgeführt: 1.) Eine Stunde in 1:3 (Volumen/Volumen) Spurr-Medium : Aceton, 2.) eine Stunde in 1:1 Spurr-Medium : Aceton, 3.) eine Stunde in 3:1 Spurr-Medium:Aceton, 4.) eine Stunde in Spurr-Medium, 5.) 24 Stunden in Spurr-Medium.

Kleine Stücke der Pellets wurden anschließend in den Boden einer Gussform platziert. Die Formen wurden mit Spurr-Medium aufgefüllt. Nach Inkubation für eine Stunde bei 40 °C erfolgte die vollständige Aushärtung des Kunststoffs in einem Ofen bei 70 °C für 8-10 Stunden.

- Herstellung von Dünnschnitten durch Ultramikrotomie, Schnittkontrastierung

Zur Herstellung von Ultradünnschnitten (Dicke: 50-70 nm) wurden in das Ultramikrotom (Ultracut S [Reichert], ausgerüstet mit Binokular WILD M3Z [Leica]) eingespannte Glasmesser benutzt. Die Dünnschnitte wurden auf mit Pioloform beschichteten Kupferscheibchen aufgeschwemmt. (Die Glasmesser und die beschichteten Kupferscheibchen wurden von Frau M. Stöhr [Fb Biowissenschaften, Frankfurt] bereitgestellt.) Nach Lufttrocknung der Präparate erfolgten zwei Schnittkontrastierungen bei RT: 1.) Inkubation für 15 Minuten in 5 % (w/v) Uranylazetat und (nach Waschen der Präparate in Wasser) 2.) Inkubation für 7 Minuten in Bleicitratlösung (nach Reynolds). Die Präparate wurden anschließend in Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

- Analyse der Probe im TEM

Zur Analyse der Ultradünnschnitte erfolgte in dem Transmissionselektronenmikroskop EM 902 (Zeiss) bei einer Elektronenbeschleunigungsspannung von 80 kV. Das Gerät verfügt über die Möglichkeit der elektrographischen Dokumentation der Präparate. Die Entwicklung der Aufnahmen wurde von Herrn H. Schewe [Fb Biowissenschaften, Frankfurt] durchgeführt.

4.5.3 Bestimmung des ATP-Gehalts in *P. anserina*

- Anzucht des Myzels

Auf einer BMM-Platte wurden jeweils 15-25 Myzelstückchen angeimpft und für zwei bis drei Tage bei 27 °C inkubiert. Juveniles und mittelaltes Myzel wurde von den Platten in jeweils einen Kolben mit 200 ml CM überführt und für zwei Tage bei 27 °C geschüttelt (143 Upm). Seneszenten Myzel wurde in Fernbachkolben mit 150 ml CM überführt und für zwei bis drei Tage bei 27 °C ohne Schütteln inkubiert.

- Probenvorbereitung und Durchführung der Messung

Nach Filtration der Flüssigkultur über zwei Lagen Mull wurde das Myzel mit ATP-Isolationspuffer (100 mM NaCl, 50 mM KH_2PO_4 , pH 6,0) gespült. Jeweils 100 mg Myzel wurden mit 100 μl Isolationspuffer in Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) gegeben und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zum Aufschluss des Myzels wurden zu den Proben 200 mg sterile Glasperlen (0,25-0,5 mm) hinzugefügt. Anschließend wurden die Ansätze für 15 Minuten im Wasserbad gekocht, um ATPasen zu inaktivieren. Nach Zugabe von 400 μl Wasser wurden die Myzelien für 2 min bei 5000 Upm in einem „Bead-Beater“ für Zentrifugenröhrchen (Cole-Parmer) zerschlagen. Die Proben wurden anschließend erneut für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Die Sedimentation der Myzelreste erfolgte durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm, RT, FA 45-24-11). 50 μl des Überstandes wurden entnommen und 1/1500 in Wasser verdünnt. Die ATP-Menge in 50 μl dieser Verdünnung wurde in einem Luminometer (Victor, Perkin Elmer) mit dem „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ (Roche) nach Herstellerangaben bestimmt.

4.5.4 Myzelfärbungen zur qualitativen Bestimmung der Freisetzung von Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid (modifiziert nach Munkres, 1990)

Die Anzucht der zu untersuchenden *P. anserina*-Stämme erfolgte auf synthetischem M2-Medium für zwei bis drei Tage im Dunkeln bei $27\text{ }^\circ\text{C}$, um die Myzelpigmentierung zu verzögern.

Zum Nachweis von freigesetzten Superoxidanionen wurde die Platte für 30 min bei $27\text{ }^\circ\text{C}$ mit 5 ml einer Lösung überschichtet, die 2,5 mM NBT in 5 mM MOPS-Puffer (pH 7,6 [NaOH]) enthielt. NBT wird durch die Superoxidanionen reduziert und bildet auf diese Weise einen violetten unlöslichen Niederschlag (Formazan) auf dem Myzel. Nach Abgießen der Färbelösung wurden die Ansätze im Dunkeln bei $27\text{ }^\circ\text{C}$ für drei Stunden inkubiert. Die Dokumentation erfolgte durch „Einscannen“ der Platte.

Für die Untersuchung der H_2O_2 -Freisetzung wurde analog verfahren, die Färbelösung enthielt 2,5 mM DAB in 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 6,9). Das Wasserstoffperoxid führt zur Oxidation von DAB, welches polymerisiert und einen unlöslichen braunen Niederschlag auf dem Myzel und im Medium bildet.

5. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Vertiefung des Verständnisses zur Rolle der Mitochondrien bei der Alterung von *Podospora anserina*. Hierzu wurden cytologische, biochemische und molekularbiologische Ansätze gewählt. Kapitel 5.1 stellt fluoreszenz- und transmissionselektronische Analysen an mitochondrialen Präparaten von Wildstamm s und den langlebigen Mutanten *grisea* und *ex1* vor. Strukturelle Analysen anhand elektrophoretischer Techniken (BN-PAGE) und enzymkinetischer Messungen von Atmungskettenkomplexen im Wildstamm und in *ex1* sind Gegenstand von Kapitel 5.2. Das dritte und abschließende Kapitel beschreibt Analysen zur Charakterisierung des putativen mitochondrialen Teilungsgens *PaDnm1*. Insbesondere die Modulation der Expression im Wildstamm „s“ soll Auskunft über die Bedeutung dieses Gens und, weiterführend, der mitochondrialen Morphologie für das Altern des Pilzes geben.

5.1 Untersuchungen zur Morphologie der Mitochondrien in verschiedenen Altersstadien von Wildstamm „s“ und den langlebigen Mutanten *grisea* und *ex1*

Die Morphologie der Mitochondrien unterliegt dynamischen Prozessen und kann somit den jeweiligen Anforderungen der Zelle angepasst werden. Morphologische Veränderungen sind insbesondere bei zahlreichen Entwicklungsprozessen zu beobachten. Hierzu gehören u. a. Apoptose und Seneszenz (siehe Kap. 1.2.4 u. 1.3.3). In der menschlichen Lungenfibroblastenzelllinie MRC-5 beispielsweise wird die altersbedingte Zunahme der Mitochondrienmasse als Kompensation für die im Alter u. a. durch reaktive Sauerstoffspezies beschädigten Mitochondrien angesehen (Lee et al., 2000). Im Gegensatz zu anderen Modellorganismen und -systemen ist über die mitochondriale Morphologie im Verlauf des Alterns bei *P. anserina* sehr wenig bekannt. Aus diesem Grund erfolgte das Studium der Mitochondrienmorphologie in verschiedenen Altersstadien des *P. anserina*-Wildstammes „s“ (Abb. 5 A-C). Hierfür wurde eine fluoreszenzmikroskopische Technik etabliert, bei der der Pilz auf einer mit Nährmedium gefüllten Mulde eines Objektträgers in einer Feuchtkammer für einen Tag bei 27 °C angezogen wird. Die Mitochondrienfärbung erfolgte mit dem Farbstoff „Mitotracker Red CMXRos“ (Sigma). Auf diese Weise lässt sich ein Gesamtbild über die zelluläre Mitochondrienpopulation gewinnen. Sowohl im juvenilen (~ 4-5 d) als auch insbesondere im mittelalten (~ 15 d) Stadium enthalten Hyphen des Wildstammes „s“ überwiegend filamentöse Mitochondrien (Abb. 5 A, B). In seneszenten (~ 26 d) Wildstämmen sind die Mitochondrien hingegen fragmentiert (Abb. 5 C). Die langlebige Mutante *grisea* zeigt im

Verlauf des Alterns einem dem Wildstamm „s“ vergleichbaren Übergang von filamentösen zu fragmentierten Mitochondrien (Abb. 5 D-F). Den juvenilen Wildstamm „s“- und grisea-Isolaten ähnlich ist die Mitochondrienmorphologie in der unsterblichen Mutante ex1 (Abb. 5 G). Zusammenfassend zeigen die anhand der fluoreszenzmikroskopischen Analyse gewonnenen Daten, dass sich die mitochondriale Morphologie während des Alterns in den untersuchten Stämmen ähnlich wie in Lungenfibroblasten (Lee et al., 2000) verändert.

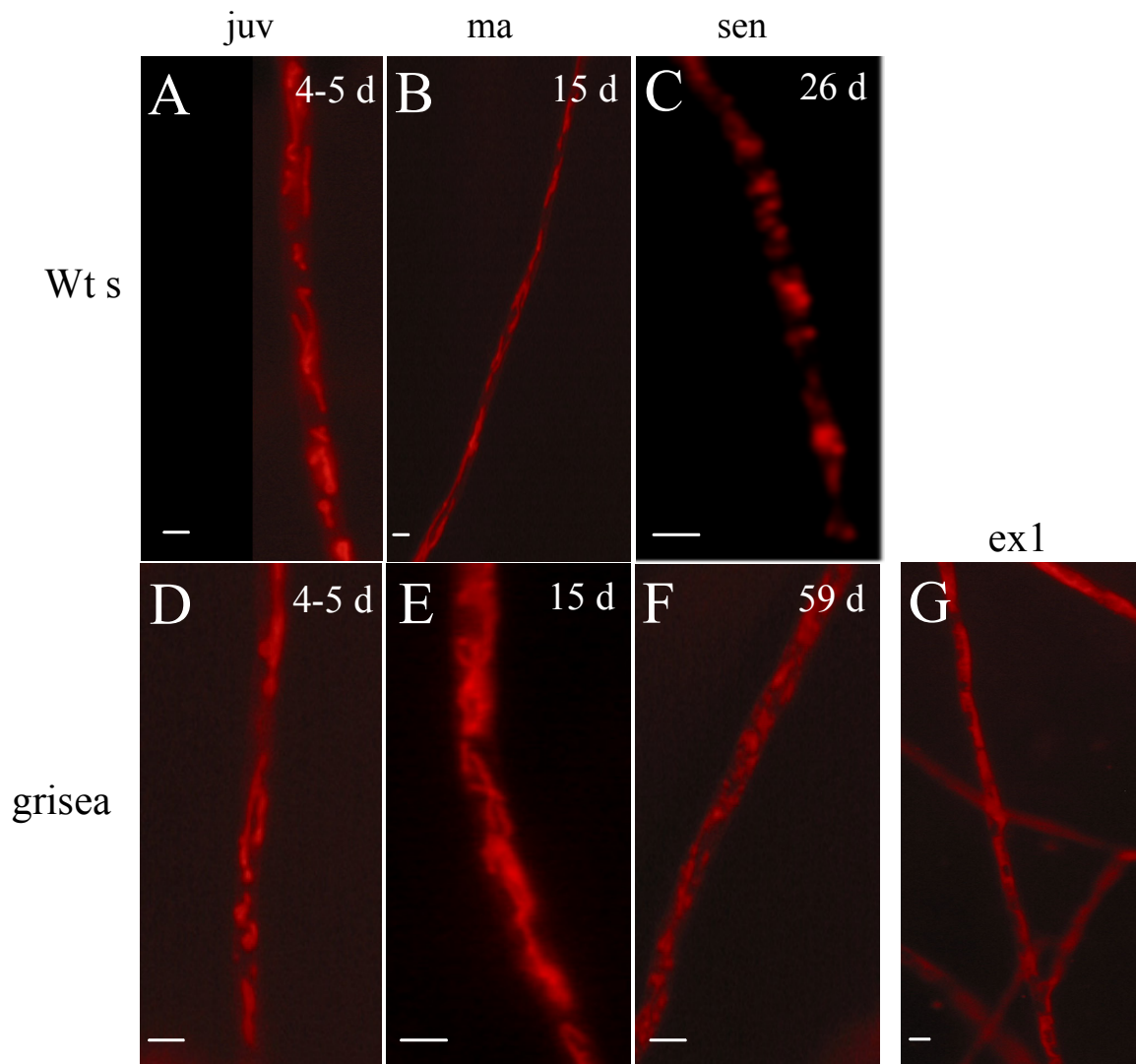


Abb. 5: Mitochondrienmorphologie in Hyphen von Wildstamm „s“ (Wt s) und den Mutanten grisea und ex1. Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1% Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchtekammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien wurde eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} 515-560 nm, λ_{em} > 590 nm) analysiert. (A, B) Juvenile und mittelalte (15 d) Wildstämme zeigen überwiegend filamentöse Mitochondrien. (C) Diese fragmentieren im seneszenten Stadium. (D-F) Isolate der Mutane grisea zeigen eine vergleichbare Änderung der mitochondrialen Morphologie während des Alterns. (G) Die Hyphen der unsterblichen Mutante ex1 enthalten überwiegend filamentöse Mitochondrien. Rechts oben in den Teilabbildungen ist jeweils das Alter der Kultur angegeben. (Bei der unsterblichen Mutante ex1 ist das Alter unbestimmt). Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 µm.

Die hier vorgestellten fluoreszenzmikroskopischen Analysen sind dazu geeignet, Aussagen über die mitochondriale Morphologie von *P. anserina* in verschiedenen Stadien zu machen. Um die Feinstruktur der Mitochondrien zu analysieren, sind jedoch mikroskopische Techniken mit höherem Auflösungsvermögen notwendig. Hierzu zählt die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), die in der Vergangenheit bereits erfolgreich zur Analyse von *P. anserina*-Präparaten eingesetzt wurde (Delay, 1963; Esser und Minuth, 1972). Gezielte Untersuchungen hinsichtlich der mitochondrialen Feinstruktur wie z. B. der Cristaemorphologie bei *P. anserina* sind bisher jedoch nicht durchgeführt worden. Insbesondere sollte in dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, ob die Mitochondrien der langlebigen Mutanten *grisea* und *ex1* gegenüber denen des Wildstammes eine veränderte Feinstruktur zeigen (Abb. 6). Zunächst wurde ein Protokoll zur Herstellung von Myzelpräparaten für die TEM-Analyse entwickelt (siehe Kapitel 4.5.2). Die Hyphen der untersuchten Stämme lassen im TEM (EM 902 [Zeiss]) neben Freiräumen (evtl. Vakuolen) und anderen, nicht näher identifizierten Komponenten, einzelne Mitochondrien erkennen (Abb. 6 A, B, D). Bei starker Vergrößerung lassen sich die äußere und innere Membran des Mitochondriums räumlich auflösen (Abb. 6 B). Faltungen der inneren Membran (Cristae) lassen sich bereits bei geringeren Vergrößerungen deutlich erkennen. Bei Wildstamm „s“ und Mutante *grisea* ist eine lamellenartige Cristaestruktur erkennbar (Abb. 6 A-C). In der Mutante *ex1* hingegen erscheinen die Cristae ungeordneter und weniger zahlreich (Abb. 6 D). Die hier vorgestellten TEM-Analysen sind als initial einzustufen, da die Anzahl der auswertbaren Myzelpräparate bei allen Stämmen relativ niedrig war. Grund hierfür ist der sehr hohe Anteil von Hyphenschnitten ohne erkennbare Mitochondrien. Möglicherweise hängt dies mit der Anzucht des Pilzes in Flüssigkultur zusammen, da bei Wachstum auf Festmedium zahlreiche Mitochondrien in Hyphen sichtbar sind (Abb. 5). Ansonsten ist das hier verwendete Protokoll zur TEM-Analyse der Mitochondrien von *P. anserina* geeignet, um feinstrukturelle Aspekte zu untersuchen.

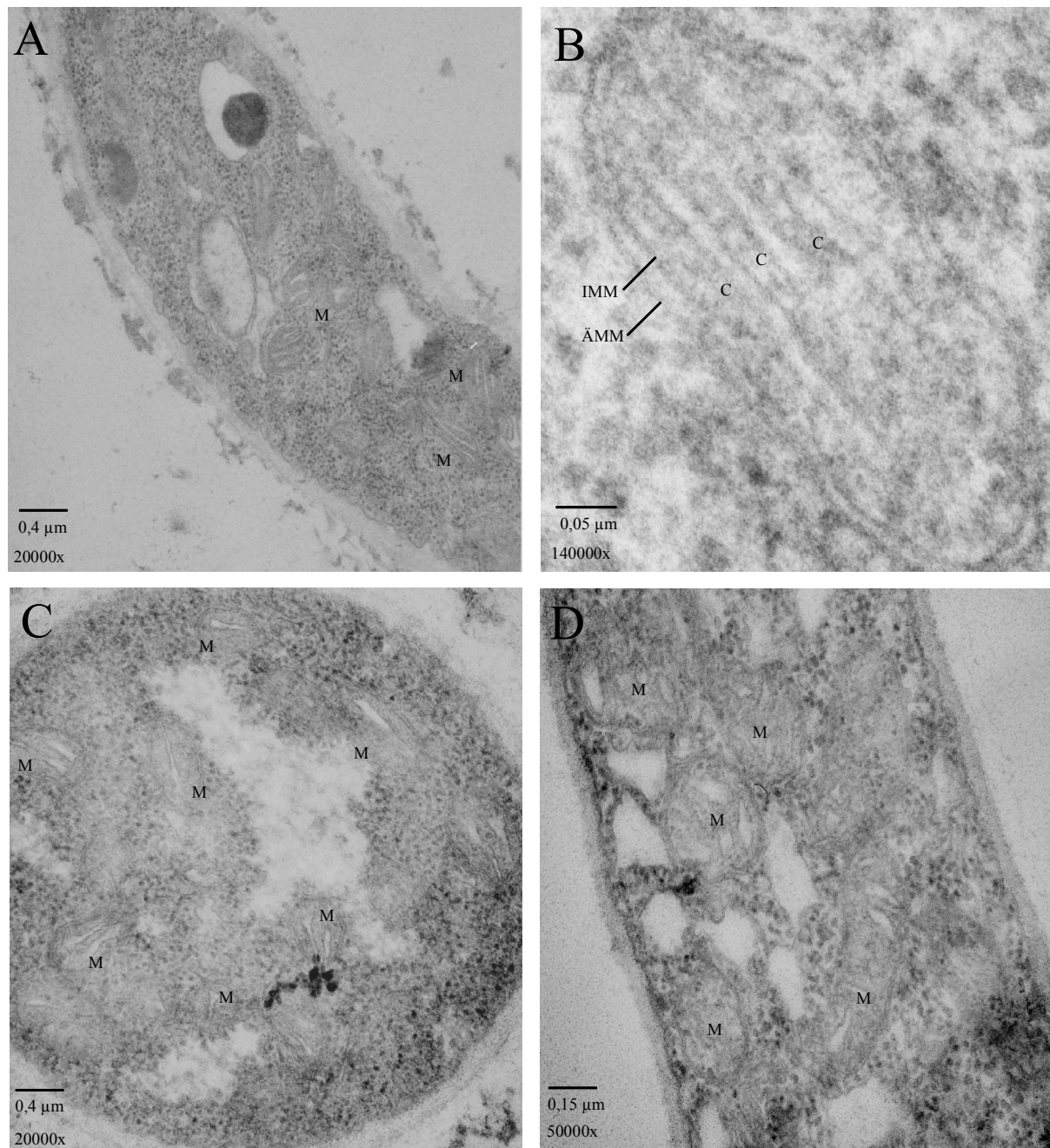


Abb. 6: Ultrastrukturelle Analyse von *P. anserina*-Mitochondrien. Für die Probenvorbereitung wurden in Flüssigkultur angezogene Myzelpellets der entsprechenden Isolate mit 3 % Glutaraldehyd und 2 % Osmiumtetroxid fixiert / kontrastiert. Nach Dehydratation in einer Acetonreihe erfolgte die Einbettung der Myzelstücke in Spurr-Medium. Die nach Ultramikrotomie erhaltenen Dünnschnitte (50-70 nm) wurden in 5 % Uranylazetat und Bleizitrat (nach Reynolds) nachkontrastiert. Die Präparate wurden in einem Transmissions-Elektronenmikroskop (EM 902, Zeiss) bei einer Elektronenbeschleunigungsspannung von 80 kV analysiert. **(A)** Längsschnitt einer Hyphe des Wildstammes „s“ (mittelalt, 15 Tage). **(B)** Einzelnes Mitochondrium des mittelalten Wildstammes. **(C)** Querschnitt durch eine Hyphe der Mutante grisea. **(D)** Längsschnitt einer Hyphe der Mutante ex1. Links unten ist jeweils die Vergrößerung und der Maßstabsbalken angegeben. M = Mitochondrium, C = Crista, IMM = Innere mitochondriale Membran, ÄMM = Äußere mitochondriale Membran

5.2 Untersuchungen zum Aufbau der mitochondrialen Atmungskette im Wildstamm „s“ und der unsterblichen Mutante ex1

Die Analyse der mitochondrialen Form und Feinstruktur durch geeignete mikroskopische Techniken ist ein wertvoller Ansatz zur Untersuchung der Morphologie dieser Organellen in verschiedenen alten *P. anserina*-Isolaten bzw. Mutanten mit einer veränderten Lebensspanne. Für das Studium der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung sind hingegen biochemische Methoden wie z. B. elektrophoretische Techniken zur Proteinseparation und enzymkinetische Messungen sinnvoll.

Langlebige bzw. unsterbliche *P. anserina*-Mutanten wie z. B. *grisea* (Prillinger und Esser, 1977), *ex1* (Kück et al. 1985b), *PaCox5::ble* (Dufour et al., 2000) und *PaCox17::ble* (Stumpferl et al., 2004) sind durch Veränderungen innerhalb der mitochondrialen Atmungskette gegenüber den Wildstämmen gekennzeichnet. Gemeinsames Merkmal ist die Nutzung einer so genannten alternativen Oxidase (AOX), die die Endoxidation durch Übertragung der Elektronen von Ubichinol auf molekularen Sauerstoff übernimmt. Dies ist notwendig, da die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase (COX) in diesen Mutanten eingeschränkt bzw. nicht vorhanden ist. In Tabak und der *PaCox5::ble*-Mutante wurde gezeigt, dass die AOX-abhängige Respiration zu einer verringerten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Maxwell et al., 1999; Dufour et al., 2000). Dieser „Nebeneffekt“ der AOX-Atmung ist möglicherweise ein entscheidender Faktor, der zur Lebensverlängerung in den genannten *P. anserina*-Mutanten beiträgt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Atmungsketten des Wildstammes „s“ und der langlebigen Mutante *ex1* hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und möglicher Wechselwirkungen zwischen den respiratorischen Komplexen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Mitochondrienproteine aus juvenilem Wildstamm „s“ und der Mutante *ex1* isoliert. Die Freisetzung der mitochondrialen Membranproteine erfolgte durch Solubilisierung mitochondrialer Präparationen mit dem Detergens Digitonin, welches die Komplexstruktur der Atmungskettenenzyme erhält (Schägger und Pfeiffer, 2000). Mittels „Blau-nativer Polyacrylamidgelelektrophorese“ (BN-PAGE) erfolgte die Auftrennung der solubilisierten Proteine nach ihrer Größe (Abb. 7). Anschließend wurden diverse Färbetechniken eingesetzt: (i) Färbung der Proteine mit Coomassie Blau G250, (ii) Nachweis von NADH-Dehydrogenase-Aktivität durch NBT-Präzipitation im Gel (Jung et al., 2000) und (iii) Bestimmung von COX-Aktivität durch Präzipitation von oxidiertem Diaminobenzidin im Gel (Jung et al., 2000). Die Analyse von *ex1* durch BN-PAGE und „in Gel“-Aktivitätsassays wurde von Frau B. Kunstmann durchgeführt.

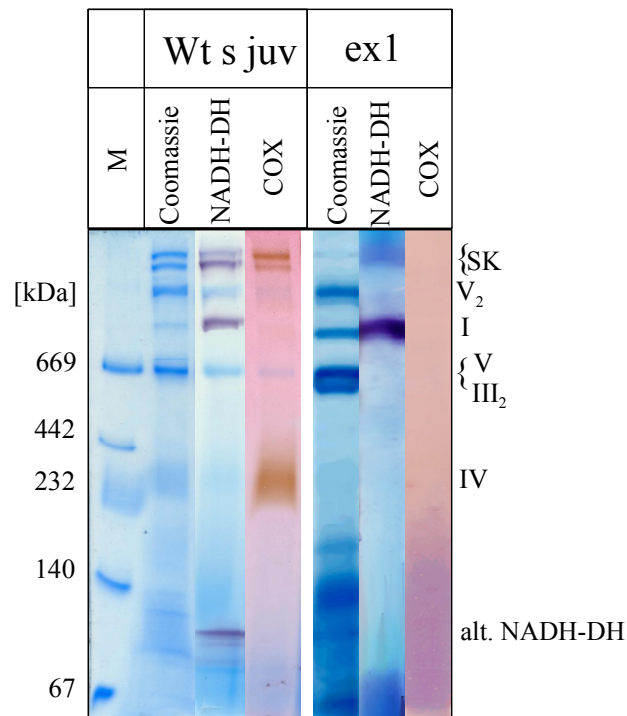


Abb. 7: Analyse der mitochondrialen Atmungskette des Wildstammes „s“ (juvenil) und der Mutante ex1 mit BN-PAGE und Aktivitätsassays. Nach Isolation der Mitochondrienproteine wurde eine Solubilisierung der Membranproteine mit Digitonin (Massenverhältnis 4:1 [Digitonin:Protein]) durchgeführt. Die Auftrennung der Solubilisate (jeweils 100 µg) erfolgte in BN-Gelen (Sammelgel: 3,5 %, Trenngel: 4-13 %). Neben der Färbung in Coomassie Blau G 250 wurden Aktivitätsassays zum Nachweis von NADH-Dehydrogenase (NADH-DH, Komplex I und alternative NADH-DH) und Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV) durchgeführt. NADH-DH-Aktivität wird durch violette NBT-Präzipitat und COX-Aktivität durch braunes DAB-Präzipitat sichtbar. In juvenilem Wildstamm „s“ sind die Atmungskettenkomplexe I, III (als Dimer), IV und V (ATP-Synthase, monomere und dimere Form) im BN-Gel erkennbar. Darüber hinaus sind die Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_2$ (verifiziert durch die Aktivitätsassays) vorhanden. Die Präparation der Mutante ex1 enthält die Komplexe I, III (als Dimer) und V (Monomer und Dimer). Komplex IV und Superkomplexe sind nicht nachweisbar. Die Analyse von ex1 wurde von Frau B. Kunstmann durchgeführt. SK = Superkomplexe, M = Größenstandard („High molecular weight calibration kit for native electrophoresis“ [Amersham], 5 µg)

In juvenilem Wildstamm „s“ sind die folgenden respiratorischen Enzymkomplexe im Coomassie-gefärbten BN-Gel nachweisbar (Abb. 7): Komplex I (NADH:Ubichinon-Dehydrogenase [NADH-DH]), Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase, dimere Form), Komplex IV (COX), Komplex V (ATP-Synthase, monomere und dimere Form) (Krause et al., 2004a). Weiterhin sind zwei Superkomplexspezies vorhanden.

Der „Respirasomentheorie“ nach liegen die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung nicht einzeln in der inneren mitochondrialen Membran vor, sondern bilden so genannte „Superkomplexe“, die u. a. in Mitochondrien von Pflanzen (Eubel et al., 2003; Krause et al., 2004b), Pilzen (Schägger und Pfeiffer, 2000; Krause et al., 2004a) und Säugern (Schägger und Pfeiffer, 2000) beschrieben wurden (Übersicht bei: Schägger, 2002). In Rinderherzmitochondrien wurden z. B. Superkomplexe bestehend aus Komplex I, Komplex III (als Dimer) und bis zu vier Komplex IV-Einheiten beschrieben (Schägger und Pfeiffer, 2000). Hinsichtlich der Bedeutung von Superkomplexen werden verschiedene Faktoren diskutiert (Übersicht bei: Schägger, 2002). Superkomplexe bieten eine Erhöhung der katalytischen Effizienz, weil zum einen die Diffusionszeiten von Stoffwechselintermediaten (z. B. Ubichinol, Cytochrom-c) verringert werden und zum anderen die Konkurrenz der Enzymmoleküle um die Substrate unterbleibt (Substratkanalisierung). Ein weiterer Nutzen der Superkomplexorganisation könnte die Abschirmung der Umgebung vor toxischen Zwischenverbindungen (z. B. Semiubichinonradikal) sein, wobei jedoch noch keine genaueren Daten vorliegen.

Aufgrund der Größe und der im Gel nachgewiesenen Komplex I- und Komplex IV-Aktivität handelt es sich hierbei vermutlich um $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_2$. Der Atmungskette von Mutante ex1 fehlen einige Komponenten des Wildstammes, hierbei handelt es sich um Komplex IV, putative alternative NADH-DH und Superkomplexe (Abb. 7). Komplex IV kann in ex1 aufgrund des durch mtDNA-Deletion fehlenden *PaCoxI*-Gens nicht assembliert werden (Schulte et al., 1988). Das Fehlen alternativer NADH-DH liegt vermutlich in der AOX-abhängigen Atmung mit Komplex I als einziger Protonenpumpe begründet, weil sonst die Gefahr eines entkoppelten Elektronenflusses bestünde. Superkomplexe wie Komplex I_2 , I_1III_2 und I_2III_2 in ex1 sind zuvor zwar beschrieben worden (Krause et al., 2004a), konnten hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte niedrigere Proteinmenge (100 μ g statt 150 μ g) sein, sodass die Nachweisgrenze unterschritten wurde. Auffällig ist die große Menge der Komplexe I und III in ex1. Die vorgestellten Resultate zeigen, dass sich die COX-abhängige Atmung vom Wildstamm und die AOX-abhängige Atmung der Mutante ex1 durch eine unterschiedliche Ausstattung an respiratorischen Enzymen unterscheiden. Durch enzymkinetische Messungen sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich in beiden Atmungsketten vorkommende Komponenten (z. B. Komplex I und Komplex III) funktionell unterscheiden lassen (Krause et al., 2004a) (Abb. 8). Hierfür wurden mitochondriale Präparationen nach dem Auftauen mit steigenden Digitoninkonzentrationen solubilisiert (Digitonin/Protein [D/P]) 1:1, 2:1, 3:1, 4:1), wobei eine Probe nicht mit dem Detergens behandelt wurde. Erwartungsgemäss nimmt die enzymatische Aktivität mit steigender Digitoninkonzentration zu, weil die membranständigen Atmungskettenkomplexe effizienter aus der Membran gelöst werden können. Digitonin führt in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht zur Dissoziation der Super- und Einzelkomplexe (Krause et al., 2004a). Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Komplex I wurde die 2-*n*-Decylchinazolin-4-yl-amin (DQA)-sensitive β -NADH-Oxidation bei 340 nm (NADH-Absorptionsmaximum) in einem Spektralphotometer (DW 2000 [SLM Aminco]) gemessen (Abb. 8 A).

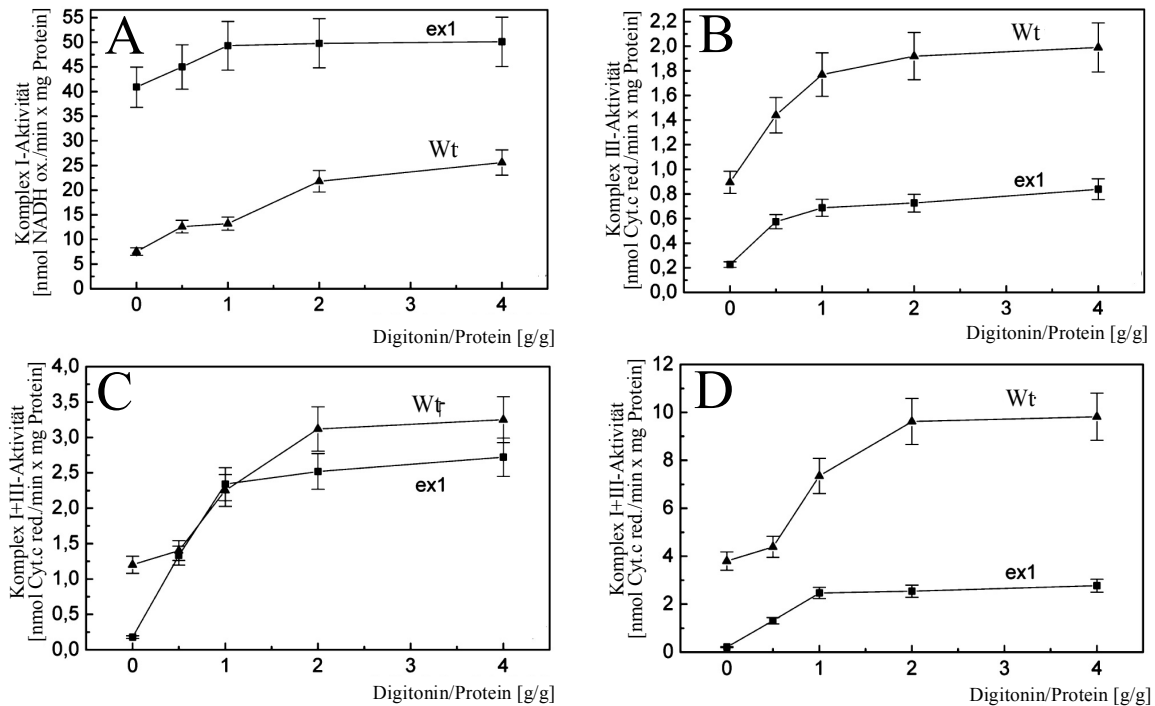


Abb. 8: Funktionale Unterschiede der Atmungskettenkomplexe I und III bei COX- und AOX-abhängiger Atmung. Mitochondriale Präparationen von juvenilem Wildstamm „s“ (▲) und der Mutante ex1 (■) wurden in den auf den Abszissen angegebenen Verhältnissen mit Digitonin solubilisiert. Die Aktivitäten der entsprechenden Komplexe wurden mit geeigneten Substraten (siehe Methoden) spektralphotometrisch bestimmt. Die Punkte der Graphen geben den Mittelwert \pm Standardabweichung von jeweils fünf unabhängigen Messungen wieder. **(A, Komplex I)** Die maximale Aktivität bei ex1 ist bereits bei einem Digitonin/Protein (D/P)-Verhältnis von 1:1 erreicht. Im Gegensatz dazu nimmt die Aktivität im Wildstamm nach diesem Punkt weiter zu. Dieser Befund deutet auf eine bessere Komplex I-Substratzugänglichkeit in ex1 hin. Bei einem D/P-Verhältnis von 4:1 wird im Wildstamm 50 % der Aktivität in ex1 erreicht. Dies spiegelt die relativen Komplex I-Mengen im Wildstamm und in ex1 wider. **(B, Komplex III)** Die solubilisierungsabhängige Aktivitätszunahme von Komplex III im Wildstamm und in ex1 ist vergleichbar mit der Situation bei Komplex I. Die spezifische Komplex III-Aktivität in ex1 ist deutlich geringer als im Wildstamm, da in dieser Mutante in BN-Gelen wesentlich mehr Komplex III nachgewiesen werden kann. **(C, Komplex I+III ohne Zugabe von 50 μ M Decylubichinon [DBQ])** Die gekoppelte Aktivität der Komplexe I+III beim Wildstamm ist bei den D/P-Verhältnissen 2:1 und 4:1 und insbesondere im unsolubiliertem Zustand höher als in ex1. **(D, Komplex I+III mit Zugabe von 50 μ M DBQ)** Der Aktivitätsunterschied zwischen Wildstamm und ex1 wird deutlicher, wenn DBQ (50 μ M) hinzugefügt wird. Während beim Wildstamm eine Erhöhung um den Faktor drei auftritt, bleibt die Aktivität im Falle von ex1 unbeeinflusst. Dem Elektronentransport von Komplex I zu Komplex III kommt in der Mutante somit keine relevante Bedeutung zu. Modifiziert nach Krause et al., 2004a.

Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. Die maximale Komplex I-Aktivität bei ex1 ist bereits bei einem Digitonin/Protein (D/P)-Verhältnis von 1:1 erreicht. Im Gegensatz dazu nimmt die Aktivität bei Wildstamm-Komplex I nach diesem Punkt weiter zu. Dieser Befund deutet auf eine bessere Komplex I-Substratzugänglichkeit in ex1 hin. Bei einem D/P-Verhältnis von 4:1 wird im Wildstamm 50 % der Aktivität von ex1-Komplex I erreicht. Dies spiegelt die relativen Komplex I-Mengen im Wildstamm und in ex1 wider (Abb. 7). Komplex III-Aktivität in Mitochondrienpräparationen von Wildstamm „s“ und ex1 wurde als Antimyzin A-sensitive Cytochrom-c-Reduktion bei 550 nm spektralphotometrisch bestimmt (Abb. 4 B). Die solubilisierungsabhängige Aktivitätszunahme von

Komplex III im Wildstamm und in ex1 ist vergleichbar mit der Situation bei Komplex I. Die spezifische Komplex III-Aktivität in ex1 ist jedoch deutlich geringer als im Wildstamm, da in dieser Mutante in BN-Gelen wesentlich mehr Komplex III-Protein nachgewiesen werden kann (Abb. 7). Neben der Bestimmung der Einzelaktivitäten der Komplexe I und III wurde die gekoppelte Aktivität (Komplex I+III) ohne und mit Zugabe von Decylubichinon (DBQ) bestimmt, um Wechselwirkungen zwischen diesen Komponenten im Wildstamm und in ex1 zu untersuchen (Abb. 8 C, D). Hierfür wurde die DQA- und Antimyzin A-sensitive Cytochrom-c-Reduktion bei 550 nm spektralphotometrisch gemessen. Die I+III-Aktivität beim Wildstamm ist ohne Zugabe von DBQ bei den D/P-Verhältnissen 2:1 und 4:1 und insbesondere im unsolubilisierendem Zustand höher als in ex1 (Abb. 8 C). Dieser Befund weist auf eine räumliche Interaktion der NADH-Dehydrogenase und Cytochrom-c-Reduktase hin und stellt einen funktionalen Nachweis der im Rahmen der BN-PAGE beobachteten Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_2$ (Abb. 7) dar. Durch die Zusammenfassung der beiden Komplexe I und III in Superkomplexen ist eine Steigerung der katalytischen Effizienz durch Substratkanalisierung denkbar (Schägger und Pfeiffer, 2000). Nach Zugabe von DBQ (50 μ M) ist die Differenz der gekoppelten Aktivität zwischen Wildstamm und ex1 größer (Abb. 8 D). Während beim Wildstamm eine Erhöhung um den Faktor drei auftritt, bleibt die Aktivität im Falle von ex1 nahezu unbeeinflusst. Dies bedeutet, dass dem Elektronentransport von Komplex I zu Komplex III in den Mitochondrienproben der Mutante ex1 keine relevante Bedeutung zukommt. Die Befunde legen nahe, dass in einer Mutante wie ex1 mit exklusiver AOX-Respiration Komplex III nicht als Elektronenüberträger dient, sondern möglicherweise andere Aufgaben übernimmt (Krause et al., 2004a) (siehe Diskussion). Die gewonnenen Daten lassen zusammenfassend qualitative und quantitative Unterschiede der COX- bzw. AOX-abhängigen Atmung in Wildstamm „s“ und Mutante ex1 erkennen.

5.3 Charakterisierung des putativen mitochondrialen Teilungsgens *PaDnm1*

5.3.1 Charakterisierung von *PaDnm1* auf Sequenz- und Transkriptebene

Im Rahmen einer Diplomarbeit zur Analyse altersabhängiger Transkriptionsprofile kupferregulierter Gene in *P. anserina* wurde eine suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) mit Transkripten durchgeführt, die aus juvenilen Kulturen von Wildstamm „s“ und Mutante *grisea* isoliert wurden (Tinazli, 2002). Die SSH diente der Identifizierung differenziell transkribierter Gene, die für Wildstamm „s“ bzw. Mutante *grisea* charakteristisch sind. Die Charakterisierung der identifizierten Gene kann Aufschluss über die in der langlebigen Mutante *grisea* vom Wildstamm abweichenden physiologischen Prozesse geben. Das Studium dieser Prozesse wiederum kann das Verständnis über Faktoren, die das Altern im Wildstamm beeinflussen, vertiefen. Das durch SSH identifizierte Gen *PaDnm1*, das differenziell in juvenilen Kulturen der Mutante *grisea* transkribiert wird, kodiert für ein Protein, dessen Homologe in anderen Modellorganismen wie z. B. *ScDnm1* (*S. cerevisiae* [Otsuga et al., 1998, Bleazard et al., 1999], *CeDrp-1* (*C. elegans* [Labrousse et al., 1999]) und *Drp1* (Säuger [Smirnova et al., 2001]) an der Mitochondrienteilung beteiligt sind. Da Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei degenerativen Prozessen wie Seneszenz und Apoptose spielen, erschien die Analyse eines für die Proliferation / Fragmentierung dieser Organellen verantwortlichen Gens bezüglich seiner Bedeutung für den Alterungsprozess in *P. anserina* sinnvoll.

Die genomische Kopie von *PaDnm1* wurde bereits kloniert und sequenziert (Tinazli, 2002). Zur Verifizierung der putativen Introns und Exons erfolgte die Klonierung und Sequenzierung der *PaDnm1*-cDNA (Abb. 9-11). Hierfür wurde zunächst eine PCR mit der BCS-induzierten cDNA-Bank von *P. anserina*-Wildstamm „s“ und den Oligonukleotiden *XhoI*-Dnm1 und Dyn10, die in der 5'- und 3'- untranslatierten Region von *PaDnm1* binden, durchgeführt (Abb. 9 A). Das 2,5 kbp-Amplifikat wurde aufgereinigt und mit *XhoI* und *EcoRI* restringiert. Die Ligation des Fragments erfolgte in den Klonierungsvektor pBSSK [*XhoI*, *EcoRI*] im molaren Verhältnis Vektor : Fragment 1:7. Das resultierende Konstrukt erhielt die Bezeichnung *pcPaDnm1* (Abb. 9 B). Nach Transformation des Ligats in *E. coli* XL1Blue erfolgte die Selektion acht putativer Kandidaten auf Ampicillin-haltigem Medium. Durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA mit *XhoI* wurde ein Klon als positiv identifiziert. Dieser diente als Grundlage für eine Rückgewinnung des Plasmids. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalysen verifiziert (Abb. 9 C). Anschließend erfolgte die doppelsträngige Sequenzierung der *PaDnm1*-cDNA (Abb. 10).

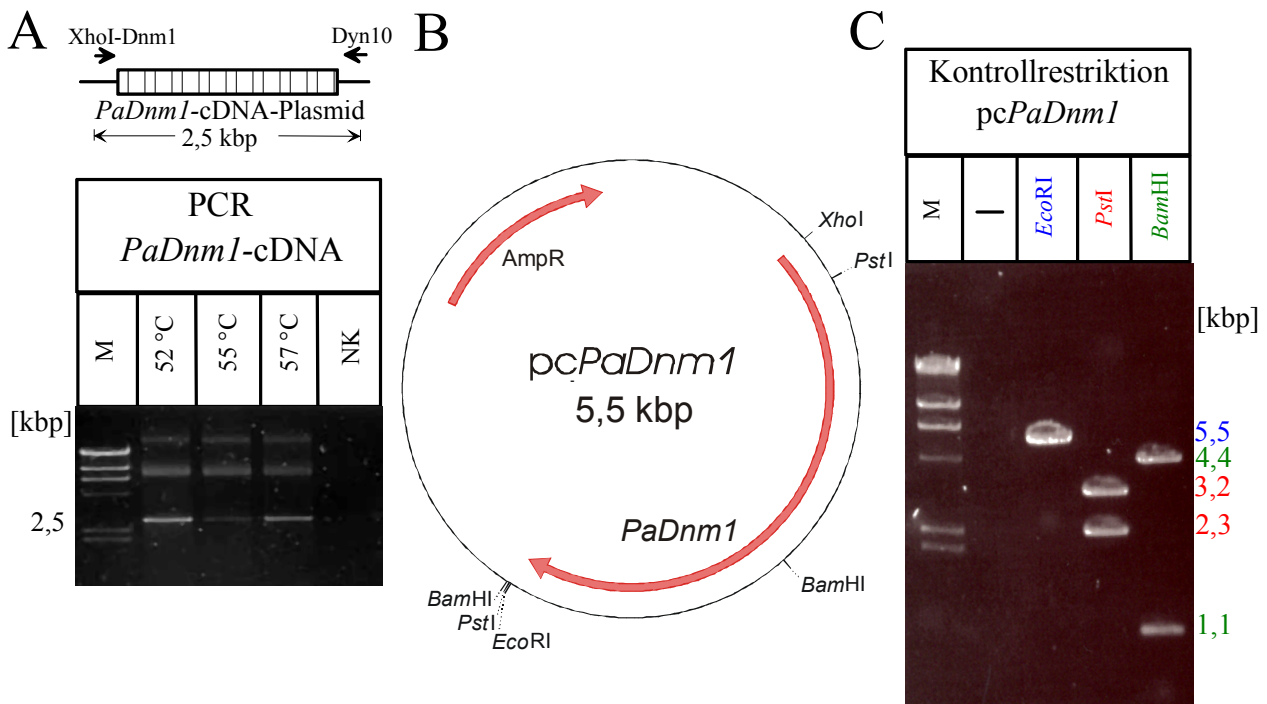


Abb. 9: Amplifikation und Klonierung der *PaDnm1*-cDNA. (A) *Oben:* Zur PCR-Amplifikation von *PaDnm1* aus der BCS-induzierten cDNA-Bank von *P. anserina* (Wildstamm „s“) wurden die Oligonukleotide XhoI-Dnm1 und Dyn10 verwendet. Das Amplifikat hat eine Länge von ~ 2,5 kbp. *Unten:* Elektrophoretische Auftrennung von Aliquots (5 µl) der PCR-Ansätze bei den Anlagerungstemperaturen 52, 55 und 57 °C in einem 1% Agarose-TAE-Gel. Die grösste Amplifikatmenge entsteht bei einer Oligonukleotid-Anlagerungstemperatur von 52 °C. PCR-Programm: (1x 2 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 52-57°C, 3 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). Als Matrize dienten 300 ng der cDNA-Bank. M = λ *HindIII* (250 ng), NK = PCR-Negativkontrolle (alle Komponenten ohne Matrize) (B) Schematische Darstellung des Plasmids pcPaDnm1. Zur Konstruktion wurde das *PaDnm1*-cDNA-Amplifikat sowie der Vektor pBSSK mit *XhoI* und *EcoRI* restringiert und anschließend durch Ligation verknüpft. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind in der Karte angegeben. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette (C) Kontrollrestriktionen von pcPaDnm1 (jeweils 500 ng) mit den Restriktionsendonukleasen (i) *EcoRI* (blau), (ii) *PstI* (rot) und (iii) *BamHI* (grün). Am rechten Bildrand sind die den Restriktionsendonukleasen entsprechenden Fragmentgrößen farblich gekennzeichnet angegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M = λ *HindIII* (250 ng)

Durch vergleichende Analyse der cDNA-Sequenz mit der bereits vorliegenden genomischen *PaDnm1*-Sequenz (Tinazli, 2002) konnten drei der vier putativen Introns verifiziert werden. Die Existenz eines durch vorhergehende *in silico*-Analysen vermuteten vierten Introns wurde hingegen nicht bestätigt. Weiterhin konnten vier Sequenzierungsfehler der ursprünglichen Sequenz korrigiert werden: (i) Position 613: „T“ statt „C“, (ii) Position 619: „T“ statt „C“, (iii) Nach Position 725: Insertion eines „C“. (iv) Position 2369: „A“ statt „G“. Die Angabe der Positionen bezieht sich auf die Nummerierung der korrigierten genomischen *PaDnm1*-Sequenz in Abb. 11.

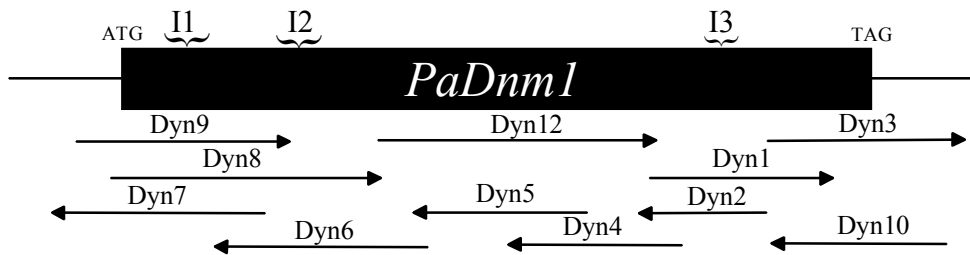


Abb. 10: *PaDnm1*-Genstruktur und -Sequenzierungsstrategie. *PaDnm1* hat im Genom eine Größe von 2585 bp. Der offene Leserahmen wird durch drei Introns unterbrochen (I1: Pos. 100-161, I2: Pos. 549-605, I3: Pos. 2205-2270, Angabe der Bereiche relativ zur Adenin-Base des Startcodons [Pos. 1]). Die doppelsträngige Sequenzierung der *PaDnm1*-cDNA erfolgte mit den Oligonukleotiden Dyn1-10 und Dyn12, wobei das Plasmid *pcPaDnm1* als Matrize diente. Die Pfeillänge gibt die jeweiligen Sequenzierungsbereiche der entsprechenden Oligonukleotide an.

Anhand der korrigierten *PaDnm1*-Nukleotidsequenz und der von ihr abgeleiteten Aminosäuresequenz wurde eine Untersuchung zur Identifizierung konservierter Domänen des PaDNM1-Proteins durchgeführt (Abb. 12). Hierzu wurde der „CD-Search“-Algorithmus eingesetzt (Marchler-Bauer und Bryant, 2004). Dynamine verwandte Proteine zeichnen sich durch konservierte Domänen aus. Hierzu gehören N-terminale Dyn-N-Domäne (GTPase-Aktivität, Homooligomerisierung), mittlere Domäne (Dyn-M, Homooligomerisierung) und GTPase-Effektordomäne (GED, Regulation der GTPase-Aktivität, Homooligomerisierung) (Übersicht bei: Praefcke und McMahon, 2004). Drei putative Regionen von PaDNM1 zeigen signifikante Identitäten zu diesen konservierten Domänen. (i) Dyn-N (As 6-235, $p = 2e-74$), (ii) Dyn-M (As 235-530, $p = 1e-99$) und (iii) GED (As 707-798, $p = 5e-24$).

Abb. 11 (nächste Seite): Korrigierte Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *PaDnm1*. Nicht-kodierende Nukleotidsequenz ist in kleinen Buchstaben dargestellt, Basen des offenen Leserahmens in Großschrift. Über den mittleren Basen der Codons ist die jeweilige Aminosäure im Einbuchstaben-Code angegeben. Start- und Stoppcodon sind fett markiert. Die Nummerierung auf der linken Seite bezieht sich auf die Nukleotidsequenz. In rot sind Korrekturen der *PaDnm1*-Sequenz aus der Diplomarbeit von A. Tinazli (2002) angegeben: (i) Position 613: „T“ statt „C“, (ii) Position 619: „T“ statt „C“, (iii) Nach Position 725 (rot und unterstrichen): Insertion eines „C“. (iv) Position 2369: „A“ statt „G“. Die Existenz eines in der Diplomarbeit angegebenen weiteren Introns konnte durch die *PaDnm1*-cDNA-Sequenz nicht bestätigt werden. Die genomische *PaDnm1*-Sequenz wurde bei der EMBL Datenbank für Nukleotidsequenzen (Akzession AJ972664) hinterlegt.

Legende siehe vorherige Seite

1 ctcgagctgctaaccggccaggcgaacaaacccccctctctgtctctccttgctcagctcttttttctcccaagagccgcga
81 ccaggcgtccgctgctcctttctttccctcatcaacgactgacgatttgccttcagccagcagtgcgagcatgtcgtc
161 ccactgtctcaaccatcacacacaccaccaccaccaccaccaccaccaccaccaccatcaccgcccgcacctcaactg
241 gatcctcgctcgtctttctcgtcgccttgctaccagtagcgcagctcccggctccttcaactggcccccacacgaccta
M A A L G D D
321 gccatctctcctagatcaccacttcaagtttctgtggccctgcacagaaaatcgctatc**ATGGCCGCTCTCGGCGACGA**
L L A T V N K L Q D L V F N T I G N D S L D L P Q I
401 CCTATTGGCGACTGTGAACAAGTTGCAGGACCTGGTCTTCAACACCATTGGAAATGACTCTCTCGATCTGCCCGAGATTg
V V V G S Q
481 tatgtcctggtccaggcctttctagaggtggacaatgtaactgtattctcctcgccgtagGTTGTCGTGGCTCACAAT
S A G K S V L E N I V G R D F L P R G S G I V T R R
561 CTGCGGGAAAATCCTCTGTGCTCGAAAACATCGTTGGCGGACTTCCCTTAGAGGTAGTGGCATTGTGACTCGCAGG
P L I L Q L I N V P S E D E A E D P L A A S Y R N P N
641 CCCCTGATTCTGCAGCTGATCAACGTCGCCAGCGAGGATGAGGCCGAGGACCCCTTGCCGCTAGCTACCGGAATCCCAA
Q A L R N E W A E F H H I P N R R F T D F G D L P K R
721 CCAAGCTCTCCGGAATGAGTGGGCGAGTTCACCATATTCCCAACCGGAGGTTCCACCGACTTTGGGGATGTGAAGCGGG
E I E N E T A R V A G S N K G I N R Q P I N L K I Y S
801 AAATTGAAAATGAGACGGCGAGAGTTGCAGGAAGCAACAAGGGCATCAACCGCCAGCCCATCAACCTGAAAATCTACTCT
P H V L N L T P L V D L P G L T K
881 CCTCACGTCCTGAACCTCAGCTCGTTGACTTGCCAGGACTGACAAAAGgtcggttaaccgtgctcatgacctgtctgtct
V P I G D Q P T D I E K Q T R N L I
961 gcggtgcttaactgctacactctagGTTCCCATCGGCGATCAACCTACCGACATTGAGAAGCAGACTCGAAACCTCATCT
S E Y I A K P N S I I L A V S P A N V D I V N S E A L
1041 CAGAGTACATTGCCAAGCCAAACAGCATTATTTGGCCGTGTCGCCGCAAACGTTGACATTGTCAACTCGGAGGCTCTA
K L A R H V D A L G R R T I G V L T K V D L M D H G T
1121 AAGCTCGCAAGGATGTGCGACGCCCTCGGGAGGAGAAGGATTGGCGTCTTACCAAGGTCGATTGTGATGGACCACGGC
N A L D I L S G R V Y P L K L G W I G V V N R S Q Q
1201 AAATGCGCTTGATATCTTCCGCCGTGTGTATCTCTGAAGCTGGGCTGGATCGGAGTCGTCATCGGTCGAGCAAG
D I Q G N K P M E E A L K S E M E F F R H H P A Y R N
1281 ACATCCAAGGTAACAAGCCCATGGAGGAGGCATTGAAGTCAGAGATGGAATTTTTCAGGCACCATCCCGCATATCGGAA
I A T R C G T Q F L A K T L N T T L M A H I R D R L P
1361 ATTGGACCCCGCTGCGGCACCCAATTTCTGGCCAAAACCTTAAACAGACCCCTCATGGCACACATCCGCGACAGGCTTCC
D I K A R L N T L M G Q T Q Q E L A S Y G D M H F S
1441 CGACATCAAGGCTCGCCTCAACACTTATGGGACAGACTCAACAGGAGCTCGCCAGTTATGGAGACATGCATTTCAGGG
G K E H R G S L I L T Q M T R F A T S F I S S I D G T
1521 GCAAAGAGCATCGAGGCTCGCTCATCTTGACCCAGATGACAGCCTTGCGACATCGTTTATATCTCCATTGATGGTACT
S T E I S T K E L C G G A R I Y Y I F N S V F G S S L
1601 TCTACCGAAATTCGACCAAGGAGCTCTGTGGTGGCGCCGTATCTATTACATATTTAACTCGGTGTTGGAAAGCTCACT
E S I D P T S N L S A H D I R T A I R N S T G P R P
1681 GGAATCGATCGACCCACGTCGAATCTTCTGCGCAGACATTCGGACGGCGATCCGCAACTCTACCGGCCCTCGGCCA
S L F V P F E M A F D L L V K P Q I K L L E S P S Q R C
1761 GCCGTGTTGTCCTGAAATGGCCTTTGACCTGCTTGTGAAGCCGAGATCAAGCTTCTCGAATCCCAAGTCAACGATCG
V E L V Y E E L I K I C H T C G S N E L S R F P R L Q
1841 GTTGAGCTCGTTTACGAGGAGCTCATCAAGATCTGCCACACATGTGGATCCAACAGGCTTTCGCCCTTCCCGAGGCTTCA
A K L I E V V S D L L R E R L G P A S T Y V E S L I
1921 AGCTAAACTGATTGAGTTGTGTGACCTTCTCGGGAGAGGCTCGGTCCGGCATCGACATATGTAGAATCCCTGATTT
S I Q R A Y I N T N H P N F L G A A A A M S H V V S N
2001 CCATTCAGCGCGGTACATCAACACGAACCCCAACTTCTTGGCGCCCGCGGCCATGAGTCACGTTGTTAGCAAC
K Q E R E R K R L I Q E R E R R E R R R L K E L G A
2081 AAGCAAGAGCGGGAGAGAAAGCCCTGATTCAGAAGAGCGGGAGAGAAGAGAACGGAGGGCGGCTAAAGAGGCTCGGGCC
N G A D T P A E E E E D K G T P E K E S I A I R K A
2161 CAACGGCCGGACACTCCCGCTGAGGAGGAGGAGCAAGGGGACGCCAGAAAAAAGAAATCCATCGGATACGAAAGCGCG
A A K N V R S P A R V R E S A S G G L A A A L N G G
2241 CTGCCAAGAACGTCGGTAGCCTTTCACCTGCGGTACCGAATCTGCATCAGGCGGTCTTGTGCTGCGCTTACCGAGGT
R S D S P A R L N G Q G L G N A K D S F L N Y F F G K
2321 CGCTCGGACTCTCTGCCCGGTTGAACGGACAAGGGTTAGGCAACGCGAAGATTCGTTCCCTTAACTACTTCTTGGTAA
D G A I V P G A P P P H S Q M G R H I N Q M S E P T
2401 GGATGGCGCCATTGTGCCGGGAGCACCCCTCTCACTCACAAATGGGCCCCATATCAACCAATGTCGGAGCCTACCT
F S Q S M R R Q E E K P M R S P M M P L R S D D N L D
2481 TTAGCCAGAGCATGAGGCGCAAGAAGAGAAGCCGATGCGATCTCCCATGATGCCGCTCAGAAGTGACGATAATCTCGAC
F T S K T T E T
2561 TTTACGTCGAAGACCACCGAAACTgtaagttgtctgaacctgttgcataagctatcctgtagctgtgacctgactca
A D G S S D P A M T D R E A M E A E L I R A L
2641 atgattgcagGCCGATGGTAGCAGCATCCAGCCATGACGGACCGCAAGCTATGGAAGCGGAGCTTATTCGGGCGCTAA
I S S Y F N I V R E S I A D Q V P K A I M H L L V N H
2721 TCAGCTCCTACTTTAACATTGTTCTGTGAGAGCATTGCGGACAGGTCGCCAAAGCCATCATGCATTGCTCGTTAACCAC
C K D V V Q N R L V S E L Y K E S M F E E L L Y E D D
2801 TGCAAGGACGTTGTTCAAGACCGCTGTTGAGCGAGCTGTACAAGGAGTCGATGTTCAAGAGCTCCTGTACGAGGATGA
A V K K E R E K C E K L L Q T Y R E A A K I I G E V
2881 TGCCGTCAGAAGGAGCGTGAGAAGTGCAGAGACTGCTCCAGACTACCGCGAGGCGCAAGATCATCGGCGAAGTGG
V *
2961 **TATAG**tcccagatatttcgggggtcaaggggaaaaggggtggctagttgggcaagtgatggatgtctatcacgatggaaa
3041 tgaacgggtttgggtcttctcagatcttctcatgaattctctagacgggtcttcttctcccccacgaaaaccagtagacacaa
3121 ggcaactaactcgggttcgggtggtcaagcgaaaattagtcaggttttggtagagttgagatggaaggggtgaaactag
3201 gccattttagctattgctctccgccatcatgtgtacatagggccgatcaaaactactacttctcaacgggtgttaaac
3281 atggcagcctcactcacatgtgacgtgcatgcccagcaaaaagcttatctaataatgagtgacgcacccagtcctt
3361 gttggaactttggaccagcggttcacpccacttccactcggcagcttccatccat

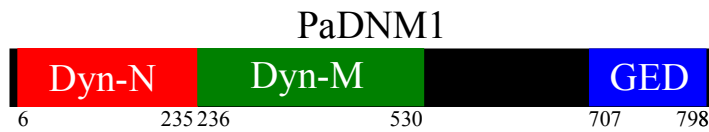


Abb. 12: Putative PaDNM1-Domänenstruktur. Konservierte Domänen von PaDNM1 wurden mit dem „CD-Search“-Algorithmus (Marchler-Bauer und Bryant, 2004) ermittelt. Dyn-N: N-Terminale Dynamindomäne ($p=2e-74$), Dyn-M: Mittlere Dynamindomäne ($p=1e-99$), GED: GTPase-Effektordomäne ($p=5e-24$). Die Zahlen unter dem Schema geben jeweils die Position der ersten und letzten Aminosäure der entsprechenden Domäne an.

Zur Bestimmung der Homologie zwischen PaDNM1 und weiterer Dynamin-verwandter Proteine aus anderen Organismen wurde der BLOSUM 62-Algorithmus des Programmes „Clone Manager Suite 6“ (Scientific and Educational Software) angewendet (Abb. 13). Als Vergleichssequenzen dienten ScDNM1 (*Saccharomyces cerevisiae*, UniProt-Akzession P54861, Gammie et al., 1995), HsDRP1 (*Homo sapiens*, UniProt-Akzession O00429, Shin et al., 1997), CeDRP-1 (*Caenorhabditis elegans*, UniProt-Akzession Q9U4L0, Labrousse et al., 1999) und AtDLP1 (*Arabidopsis thaliana*, UniProt-Akzession Q8LF21, Kang et al., 2001). Die höchste Identität besteht zu ScDNM1 (54 %), gefolgt von HsDRP1 (44 %), CeDRP-1 (43 %) und AtDLP1 (29 %).

Abb. 13 (nächste Seite): Homologievergleich von PaDNM1 mit Aminosäuresequenzen Dynamin-verwandter Proteine diverser Organismen. Zu PaDNM1 identische (homologe) Aminosäuren sind schwarz (grün) gedruckt. Nicht-homologe Aminosäuren sind in Rotschrift angegeben. Am linken Rand befindet sich die Nummerierung der Aminosäuren. Am Ende der Sequenzen ist deren Gesamtlänge und die prozentuale Identität zu PaDNM1 angegeben. Als Vergleichssequenzen dienten ScDNM1 (*Saccharomyces cerevisiae*, UniProt-Akzession P54861, Gammie et al., 1995), HsDRP1 (*Homo sapiens*, UniProt-Akzession O00429, Shin et al., 1997), CeDRP-1 (*Caenorhabditis elegans*, UniProt-Akzession Q9U4L0, Labrousse et al., 1999) und AtDLP1 (*Arabidopsis thaliana*, UniProt-Akzession Q8LF21, Kang et al., 2001). Die Homologieanalyse wurde mit dem BLOSUM 62-Algorithmus des Programmes „Clone Manager Suite 6“ (Scientific and Educational Software) durchgeführt.

Legende siehe vorherige Seite

```

PaDnm1 1 MAALGDDLLATVNKLQDL--VFNTIGN--DSLDEL---PQIVVGSQSAGKSSVLENI VGRDFLPRGSGIVTRRPLILQL
ScDnm1 1 MASL-EDLIPTVNKLQDV--MYDS-GI--DTLDEL---PILAVVGSQSAGKSSILETLVGRDFLPRGTGIVTRRPLVLQL
HsDRP1 1 MEA---LIPVINKLQD--VFNTVGA--DIIQL---PQIVVGTQSSGKSSVLESVGRDL LPRGTGIVTRRPLILQL
CeDRP-1 1 ---MENLIPVNKLQD--VFATLGRKEDQIQ---PQIVVGSQSAGKSSVLENI VGRDFLPRGTGIVTRRPLILQL
AtDLp1 1 MATM-KSLIGL INKIQRACTV LGDHGG--EGMSLWEALPTVA VVGQSSGKSSVLESV VGRDFLPRGSGIVTRRPLVLQL

73 INVP-----SEDEAEDP-----LAASYRNPQALRNEWAEFHHPNRRFTDFGDVKREIENETARVAGS
71 NNI SPNSPLIEEDD NSVNP HDEVTKISGF EAGTKPLEYR GKERNHAD EWEFLHPGKR FYDDI KREIENETAR TAGK
68 VHV T-----QEDKRK-----TTGEENGVEAE EWEKFLHTKNKLYTDFDEIRQEIENETERISGN
70 NHVA-----LDDESK-----RRRSNGTLLTDDWAMFEHTGSKVFTDFDAVRKEIEDETDRTVGV
78 -----HKTEDG-----TTEYAEFLHAPKRFADF AAVRKEIEDETDRTITGK

132 NKGINRQPINLKIYSPHVLNLTLDVLPGLTKVPIGQPTDIEKQTRNLI SEYI AKPN SII LAVSPANVDIVNSEALKLAR
151 DKGI SKIPINLKVFSPHVLNLTLDVLPGITKVP IEGQPPDIEKQIKNLILDIATPNCLILAVSPANVDLVNSEALKLAR
122 NKGVSPEPIHLKIFSPNVNLTLDVLPGMTKVPVGDQPKDIELQIRELILRFISNPN SII LAVTAANTDMATSEALKISR
124 NKGISLLPISLKIYSHRVVSLSLVDLPGITKIPVGDQPVNIEEQIREMILLYISNPSII LAVTPANQDFATSEPIKLAR
119 SKQISNIPIQLSISYSPNVNLTLDVLPGLTKVAVDQGPESVQDIENMVRSYVEKPN CII LAISPANQDIATSDAIKLAR

212 HVDALGRRTIGVLTQVDLMDHGTNALDILSGRVYPLKLGWIGVVNRSQQDIQGNKPMEEALKSEMEFFRHHPAYRNIAATR
231 EVD PQKRTIGVITKLDLMDSGTNALDILSGKMYPLKLG FVGVNRSQQDIQLNKTVEESLDKEEDYFRKHPVYRTISTK
202 EVD PDGRRTLAVITKLDLMDAGTDAMDVLMGRVIVPKLGIIGVVNRSQLDINNKKS VTD SIRD EYAF LQK--KYPSLANR
204 EVDAGGQRTLAVLTKLDLMDQGTAMDVLMGKVI PVKLG IIGVVNRSQQNI LDNKLIVDAVKDEQSF MQK--KYPTLASR
199 EVDPTGERTFGVATKLDIMDKGTDCLDVLEGRS YRLQHPWVGIVNRSQADINKRVDMAARKEQEFETSPEYGH LASR

292 CGTQFLAKTLNTTLMAHIRDRLPDIKARLNTLMGQTQQELASYGDMHFSGKEHRGSLIL TQMTRFATSFISSIDGTSTEI
311 CGTRYLAKLNLQTLTSHIRDKLPDIKTKLNTLISQTEQELARYGGV GATTNESRASLVLQLMNKFSTNFISSIDGTSSDI
280 NGTKYLARTLNRLMHHIRDCLPELKTIRINVLAAQYQSLNLSYGE---PVDDKSA TLLQLITKFAT EYCNTEGTAKYI
282 NGTPYLAKRLNMLLMHIRNCLPALKARV SIMNAQCQSDLVAFGE---PVEDKNR TLLQIITRFATAYTSTIEGTARNI
279 MGSEYLAKLLSQHLETVIRQKIPSI VALINKS IDEINAELDRIGRPIAVDSGAQLYITILELCRAFDRVFKELDGGRP--

372 STKELCGGARIYYIFNSVFGSSLESIDPTS NLSAHDIRTAIRNSTGPRP SIFVPEMAFDLLVKPQIKLLES PSQRCVELV
391 NTKELCGGARIYYIYNVFGNSLKSIDPTS NLSVLDVRTAIRNSTGPRP TLFVPELAFD LLVKPQIKLLLEPSQRCVELV
356 ETSSEL CGGARI CYIFHETFGRTLESVDPLGGLNTIDILTAIRNATGPRPALFVPEV SFELLVKRQIKRLEPSLRCVELV
358 ETTTEL CGGARI CYIFHDTFGRSLESV NPLENLTQLDILTAIRNATGPRPALFVPEV SFELLVKRQIQRLEPSLRCVELV
357 -----GGDR IYGVFDHQLP AALKKLPFDRHLSTKNVQKV VSEADGYQPHL IAP EQYRRLIDGSI SYFKGPAEATVDAV

452 Y---EELIK--ICHTCG---S---NELSRFPRLQAKLIEVVSDDLRELRGPASTYVESLISIQRAYINTNHPN FLGAAAA
471 Y---EELMK--ICHKCG---S---AELARYPKLKSMLIEVISELLRERLQPTRSYVESLIDHRA YINTNHPN FLSAT EA
436 H---EEMQR--IIQHCS---NYSTQELLRFPKLHDAIVEVVTCLLRKRLPVNEMVHNLVAI ELAYINTKHPDFADACGL
438 H---EEMQR--MVQHCGFTTQ---QEMIRFPRLYDKINEVVS GVLKERLKP TNELVENLVAI ELAYINTKHP ETEA---
431 HFV LKELVRKSISET-----EELKRFP T L ASDIAAANAELERF RDES RKT VLR LVDMESSYITV-----

521 MSHVVS NKQERERKRLIQEERERRRRRLKELGANGADTPAE EEDKGTPEKESIAIRKAAAKNVRSLSPAVRESASGGL
540 MDDIMKTRRKR NQE--LLKSKLSQQENGTN--GINGTSSISN-----IDQDSAKN-----SDYDDDG I
508 MN---NNIEEQRRNRLARELPSAVSRDKSSKVP S--ALAPASQEPSA-----ASAEADGLIQDSRRETKNVASGG-
507 -----NLVTL LKELLLDDR HGRSRNRHASTGERAQLQPV-----PGVN-----
491 -----E FFRK LHL E-----PEKEKPNPRNAPAPNA-----

601 AAALNGGRSDS--PARLNGQGL--GNAKDSFLNYFFGKDGAIVPGAPPPHSQMGRHINQMSEPTFSQSMRRQEEKPMRS
596 -----DA---ESK-----QTKDKFLNYFFGKD-----KKGQPVFDASDKKRS-----
575 -----GGVGDQVEPTTGNWRGMLKTSKAEELLAEEKSKPI PIMPASP-----QKGHAVNLLDVP-----QEK-----
546 GVDLNAV LQQQ--QQSQNQ---RASNGFLG-LFGNA AASSKTSP-----KHAVNLLDVP-----QEK-----
516 -----DPYSDNHFRKIGSNV-----

676 PMMPLRSDDNL-DFTSKTTETADGS-----SDPAMTDREAMEAELIRALISSYFNIVRESIADQVPKAIMHLLVNH
630 ---TAGDGNIEDF--RNLQISDFS LGDIDDLLEN AEPPLTRELECELIKRLIVSYFDI IREMIEDQVPKAVMCLLVNY
630 ---VPVAR-----KLSAREQRDCEVIERLISYF LIVRKNIQDSVPKAVM HFLVNH
588 -----QSA-NFLPEVPETQLGR-----K---LTSREQRDVAI IERLIRNYF IIVRKNIQDSVPKAIMALLVNF
531 -----SAYINMVCDTLRNSLPKAVVYQVRE-----

746 CKDVVQNRLVSELYKESMFE--ELLYEDDAVKKEREKCEKLLQTYREAAKIGEVV-----799 AS
704 CKDSVQNRLVTKLYKETLFE--ELLYVEDQTLAQDREL CVKSLGVYKAAATLISN I L-----757 AS 54 %
678 VKDTLQSELVGOLYKSSLLD--DLLTESDMAQRKKAADMLKALQ GASQI IAEI RETHLW 736 AS 44 %
647 VRDNLQSELVRQLYKPD EMD--DLLAETEDMAQRRTDLETMKALQQASV I I SEVRETQVW 705 AS 43 %
557 AKRSL LNFFYAQVGRKEKEKLGAMLDEDPQLMERRGTLAKRLELYKQARDDIDAVAWK---614 AS 29 %

```

Initiale Untersuchungen zur Transkription von *PaDnm1* im Wildstamm „s“ und in der Mutante *grisea* wurden in der Diplomarbeit von A. Tinazli (2002) vorgestellt. Durch Northern-blot- und RT-PCR-Analysen konnte kein eindeutiges Bild der *PaDnm1*-Transkription gewonnen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Transkriptanalyse auf Northern-Ebene mit einem anderen Sondenfragment ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiertes 1,7 kbp-*NcoI*/*EcoRI*-Fragment des Plasmids *pPaDnm1* [Tinazli, 2002]) in Wildstamm „s“ und Mutante *grisea* sowohl im juvenilen als auch im seneszenten Stadium durchgeführt (Abb. 14).

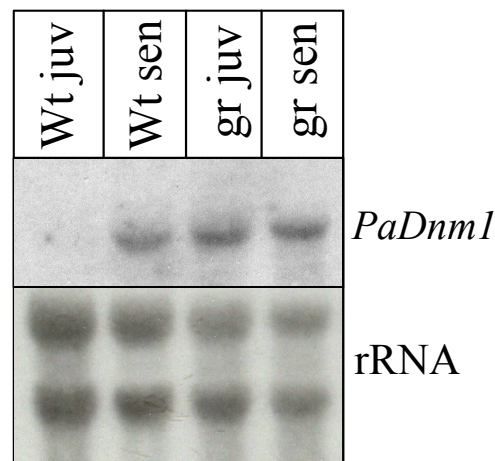


Abb. 14: *PaDnm1*-Transkriptionsanalyse in Wildstamm „s“ (juvenil [Wt juv], seneszent [Wt sen]) und Mutante grisea (juvenil [gr juv], seneszent [gr sen]). Jeweils 10 µg Gesamt-RNA der entsprechenden Ansätze wurden in einem denaturierenden 1,5 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion von *PaDnm1*-Transkript wurde das $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierte 1,7 kbp-*EcoRI/NcoI*-Fragment des Plasmids p*PaDnm1* (Tinazli, 2002) eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einer Sonde ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiertes 5,7 kbp *HindIII*-Fragment des Plasmids pMy60 [Verbeet et al., 1983]) gegen die rRNA von *Saccharomyces carlsbergensis* rehybridisiert, welche durch Kreuzhybridisierung auch *P. anserina*-rDNA nachweisen kann. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 37 °C durchgeführt. Juveniler Wildstamm „s“ (5 Tage alt) zeigt im Vergleich zu dem seneszenten Isolat (26 Tage alt) kein *PaDnm1*-Transkript. Während die *PaDnm1*-Transkription im Wildstamm demnach altersabhängig induziert wird, ist sie in der Mutante grisea konstitutiv: Sowohl das juvenile (5 Tage alt) als auch das seneszente (56 Tage alt) Isolat enthalten eine vergleichbare Menge *PaDnm1*-mRNA.

Im Wildstamm „s“ ist *PaDnm1*-Transkript nur im seneszenten, nicht aber im juvenilen Isolat nachweisbar. Dieser Befund deutet auf eine altersabhängige Induktion dieses an der mitochondrialen Teilung beteiligten Gens hin und korreliert mit der Fragmentierung der Mitochondrien im seneszenten Stadium (Abb. 5 C). Dagegen ist die Transkription von *PaDnm1* in der Mutante grisea konstitutiv, d. h. sowohl das juvenile als auch das seneszente Isolat zeigen eine vergleichbare Menge *PaDnm1*-mRNA. Trotz der konstitutiven *PaDnm1*-Transkription enthält grisea im juvenilen und mittelalten Stadium filamentöse Mitochondrien (Abb. 5 D, E). In der pleiotropen Mutante grisea könnten daher weitere, bisher unbekannte Faktoren beeinflusst sein, die einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie haben. Alternativ wäre eine posttranskriptionelle Regulation der *PaDnm1*-Expression denkbar, sodass die Transkriptmenge nicht zwangsläufig mit der PaDNM1-Proteinmenge korreliert (siehe Diskussion).

5.3.2 Überexpression von *PaDnm1* im Wildstamm „s“

Um die Rolle von *PaDnm1* in der mitochondrialen Teilung und im Alterungsprozess des Wildstammes näher zu untersuchen, wurde das Gen konstitutiv überexprimiert.

Die verstärkte Expression *PaDnm1*-homologer Gene in den jeweiligen Modellorganismen hat verschiedene Effekte zur Folge: In *S. cerevisiae* führt die Überexpression von *ScDnm1* zu partieller mitochondrialer Fragmentierung (Fukushima et al., 2001), während im Falle von *AtDlp1* in *A. thaliana* (Arimura und Tsutsumi, 2002) und *HsDrp1* (Smirnova et al., 1998) in menschlicher Zellkultur keinen Effekt auf die mitochondriale Morphologie zu beobachten ist. Überexpression von *CeDrp-1* in *C. elegans* hat wiederum eine starke Fragmentierung der Mitochondrien zur Folge. Aufgrund der nahen Verwandtschaft von *P. anserina* zu *S. cerevisiae* wurde davon ausgegangen, dass Überexpression von *PaDnm1* zu einer partiellen mitochondrialen Fragmentierung führt und das Gleichgewicht der mitochondrialen Dynamik zur Teilung hin verlagert wird. Die Analyse positiver Transformanden kann dann Aufschluss geben, ob die veränderte mitochondriale Morphologie einen Einfluss auf altersrelevante Parameter im *P. anserina*-Wildstamm „s“ hat.

5.3.2.1 Konstruktion eines Vektors zur *PaDnm1*-Überexpression

Für die Konstruktion eines Plasmids zur konstitutiven *PaDnm1*-Expression wurde zunächst ein 1,9 kbp *PaGpd*-Promotorfragment (*PPaGpd*) mit den Oligonukleotiden PGpd-for und SmaI-PromGpd2 und dem Plasmid pRP81-1 (Ridder und Osiewacz, 1992) als Matrize amplifiziert (Abb. 15 A). Nach der Aufreinigung des Amplifikats erfolgte die Herstellung überhängender Enden durch Restriktion mit *MunI* und *SmaI*. Die Ligation des Promotors erfolgte in pBSSK [*EcoRI*, *SmaI*] (molares Verhältnis Vektor : Insertionsfragment 1:5) (Abb. 15 B). Hierbei ist zu beachten, dass *MunI* und *EcoRI* kompatible Schnittstellen erzeugen. Nach Transformation des Ligats in kompetente *E. coli* XL1Blue erfolgte die Selektion von sieben weißen Ampicillin-resistenten Kolonien. Durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA mit *EcoRI* wurde ein Klon als positiv identifiziert. Dieser diente als Grundlage für eine Rückgewinnung des Plasmids. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalysen verifiziert (Abb. 15 C).

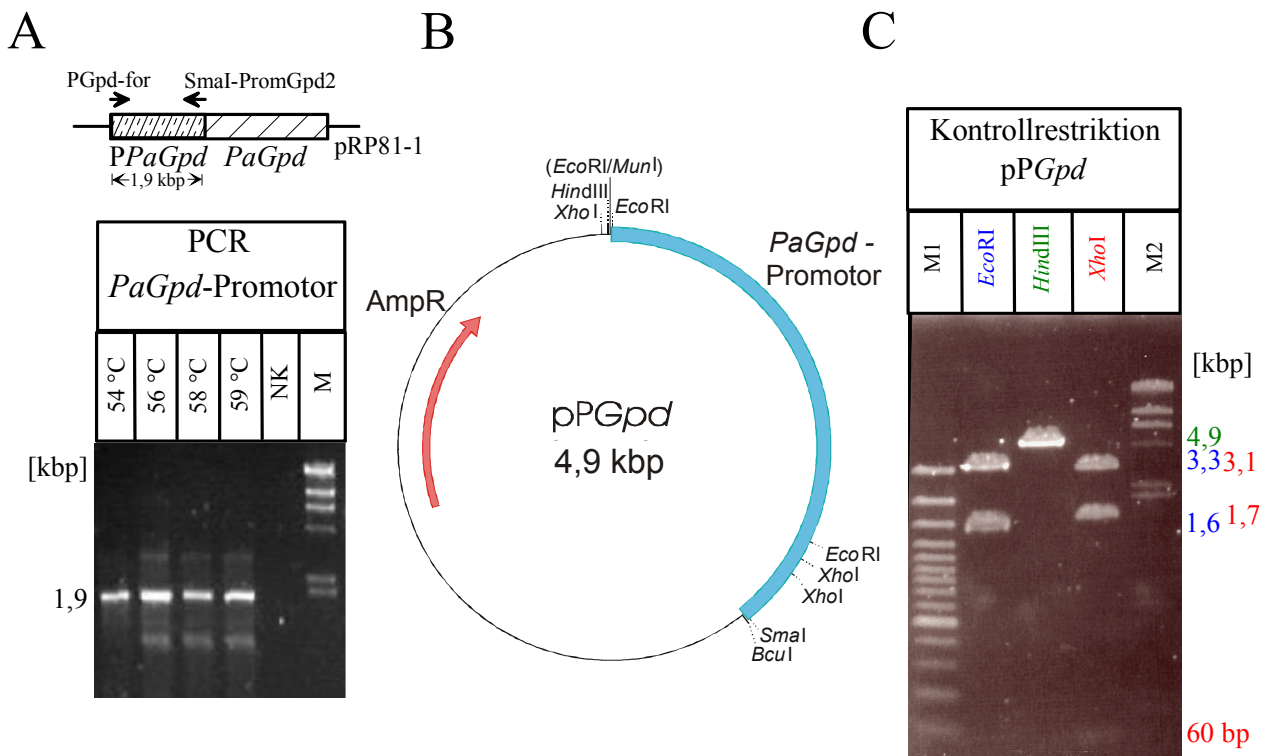


Abb. 15: Konstruktion eines *PaDnm1*-Überexpressionsvektors (I): Amplifikation und Klonierung des *PaGpd*-Promotors (*PPaGpd*). (A) *Oben:* Zur PCR-Amplifikation von *PPaGpd* wurden die Oligonukleotide PGpd-for und SmaI-PromGpd2 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid pRP81-1 (Ridder und Osiewacz, 1992). Das Amplifikat hat eine Länge von ~1,9 kbp. *Unten:* Elektrophoretische Auftrennung von Aliquots (5 μ l) der PCR-Ansätze bei den Anlagerungstemperaturen 54, 56, 58 und 59 $^{\circ}$ C in einem 1% Agarose-TAE-Gel. PCR-Programm: (1x 2 min 95 $^{\circ}$ C); (35x 1 min 95 $^{\circ}$ C, 1 min 54-59 $^{\circ}$ C, 2 min 72 $^{\circ}$ C); (1x 6 min 72 $^{\circ}$ C). M = λ HindIII (250 ng), NK = PCR-Negativkontrolle (alle Komponenten ohne Matrize) (B) Schematische Darstellung des Plasmids pPGpd. Das *PPaGpd*-Amplifikat wurde mit *MunI* und *SmaI* und der Vektor pBSSK mit *EcoRI* und *SmaI* restringiert und anschließend durch Ligation miteinander verknüpft. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind in der Karte angegeben. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette (C) Kontrollrestriktionen von pPGpd (jeweils 500 ng) mit den Restriktionsendonukleasen (i) *EcoRI* (blau), (ii) *HindIII* (grün) und (iii) *XhoI* (rot). Am rechten Bildrand sind die den Restriktionsendonukleasen entsprechenden Fragmentgrößen farblich gekennzeichnet angegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M1 = 100 bp-Leiter, M2 = λ HindIII (250 ng)

Zur Fertigstellung des *PaDnm1*-Überexpressionsvektors wurde zunächst mit den Oligonukleotiden SmaI-Dnm1 und BclI-Dnm1 und dem Plasmid p*PaDnm1* (Tinazli, 2002) als Matrize ein genomisches 3,1 kbp-Fragment, welches das komplette *PaDnm1*-Gen und 0,45 kbp des Terminatorbereichs umfasst, amplifiziert (Abb. 16 A). Das Amplifikat wurde aufgereinigt und mit *SmaI* und *BclI* restringiert. Die Ligation des Fragments erfolgte in den Vektor pPGpd [*SmaI*, *BclI*] im molaren Verhältnis Vektor : Fragment 1:5, das resultierende Konstrukt erhielt die Bezeichnung pPGpd-*PaDnm1* (Abb. 16 B). Nach Transformation des Ligats in kompetente *E. coli* XL1Blue-Zellen erfolgte die Selektion von achtzehn putativen Kandidaten auf Ampicillin-haltigem Medium. Durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA mit *XhoI* wurden fünf Klone als positiv identifiziert. Ein Klon diente als

Grundlage für eine Rückgewinnung des Plasmids. Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalysen verifiziert (Abb. 16 C).

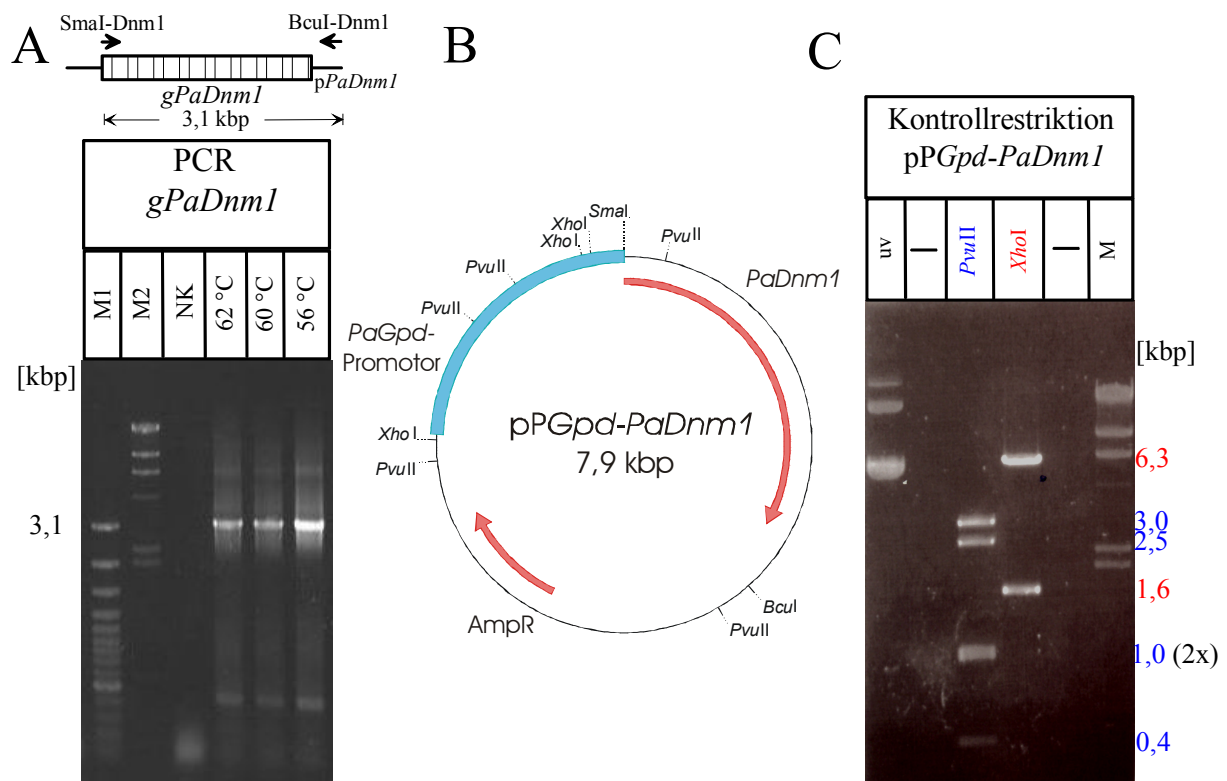


Abb. 16: Konstruktion eines *PaDnm1*-Überexpressionsvektors (II): Amplifikation und Klonierung des *PaDnm1*-Gens in pPGpd. (A) Oben: Zur PCR-Amplifikation der genomischen *PaDnm1*-Sequenz wurden die Oligonukleotide SmaI-Dnm1 und BcuI-Dnm1 verwendet. Als Matrize diente das Plasmid pPaDnm1 (Tinazli, 2002). Das Amplifikat hat eine Länge von ~ 3,1 kbp. Unten: Elektrophoretische Auftrennung von Aliquots (5 µl) der PCR-Ansätze bei den Anlagerungstemperaturen 56, 60 und 62 °C in einem 1% Agarose-TAE-Gel. PCR-Programm: (1x 2 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 56-62 °C, 3 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). M1 = 100 bp-Leiter, M2 = λ *HindIII* (250 ng), NK = PCR-Negativkontrolle (alle Komponenten ohne Matrize) (B) Schematische Darstellung des Plasmids pPGpd-*PaDnm1*. Das *PaDnm1*-Amplifikat und der Vektor pPGpd wurden mit *BcuI* und *SmaI* restringiert und anschließend durch Ligation miteinander verknüpft. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind in der Karte angegeben. AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette (C) Kontrollrestriktionen von pPGpd-*PaDnm1* (jeweils 500 ng) mit den Restriktionsendonukleasen (i) *PvuII* (blau) und *XhoI* (rot). Am rechten Bildrand sind die den Restriktionsendonukleasen entsprechenden Fragmentgrößen farblich gekennzeichnet angegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M = λ *HindIII* (250 ng), uv = pPGpd-*PaDnm1* (250 ng, unverdaut)

5.3.2.2 Transformation von Wildstamm „s“-Protoplasten mit pPGpd-*PaDnm1*

Der Überexpressionsvektor pPGpd-*PaDnm1* wurde in das Genom von Wildstamm „s“ (Isolat F18261 mat-) eintransformiert. Zunächst wurden 20 g (Feuchtgewicht) zur Protoplastierung mit Glucanex eingesetzt. Zu ca. 10^8 Protoplasten wurden jeweils 10 µg pPGpd-*PaDnm1* und pAN7-1 (Punt et al., 1987) gegeben. Das Plasmid pAN7-1 vermittelt Resistenz gegen Hygromycin B im Medium der Transformanden und ist notwendig, da pPGpd-*PaDnm1* keinen Selektionsmarker für die Pilztransformation besitzt. Die Cotransformation hat die Integration beider Plasmide zum Ziel. Elf Transformanden wurden auf BMM-Platten zur weiteren Analyse angeimpft.

5.3.2.3 Verifizierung von *PaDnm1*-überexprimierenden Transformanden

Die Aufnahme von *pPGpd-PaDnm1* in das Genom der Transformanden wurde durch eine Southern-blot-Analyse überprüft. Hierfür wurde die Gesamt-DNA isoliert und mit *EcoRV*, das einmal in *pPGpd-PaDnm1* schneidet und somit zum Nachweis von Tandemintegrationen geeignet ist, restringiert. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Analyse mit einer DIG-markierten Sonde gegen *PaDnm1* (1,7 kbp *NcoI/EcoRI*-Fragment von *pPaDnm1* [Tinazli, 2002]). Sechs Transformanden hatten *pPGpd-PaDnm1* integriert, von diesen wurden zwei für weitere Analysen ausgewählt (Abb. 17). Kriterien hierfür waren (i) eine Mindestgröße der transgenen *PaDnm1*-Fragmente von ~ 6 kbp und (ii) nicht mehr als vier *pPGpd-PaDnm1*-Integrationen, da es sonst durch Rekombinationen zwischen den Sequenzen zu Umstrukturierungen im Genom der Transformanden kommen kann. Die beiden als positiv verifizierten Primärtransformanden *PaDnm1_Ex1* (mit höherer Kopienzahl des Überexpressionsvektors) und *PaDnm1_Ex2* (mit einer Integration) wurden durch Kreuzung mit dem Wildstamm und Selektion der Transformandennachkommen (durch Verifizierung mittels Southern-blot-Analyse) regeneriert, um potenzielle Nebeneffekte, wie sie in den Primärtransformanden durch die Transformationsprozedur auftreten können, auszuschließen. Auf diese Weise wurden die so genannte Sekundärtransformanden erhalten.

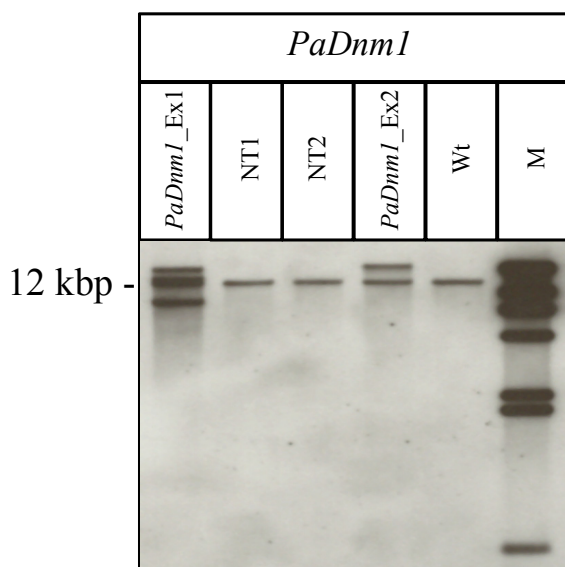


Abb. 17: Southern-blot-Analyse zum Nachweis der Integration des Plasmids *pPGpd-PaDnm1* in das Genom der putativen Transformanden *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*. Jeweils 300 ng genomische DNA des Wildstammes (Wt) und der Transformanden wurde mit *EcoRV* restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die *PaDnm1*-Hybridisierung über Nacht mit dem DIG-markierten 1,7 kbp-*EcoRI/NcoI*-Fragment des Plasmids *pPaDnm1* (Tinazli, 2002) in „High-SDS“-Puffer bei 65°C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. Zusätzlich zu dem *PaDnm1*-Fragment bei 12 kbp (Endogen) zeigen die Transformanden weitere Signale. *PaDnm1_Ex1* verfügt über maximal drei Kopien von *pPGpd-PaDnm1*, während *PaDnm1_Ex2* eine Kopie des Konstrukts aufgenommen hat. M = λ *Hind* III (DIG-markiert) (40 ng), NT1, NT2 = Hygromycin B-resistente Transformanden ohne *pPGpd-PaDnm1*-Integration

Juvenile Sekundärtransformanden von *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* wurden mit einer *PaDnm1*-Transkriptionsanalyse auf Northern-Ebene untersucht (Abb. 18). Hierfür wurde zunächst die Gesamt-RNA aus den Transformanden isoliert. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden Gel erfolgte der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran. Im Rahmen der Hybridisierungsanalyse wurde ein $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiertes 1,7 kbp-*NcoI* / *EcoRI*-Fragment des Plasmids *pPaDnm1* (Tinazli, 2002) eingesetzt. Sowohl *PaDnm1_Ex1* F33500 als auch *PaDnm1_Ex2* F33100 zeigen im Vergleich zum juvenilen Wildstamm „s“ einen hohen Gehalt an *PaDnm1*-mRNA (Abb. 18). U. a. aufgrund der höheren Kopienzahl des Überexpressionsvektors im Genom (Abb. 17) zeigt *PaDnm1_Ex1* eine stärkere *PaDnm1*-Transkription als *PaDnm1_Ex2*. Um zu prüfen, ob die konstitutive *PaDnm1*-Transkription in *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* einen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie hat, wurden cytologische Färbungen mit „Mitotracker Red“ durchgeführt (Abb. 19).

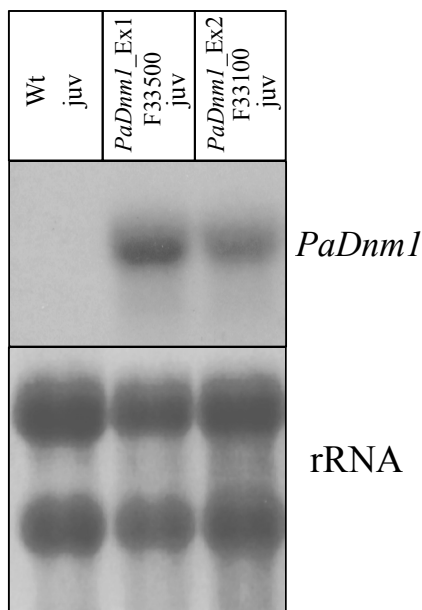


Abb. 18: *PaDnm1*-Transkriptionsanalyse mit Sekundärtransformanden von *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*. Jeweils 10 μg Gesamt-RNA der entsprechenden Ansätze wurden in einem denaturierenden 1,5 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion von *PaDnm1*-Transkript wurde das $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierte 1,7 kbp-*EcoRI/NcoI*-Fragment des Plasmids *pPaDnm1* (Tinazli, 2002) eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einer Sonde ($\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiertes 5,7 kbp *HindIII*-Fragment des Plasmids *pMy60* [Verbeet et al., 1983]) gegen die rRNA von *Saccharomyces carlsbergensis* rehybridisiert, welche durch Kreuzhybridisierung auch *P. anserina*-rDNA nachweisen kann. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 37 °C durchgeführt. Die juvenilen (juv) Isolate (5 Tage alt) der Transformanden *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* enthalten im Vergleich zum juvenilen Wildstamm (Wt) (fünf Tage alt) große Mengen *PaDnm1*-Transkript.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Präparate zeigt, dass in den mittelalten (15 Tage) Sekundärtransformanden *PaDnm1_Ex1* F33500 und *PaDnm1_Ex2* F33100 ein wesentlich größerer Anteil fragmentierter Mitochondrien enthalten ist als in dem mittelalten Wildstamm „s“-Isolat. Dieser Befund ist ein wichtiger Hinweis, dass *PaDnm1* wie das entsprechende Homolog in Hefe, *ScDnm1*, an der Teilung der Mitochondrien beteiligt ist.

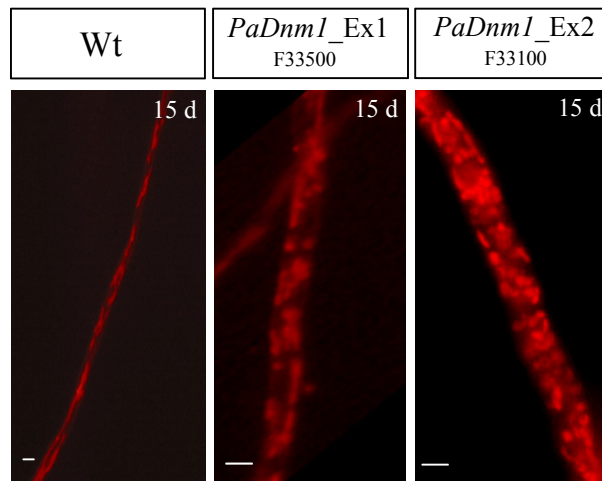


Abb. 19: Mitochondrienmorphologie in mittelalten (ma) Hyphen von *PaDnm1_*Ex1- und *PaDnm1_*Ex2 Sekundärtransformanden im Vergleich zum Wildstamm „s“ (Wt). Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1% Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchtekammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien wurde eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} 515-560 nm, $\lambda_{\text{em}} > 590$ nm) analysiert. Der mittelalte Wildstamm (15 Tage) enthält überwiegend filamentöse Mitochondrien. Im Gegensatz dazu enthalten mittelalte Isolate der Transformanden *PaDnm1_*Ex1 und *PaDnm1_*Ex2 stark fragmentierte Mitochondrien, was auf eine erhöhte mitochondriale Teilungsrate durch Überexpression von *PaDnm1* zurückzuführen ist. Rechts oben in den Teilabbildungen ist jeweils das Alter der Kultur angegeben. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 µm.

5.3.2.4 Vergleich der Transformanden *PaDnm1_*Ex1 und *PaDnm1_*Ex2 mit dem Wildstamm „s“: Myzelmorphologie, Wachstumsrate und Fertilität

Durch einen phänotypischen Vergleich von *PaDnm1_*Ex1- und *PaDnm1_*Ex2-Sekundärtransformanden mit Wildstamm „s“-Isolaten sollte untersucht werden, ob die erhöhte Mitochondrienfragmentierung einen Einfluss auf Parameter wie Myzelmorphologie, Wachstumsrate, Fertilität und Lebensspanne ausübt. Zur Bestimmung der Pigmentierung und Bildung von Luftmyzel wurde eine BMM-Platte mit den entsprechenden Myzelstücken beimpft und für vier Tage bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert (Abb. 20 A). Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Isolaten. Das gleiche gilt für die Wachstumsrate auf BMM und die männliche (Zahl der Spermastien) und weibliche (Zahl der gebildeten Perithezien nach Befruchtung mit Wildstammsspermastien) Fertilität (Abb. 20 B).

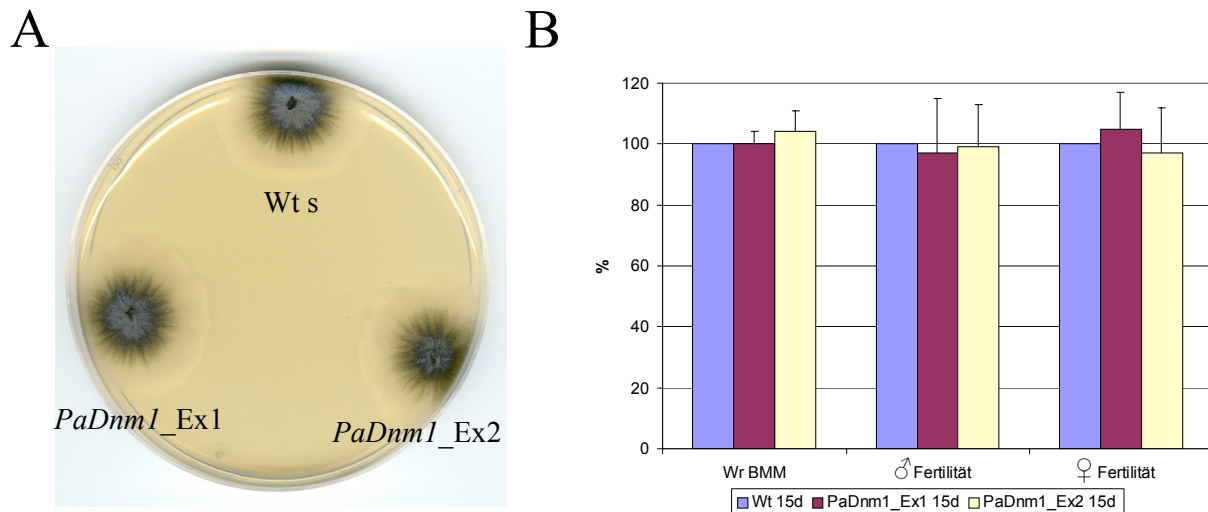


Abb. 20: Phänotypische Charakterisierung der Transformanten *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*. (A) Myzelien von Wildstamm (Wt) „s“ und den Transformanten *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* wurden auf BM-Medium für vier Tage bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert. Hinsichtlich der Myzelmorphologie und -pigmentierung bestehen keine Unterschiede zwischen den Ansätzen. (B) Vergleich der Wachstumsrate auf BM-Medium (Wr BMM) (n = jeweils 20 Isolate) und der männlichen (n = jeweils 10 Isolate) und weiblichen Fertilität (n = jeweils 5 Kreuzungen) zwischen mittelalten (15 Tage) Isolaten vom Wildstamm (blaue Balken) und den Transformanten *PaDnm1_Ex1* (dunkelrote Balken) und *PaDnm1_Ex2* (gelbe Balken). Die Balken geben den Mittelwert ± Standardfehler an. Signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind nicht erkennbar (u-Test, $p > 0,05$). Wt „s“ (100 %): Wr BMM = 0,6 cm/d, männliche Fertilität = $6,2 \times 10^5$ Spermationen/ml, weibliche Fertilität = 103 Perithezien/cm².

5.3.2.5 Bestimmung der mtDNA-Reorganisationen in den Transformanten *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*

Mittels Southern-blot-Analyse sollte überprüft werden, ob die veränderte mitochondriale Morphologie in den Transformanten die in Wildstämmen systematische Amplifikation von plDNA und die damit einhergehende Reorganisation der mtDNA (Belcour et al., 1981; Kück et al., 1981; Osiewacz und Esser, 1984) beeinflusst (Abb. 21). Hinzu kommt, dass in *S. cerevisiae* gezeigt werden konnte, dass die mitochondriale Morphologie Einfluss auf den mtDNA-Gehalt hat. So tritt bei *S. cerevisiae* durch Deletion des für die mitochondriale Fusion notwendigen Gens *ScFzo1* eine starke Fragmentierung der Mitochondrien und Verlust von mtDNA auf (Bleazard et al., 1999).

Zunächst wurde deshalb die Gesamt-DNA aus Wildstamm „s“ und jeweils zwei Sekundärtransformanten von *PaDnm1_Ex1*- und *PaDnm1_Ex2* isoliert und mit *Bgl*III restringiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran. Die Hybridisierungsanalyse wurde mit einer Sonde gegen plDNA (2,5 kbp *Sal*I-Fragment des Plasmids pSP17 [Stahl et al., 1982], entspricht dem ersten Intron von *PaCox1*) durchgeführt (Abb. 21). Auf diese Weise kann die in diesem Bereich nicht reorganisierte mtDNA anhand von 1,9 und 4,5 kbp-*Bgl*III-Fragmenten nachgewiesen werden.

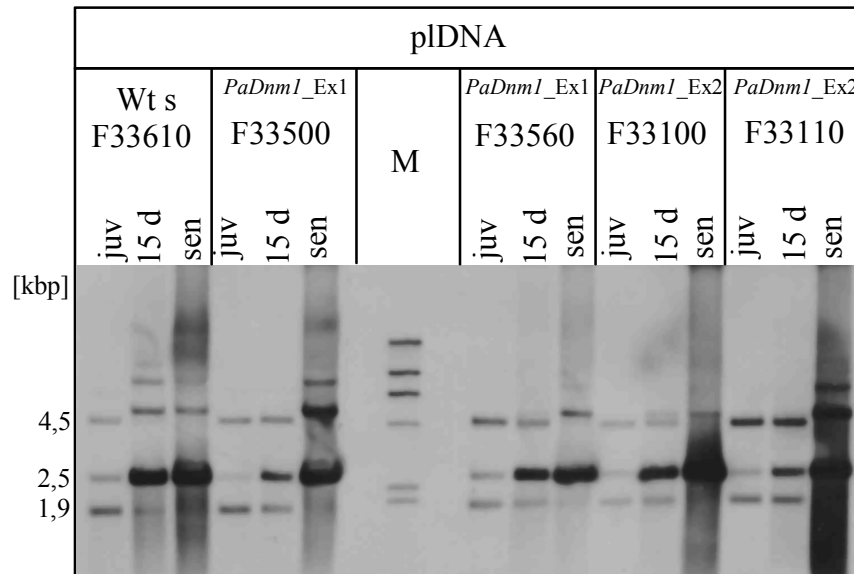


Abb. 21: Vergleichende Analyse der altersabhängigen mtDNA-Reorganisation in Wildstamm „s“ (Wt s) und den Transformanten *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*. Jeweils 300 ng Gesamt-DNA von Wildstamm „s“ und je zwei Sekundärtransformanten von *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* wurde mit *Bgl*II restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit einer DIG-markierten Sonde gegen die Sequenz des ersten Introns des mitochondrialen *PaCoxI*-Gens (2,5 kbp *Sall*-Fragment des Plasmids pSP17 [Stahl et al., 1982]) in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. In allen analysierten Stämmen kommt es während des Alterns zu einer progressiven Zunahme der pIDNA (Signal bei 2,5 kbp). Die Menge an nicht reorganisierter mtDNA (Signale bei 4,5 und 1,9 kbp) wird während dieses Zeitraumes geringer. Dies trifft auf die Transformanten in gleichem Ausmaß zu wie auf den Wildstamm. Hinsichtlich der charakteristischen altersabhängigen Instabilitäten in diesem mtDNA-Bereich sind demnach keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. M = λ *Hind*III (DIG-markiert) (40 ng)

Die zirkuläre pIDNA wird linearisiert und wird als Signal mit einer Größe von 2,5 kbp sichtbar. Hinsichtlich der altersabhängigen Bildung von pIDNA und dem progressiven Verlust der mtDNA bestehen keine Unterschiede zwischen Wildstamm „s“ und jeweils zwei Sekundärtransformanten von *PaDnm1_Ex1*- und *PaDnm1_Ex2*. Ein vorzeitiger Verlust von mtDNA durch die erhöhte mitochondriale Fragmentierung ist in diesen Isolaten ebenfalls nicht nachweisbar (Abb. 21).

5.3.2.6 Analyse der Lebensspanne von *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2*

Die Bestimmung der Lebensspanne von *PaDnm1_Ex1*- bzw. *PaDnm1_Ex2*-Sekundärtransformanten und Wildstamm „s“-Isolaten erfolgte auf BMM-Platten mit 30 ml Medium (Abb. 22). Aus isolierten einkernigen Sporen gewachsene juvenile Myzelien (~ vier Tage) wurden hierfür von den Sporenkeimungsplatten auf BMM überimpft und bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert.

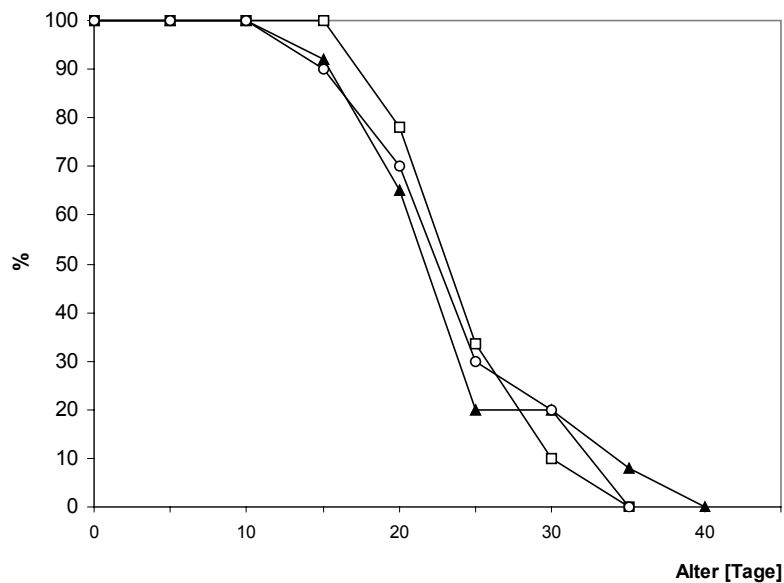


Abb. 22: Charakterisierung der Lebensspannen von Wildstamm „s“ (▲, n = 12) und *PaDnm1_Ex1-* (○, n = 9) bzw. *PaDnm1_Ex2-* (□, n = 10) Sekundärtransformanten. Die jeweiligen Isolate wurden auf Petrischalen mit 30 ml BM-Medium bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert. Wenn die Myzelien den Rand der Schale erreichten, wurden sie auf frisches Medium vom Wuchsrand her überimpft. Die Graphen stellen die prozentualen Anteile der überlebenden Isolate im Verlauf der Zeit dar. Die mittlere Lebensspanne (= das Alter, bei dem noch 50 % der Isolate leben) entspricht 22 Tage beim Wildstamm und 23 bzw. 23,5 Tage bei den *PaDnm1_Ex1-* und *PaDnm1_Ex2-*Sekundärtransformanten. Durch *PaDnm1*-Überexpression im Wildstamm „s“ lässt sich somit keine signifikante Veränderung der Lebensspanne erreichen (u-Test, $p > 0,05$).

Sobald die Wachstumsfront den Rand der Anzuchtschale erreichte, erfolgte die Überimpfung auf eine frische BMM-Platte. Die mittlere Lebensspanne beträgt bei den Wildstamm „s“-Isolaten 22 Tage und bei den *PaDnm1_Ex1-* und *PaDnm1_Ex2-*Sekundärtransformanten 23 bzw. 23,5 Tage. Somit bestehen hinsichtlich der Lebensspanne keine signifikanten Unterschiede zum Wildstamm „s“. Die erzwungene Mitochondrienfragmentierung durch *PaDnm1*-Überexpression im Wildstamm führt damit nicht zu einer Beeinflussung der analysierten phänotypischen Merkmale (siehe Diskussion).

5.3.3 *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“

Überexpression von *PaDnm1* führt in *P. anserina* zu einer Fragmentierung der Mitochondrien (siehe Abb. 19). Da das Gleichgewicht zwischen mitochondrialer Teilung und Fusion antagonistisch reguliert wird, sollte die *PaDnm1*-Deletion den Prozess der Mitochondrienfusion verstärken. In der Tat konnte in einer Vielzahl von Modellorganismen gezeigt werden, dass die Deletion bzw. Herunterregulation des jeweiligen *PaDnm1*-homologen Gens zur Bildung stark elongierter Mitochondrien (*S. cerevisiae*, Otsuga et al., 1998) und zur Entstehung umfangreicher mitochondrialer Netzwerke (*S. cerevisiae*: Fukushima et al., 2001; *A. thaliana*: Arimura und Tsutsumi, 2002) und Aggregate (*C. elegans*: Labrousse et al., 1999; menschliche Zellkultur: Smirnova et al., 1998) führt. Zur Prüfung, ob dies auch für *P. anserina* zutrifft, sollte *PaDnm1* im Wildstamm deletiert werden. Die Analyse der Deletionsmutanten zeigt darüber hinaus, ob durch eine verstärkte Mitochondrienfusion phänotypische Parameter und die Lebensspanne beeinflusst werden.

5.3.3.1 Herstellung eines *PaDnm1*-Deletionsvektors

PaDnm1 wurde durch Genaustausch mit einer Resistenzkassette (Hamann et al., 2005) deletiert. Hierfür wurden zunächst kurze flankierende Regionen des *PaDnm1*-Leserahmens mittels PCR amplifiziert. Für die 0,26 kbp 5'- bzw. 0,27 kbp 3'-Flanke wurden die Oligonukleotide KoDnm1 / KoDnm2 bzw. KoDnm3 / KoDnm4 eingesetzt (Abb. 23 A). Als Matrize diente das Cosmid #42B8, das den *PaDnm1*-Genlocus enthält (Tinazli, 2002). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde als erstes die 5'-Flanke in den Vektor pKO3 (Hamann et al., 2005) ligiert. Hierfür wurden sowohl das Fragment als auch pKO3 mit *KpnI* und *HindIII* restringiert. Die Ligation erfolgte im molaren Verhältnis Vektor : Fragment 1:5, das resultierende Konstrukt erhielt die Bezeichnung pDnmIKO1 (Abb. 23 B). Nach Transformation des Ligats in kompetente *E. coli* XL1Blue-Zellen erfolgte die Selektion von zwölf putativen Kandidaten auf Ampicillin-haltigem Medium. Durch Restriktionsanalyse der isolierten Plasmid-DNA mit *BamHI* wurden drei Klone als positiv identifiziert. Klon T2 (Abb. 23 C) diente als Grundlage für den zweiten Klonierungsschritt (Abb. 24 A). Hierfür wurde pDnmIKO1 und die 3'-Flanke mit *BcuI* und *NotI* restringiert und im molaren Verhältnis Vektor : Fragment 1:5 miteinander ligiert. Das resultierende Konstrukt erhielt die Bezeichnung pDnmIKO2 (Abb. 24 A). Von zehn putativen Kandidaten, die nach Transformation des Ligats in kompetente *E. coli* XL1Blue erhalten wurden, waren neun nach *BamHI*-Restriktion positiv.

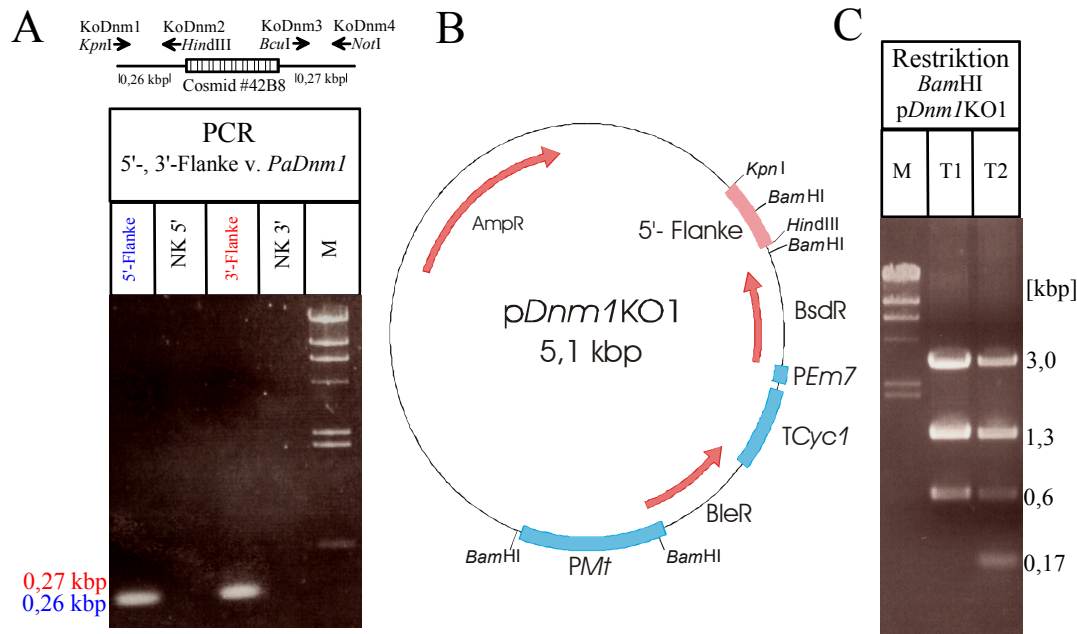
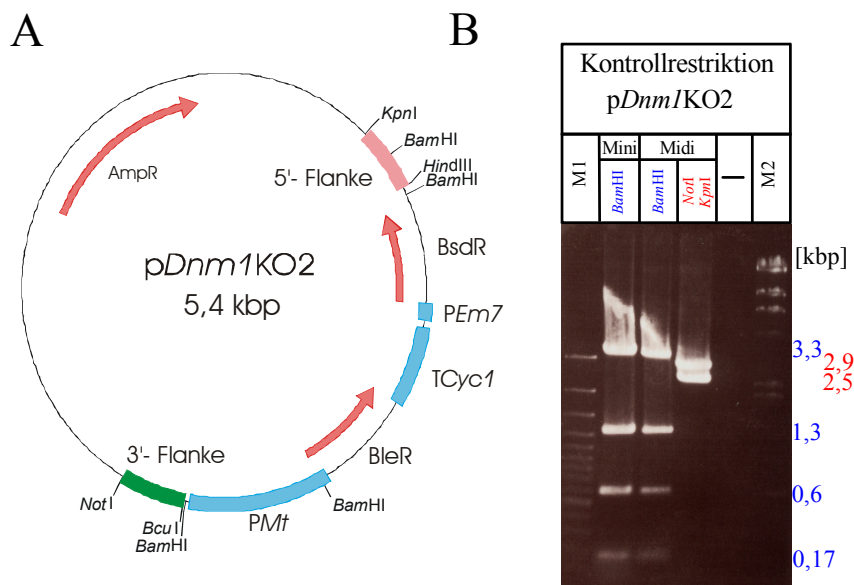


Abb. 23: *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“ (I): Amplifikation der *PaDnm1*-Flanken und Konstruktion des Vektors *pDnm1KO1*. (A) *Oben:* Zur PCR-Amplifikation von kurzen flankierenden *PaDnm1*-Regionen wurden die Oligonukleotide KoDnm1 und KoDnm2 (5'-Region) bzw. KoDnm3 und KoDnm4 (3'-Region) verwendet. Als Matrize diente das Cosmid #42B8. Die Amplifikate haben eine Länge von ~ 0,26 / 0,27 kbp. *Unten:* Elektrophoretische Auftrennung von Aliquots (5 μ l) der PCR-Ansätze in einem 1% Agarose-TAE-Gel. PCR-Programm: (1x 2 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 60 °C, 1 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). M = λ *HindIII* (250 ng), NK 5', NK 3' = PCR-Negativkontrollen (alle Komponenten ohne Matrize) (B) Schematische Darstellung des Plasmids *pDnm1KO1*. Das 5'-Amplifikat (rosa) und der Vektor pKO3 (Hamann et al., 2005) wurden mit *KpnI* und *HindIII* restringiert und anschließend durch Ligation miteinander verknüpft. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind in der Karte angegeben. *AmpR* = Ampicillin-Resistenzkassette, *BleR* = Phleomycin-Resistenzgen, *BsdR* = Blastocidin-Resistenzgen, *PEm7* = *Em7*-Promotor, *PMT* = Metallothionein-Promotor, *TCyc1* = *Cyc1*-Terminator (C) Kontrollrestriktionen von *pDnm1KO1* (jeweils 5 μ l der Minipräparationen) mit der Restriktionsendonuklease *BamHI*. Am rechten Bildrand sind die entsprechenden Fragmentgrößen angegeben. *E. coli*-Transformante T2 zeigt vier *BamHI*-Fragmente und ist somit positiv, während bei der Restriktion von T1 das 0,17 kbp-Fragment fehlt. T1 enthält somit lediglich den religierten pKO3-Vektor. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M = λ *HindIII* (250 ng)



Legende siehe nächste Seite

Abb. 24 (vorherige Seite): *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“ (II): Konstruktion des *E. coli*-Austauschvektors *pDnm1KO2*. (A) Schematische Darstellung des Plasmids *pDnm1KO2*. Das 3'-Amplifikat (grün) und der Vektor *pDnm1KO1* wurden mit *BcuI* und *NotI* restringiert und anschließend durch Ligation miteinander verknüpft. Die Klonierungs- und Kontrollschnittstellen sind in der Karte angegeben. Amp^R = Ampicillin-Resistenzkassette, Ble^R = Phleomycin-Resistenzgen, Bsd^R = Blastocidin-Resistenzgen, *PEm7* = *Em7*-Promotor, *PMt* = Metallothionein-Promotor, *TCyc1* = *Cyc1*-Terminator (B) Kontrollrestriktionen von *pDnm1KO2* (jeweils 500 ng DNA) mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI (blau) und *NotI/KpnI* (rot). Am rechten Bildrand sind die entsprechenden Fragmentgrößen farblich gekennzeichnet angegeben. Die elektrophoretische Auftrennung der Ansätze erfolgte in einem 1% Agarose-TAE-Gel. M1 = 100 bp-Leiter, M2 = λ *Hind*III (250 ng)

Die mit den Flanken versehene Resistenzkassette von *pDnm1KO2* diente zum Austausch von *PaDnm1* auf dem Cosmid #42B8 in *E. coli* KS272 (*pKOBEG*). #42B8 wurde gewählt, weil durch Southern-blot-Analyse gezeigt werden konnte, dass das *PaDnm1*-Gen von großen genomischen Regionen flankiert wird, die für die homologe Rekombination in *P. anserina* entscheidend sind (5'-Region: > 13,4 kbp, 3'-Region: > 8,8 kbp) (Abb. 25). Dieses Cosmid hat gegenüber weiteren Cosmiden mit dem *PaDnm1*-Locus (#7C5, #42D9 [Tinazli, 2002]) den Vorteil, dass durch *SspI*-Restriktion der genomischen DNA eines Deletionsstammes nachgewiesen werden kann, ob das Austauschcosmid ektopisch und/oder homolog in das Genom integriert worden ist (Abb. 25).

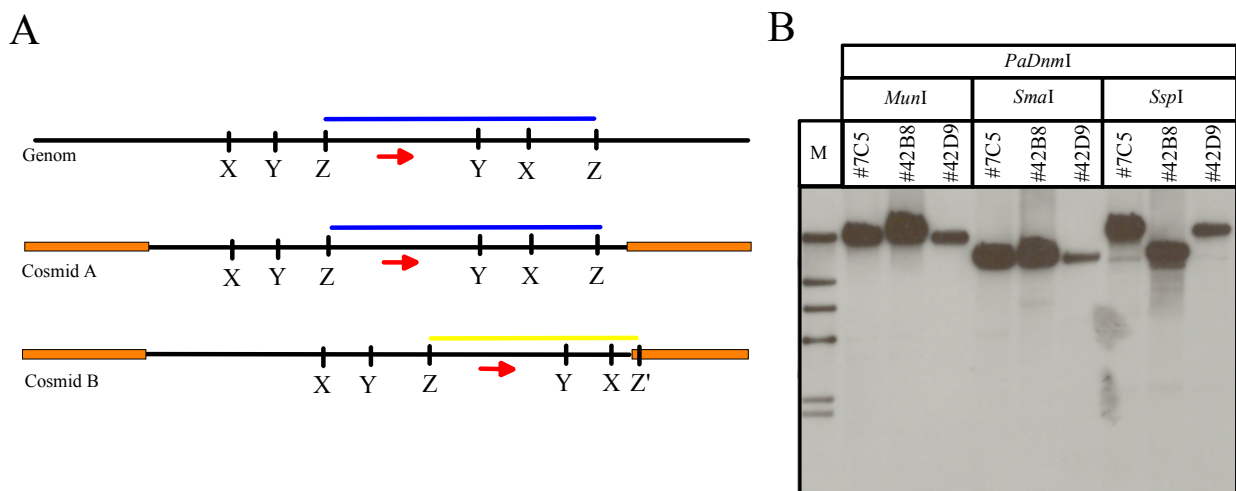


Abb. 25: Southern-blot-Analyse zur Auswahl eines geeigneten *PaDnm1*-Cosmids als Grundlage für die Erstellung eines *PaDnm1*-Deletionsvektors. (A) Die Cosmide A und B enthalten beide ein genomisches Fragment mit *PaDnm1* (roter Pfeil). Restriktion von Cosmid A mit einer der Endonukleasen (X, Y oder Z) ermöglicht nicht die Unterscheidung zwischen homologer und ektopischer Integration des Cosmids in das Genom, da in beiden Fällen eine identische Fragmentgröße erhalten wird. Wenn allerdings Cosmid B mit Z restringiert wird, entsteht im Fall der ektopischen Integration ein kleineres Fragment (gelb), weil die ursprüngliche Schnittstelle Z fehlt und stattdessen bei Z' in der Cosmidsequenz (orange Balken) geschnitten wird. Bei der Integration des Cosmids in das Genom durch homologe Rekombination entsteht hingegen das größere Fragment (blau). (B) Jeweils 1 μ g der *PaDnm1*-Cosmide (#7C5, #42B8, #42D9) wurde mit (i) *MunI*, (ii) *SmaI* und (iii) *SspI* restringiert und in einem 0,8 % Agarose-TAE-Gel aufgetrennt. Die Southern-blot-Analyse erfolgte mit einer *PaDnm1*-spezifischen DIG-Sonde (1,7 kbp-*EcoRI/NcoI*-Fragment des Plasmids *pPaDnm1* [Tinazli, 2002]) in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. Die Fragmentgrößen der drei Cosmide bei den *MunI*- und *SmaI*-Restriktionen sind identisch, während die *SspI*-Restriktion von #42B8 ein kleineres *PaDnm1*-Fragment als #7C5 und #42D9 zeigt. Die Art der Integration in das Genom der Transformanden (ektopisch / homolog) kann daher durch *SspI*-Restriktion bestimmt werden. Für die Erstellung des *PaDnm1*-Deletionsvektors wurde somit #42B8 als Grundlage verwendet. M = λ *Hind* III (DIG-markiert) (40 ng)

Kompetente *E. coli* KS272 (pKOBEG)-Zellen wurden mit dem Cosmid #42B8 transformiert. Die Anzucht der Transformanden wurde bei 30 °C durchgeführt, damit sie das temperatursensitive Plasmid pKOBEG nicht verlieren. Die Selektion positiver Klone erfolgte auf Ampicillin-haltigem Medium, mit einem Kandidaten wurde weitergearbeitet. Zellen dieses Klons dienten als Ausgangsmaterial zur Herstellung elektrokompenter Zellen. Das Plasmid pDnm1KO2 wurde mit *NotI* und *KpnI* restringiert, um die mit den Flanken versehene Resistenzkassette zu erhalten. Nach Aufreinigung des Fragments erfolgte die Dialyse der Probe als Vorbereitung für die Transformation durch Elektroporation in kompetente *E. coli* KS272 (pKOBEG, #42B8). Die Selektion von Klonen, die *PaDnm1* auf dem Cosmid gegen die Resistenzkassette ausgetauscht hatten, erfolgte auf zur Selektion von „Austauschcosmiden“ auf Ampicillin- und Blasticidin-haltigem Medium bei 30 °C. (Die Resistenzkassette enthält ein Blasticidin-Resistenz vermittelndes Gen unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors [*Em7*]). Jeweils ein Vertreter der Stämme KS272_T1-KS272_T4 wurde mittels Kolonie-PCR überprüft (Abb. 26 A). Als Oligonukleotide dienten KoDnm5 (bindet außerhalb der 5'-Flanke) und EM7-for1 (bindet im *Em7*-Promotor). Alle Klone zeigten Amplifikat bei 0,9 kbp, das auf einen erfolgreichen Austausch auf dem Cosmid deutet. Anschließend wurden die Klone in LB mit Blasticidin für einige Stunden bei 37 °C inkubiert, damit das Wildtypcosmid #42B8 und das temperatursensitive pKOBEG entfernt werden. Aliquots der Flüssigkultur wurden jeweils auf LB mit Ampicillin und Blasticidin bzw. LB mit Ampicillin und Chloramphenicol (zur Selektion pKOBEG-haltiger Klone) ausplattiert.

Durch Kolonie-PCR mit Klonen der Stämme KS272_T1 bis KS272_T4 und den außerhalb der Flanken bindenden Oligonukleotide KoDnm5 und KoDnm6 wurde geprüft, ob das Wildtypcosmid #42B8 noch enthalten ist (Abb. 26 B). Alle vier Kandidaten zeigen ein Amplifikat bei 2,4 kbp und nicht bei 3,2 kbp. Somit enthalten die Klone nur das Austauschcosmid $\Delta Dnm1\#42B8$ und nicht das Wildtypcosmid #42B8. Da kein Wachstum auf Chloramphenicol auftrat, haben die vier Kandidaten pKOBEG verloren. Ein Klon des Stammes KS272_T3 diente als Grundlage für eine Rückgewinnung der $\Delta Dnm1\#42B8$ -DNA. Diese wurde nach der Isolation durch PCR mit den Oligonukleotiden KoDnm5 und EM7-for1 verifiziert (Abb. 26 C).

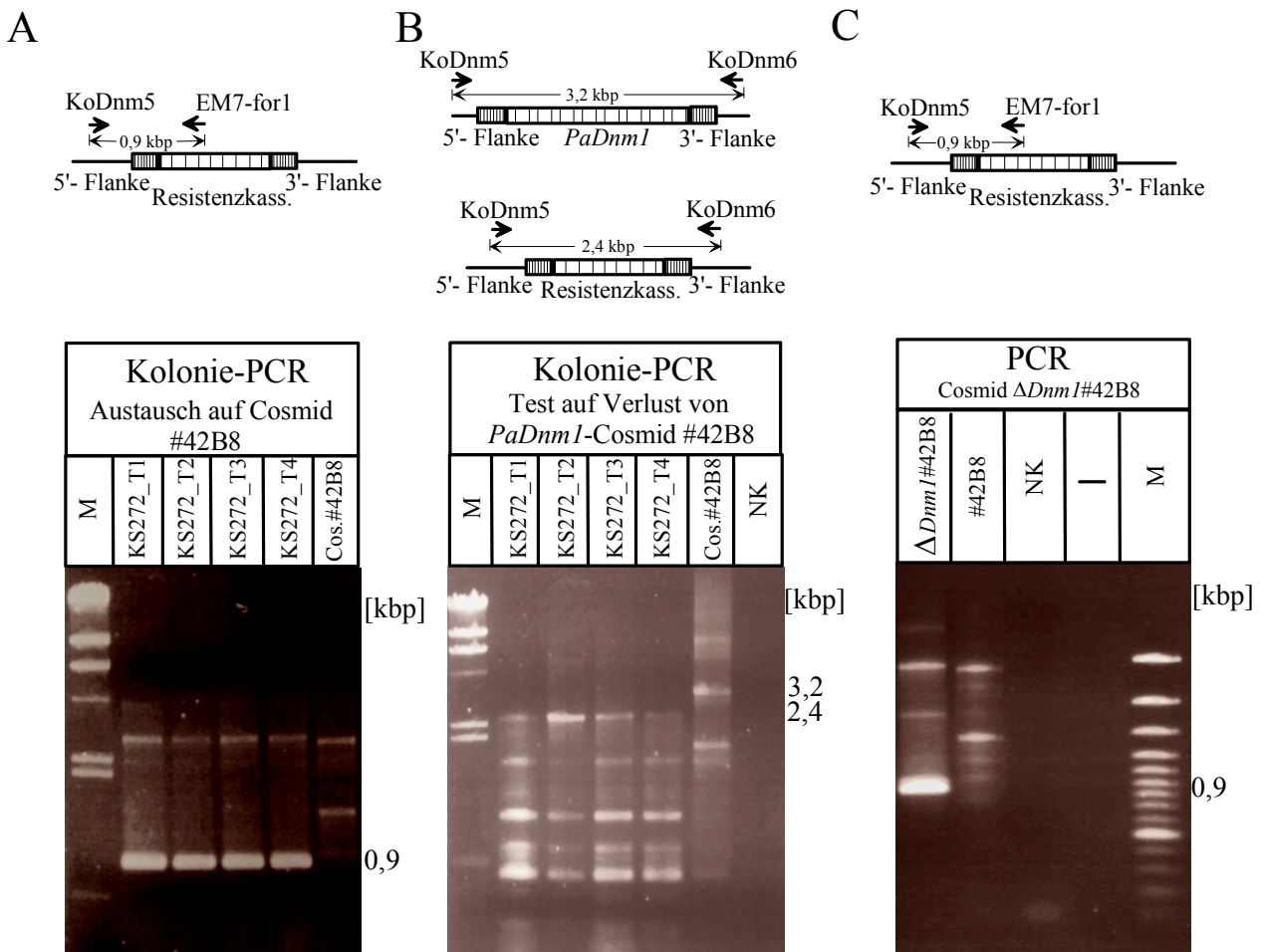


Abb. 26: *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“ (III): Verifizierung des *PaDnm1*-Austausches in *E. coli* KS272 durch PCR-Analysen. (A) *Oben*: Für den Test des Austausches des *PaDnm1*-Gens mit der Resistenzkassette auf dem Cosmid #42B8 in *E. coli* KS272 wurden die Oligonukleotide KoDnm5 und EM7-for1 verwendet. Das Amplifikat hat eine Länge von 0,9 kbp. *Unten*: Die Kolonie-PCR wurde mit vier Blasticidin-resistenten Klonen der Stämme KS272_T1-KS272_T4 durchgeführt. Die vier Ansätze sind positiv. Eine PCR mit Cosmid #42B8 diente als Negativkontrolle. PCR-Programm: (1x 4 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 48 °C, 1,5 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). M = λ HindIII (250 ng) (B) *Oben*: Der Verlust des Cosmids #42B8 in den Transformanten wurde mittels Kolonie-PCR und den Oligonukleotiden KoDnm5 und KoDnm6 nachgewiesen. Das Amplifikat hat eine Länge von 2,4 kbp (Austauschcosmid) bzw. 3,2 kbp (Cosmid #42B8). *Unten*: Die Transformanten (KS272_T1-KS272_T4) verfügen nur über das Austauschcosmid, während das Wildtypcosmid #42B8 nicht mehr vorhanden ist. Die PCR mit Cosmid #42B8 diente als Kontrolle. PCR-Programm: (1x 4 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 48 °C, 3,5 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). M = λ HindIII (250 ng) (C) *Oben*: Das isolierte Deletionscosmid $\Delta Dnm1$ #42B8 wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden KoDnm5 und EM7-for1 verifiziert. Das Amplifikat hat eine Länge von 0,9 kbp. *Unten*: Im Gegensatz zu Cosmid #42B8 zeigt $\Delta Dnm1$ #42B8 ein Signal bei 0,9 kbp. PCR-Programm: (1x 2 min 95 °C); (35x 1 min 95 °C, 1 min 52 °C, 3,5 min 72 °C); (1x 6 min 72 °C). M = 100 bp-Leiter. Die elektrophoretische Auftrennung von Aliquots (5 μ l) der PCR-Ansätze in (A-C) fand in 1 % Agarose-TAE-Gelen statt. NK = PCR-Negativkontrollen (alle Komponenten ohne Matrice)

5.3.3.2 Transformation von Wildstamm „s“ -Protoplasten mit Deletionscosmid $\Delta Dnm1\#42B8$ und Southern-blot-Analysen mit putativen Transformanden

Das Cosmid $\Delta Dnm1\#42B8$ wurde in Protoplasten von Wildstamm „s“ (Isolat F18261 mat-) transformiert, um den Austausch des *PaDnm1*-Endogens mit der Resistenzkassette vorzunehmen (Abb. 27).

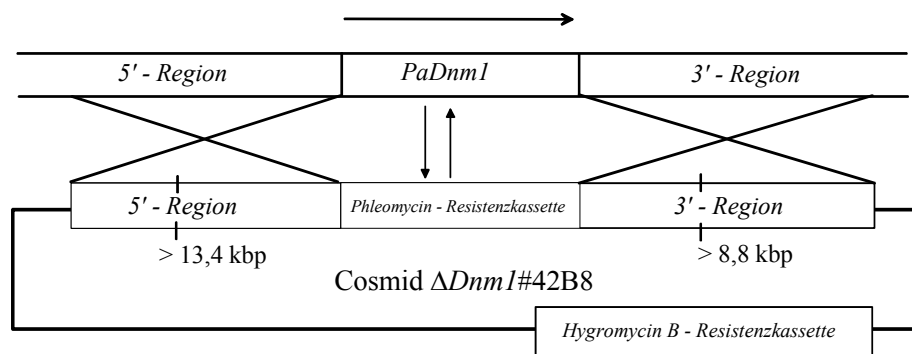


Abb. 27: Schematische Darstellung der *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“ durch homologe Rekombination zwischen genomischer DNA und dem Cosmid $\Delta Dnm1\#42B8$. Im oberen Teil ist ein Ausschnitt aus dem Genom dargestellt. Der horizontale Pfeil markiert den offenen Leserahmen von *PaDnm1*. Homologe Rekombination zwischen den 5'- und 3'-flankierenden Regionen des Genoms und des Cosmids $\Delta Dnm1\#42B8$ führen zum Austausch von *PaDnm1* mit einer Kassette, die Resistenz gegen Phleomycin vermittelt (vertikale Pfeile). Die Wahrscheinlichkeit für die homologe Rekombination steigt mit der Größe der flankierenden Regionen. Ektopische Integrationen des Cosmids in das Wildstammgenom können durch Wachstumstests auf Hygromycin B-haltigem Medium nachgewiesen werden, da es über eine Resistenzkassette gegen dieses Fungizid verfügt.

Hierfür wurden 20 g (Feuchtgewicht) des Myzels zur Protoplastierung mit Glucanex eingesetzt. Zu ca. 10^7 Protoplasten wurde zehn μg des Cosmids $\Delta Dnm1\#42B8$ gegeben. Die Primärselektion erfolgte durch Phleomycin im Anzuchtmedium der Transformanden. 37 Primärtransformanden wurden erhalten. Zehn der Primärtransformanden waren sensitiv gegenüber Hygromycin B und wurden weiter analysiert, da bei ihnen eine ektopische Integration des Deletionscosmids, welches Resistenz gegen Hygromycin B vermittelt, unwahrscheinlich ist. Durch Southern-blot-Analysen konnte eine homokaryotische Primärtransformande mit erfolgreichem *PaDnm1*-Austausch identifiziert werden (Abb. 28, 29). Sie erhielt die Bezeichnung *PaDnm1::ble*.

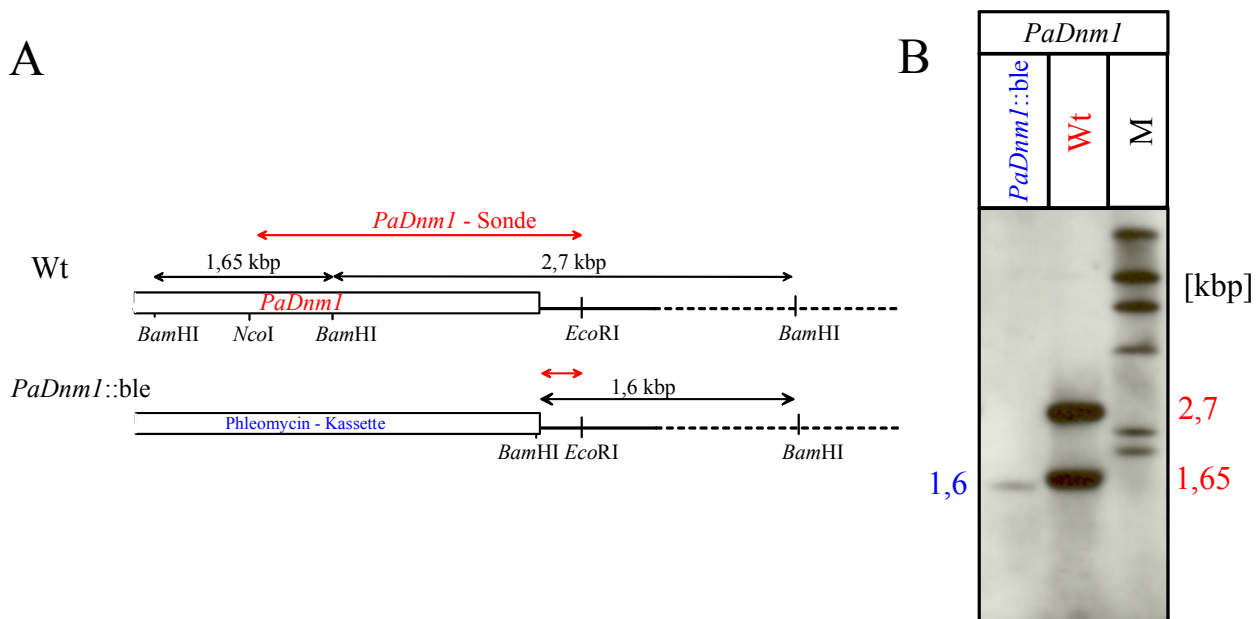


Abb. 28: Southern-blot-Analyse zur Verifizierung der *PaDnm1*-Deletion in Wildstamm „s“. (A) Zur *PaDnm1*-Detektion wurde ein 1,7 kbp *NcoI/EcoRI*-Fragment verwendet („*PaDnm1*-Sonde“), welches sowohl mit dem *PaDnm1*-Leserahmen als auch mit einer kleinen Region des Terminatorbereichs hybridisiert. Im Wildstamm werden nach *BamHI*-Restriktion der genomischen DNA zwei Fragmente (2,7 und 1,65 kbp) detektiert. In dem *PaDnm1*-Deletionsstamm (*PaDnm1::ble*) kann mit dieser Sonde ein 1,6 kbp-*BamHI*-Fragment nachgewiesen werden. (B) Jeweils 600 ng genomische DNA des Wildstammes „s“ (Wt) und des Deletionsstammes *PaDnm1::ble* wurde mit *BamHI* restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die *PaDnm1*-Hybridisierung über Nacht mit dem DIG-markierten 1,7 kbp-*EcoRI/NcoI*-Fragment des Plasmids p*PaDnm1* (Tinazli, 2002) in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. Der Wt zeigt die beiden entsprechenden *PaDnm1*-Fragmente (rot), während bei *PaDnm1::ble* nur das 1,6 kbp-Fragment sichtbar ist. Dieser Befund bestätigt die *PaDnm1*-Deletion in *PaDnm1::ble*. M = λ *Hind III* (DIG-markiert) (40 ng)

Im Einzelnen wurden die Southern-blot-Analysen wie folgt durchgeführt: Zum Nachweis der *PaDnm1*-Deletion in *PaDnm1::ble* wurde die Gesamt-DNA mit *BamHI* restringiert (Abb. 28). Nach elektrophoretischer Auftrennung erfolgte der Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran. Die Hybridisierungsanalyse erfolgte mit einer Sonde gegen *PaDnm1* (1,7 kbp-*NcoI / EcoRI*-Fragment des Plasmids p*PaDnm1* [Tinazli, 2002]). Während im Wildstamm zwei Signale (2,7 und 1,65 kbp) sichtbar sind, ist in der Probe von *PaDnm1::ble* nur ein schwaches Signal bei 1,6 kbp erkennbar (Abb. 28 B). Hierbei handelt es sich um ein Fragment mit einer kurzen Region im 3'-untranslatierten Bereich von *PaDnm1*, an die die Sonde binden kann.

Für den Nachweis der Integration der Resistenzkassette in das Genom von *PaDnm1::ble* durch homologe Rekombination wurde die genomische DNA mit *SspI* restringiert (Abb. 29). Nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran wurde eine Hybridisierungsanalyse mit einer Sonde gegen das Phleomycin-Resistenzgen (0,35 kbp *BglII / SmaI*-Fragment von pKO3 [Hamann et al., 2005]) durchgeführt.

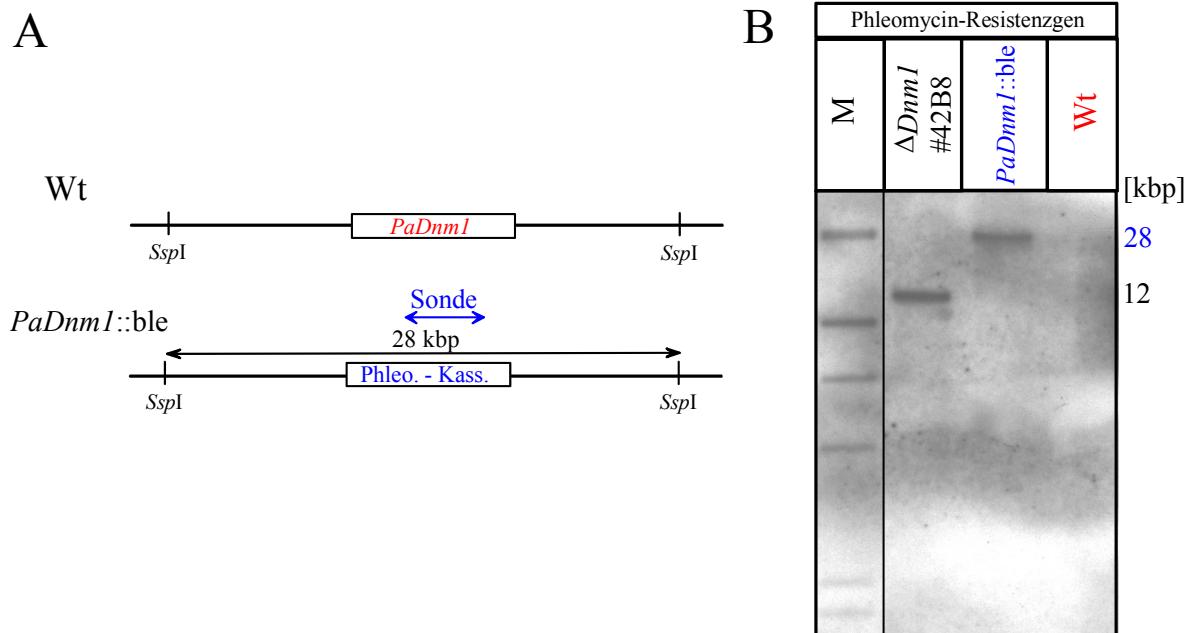


Abb. 29: Southern-blot-Analyse zur Verifizierung der Integration der Phleomycin-Resistenzkassette in das Genom von *PaDnm1::ble* durch homologe Rekombination. (A) Zur Detektion der Resistenzkassette wurde ein 0,35 kbp *BglII/SmaI*-Fragment von pKO3 (Hamann et al., 2005) verwendet, welches mit dem Leserahmen des Phleomycin-Resistenzgens hybridisiert. In *PaDnm1::ble* wird nach *SspI*-Restriktion der genomischen DNA im Fall der Integration durch homologe Rekombination ein Fragment (28 kbp) detektiert. Im Wildstamm kommt es dagegen nicht zur Sondenhybridisierung. **(B)** Jeweils 300 ng genomische DNA des Wildstammes „s“ (Wt) und des Deletionsstammes *PaDnm1::ble* und 15 ng des Deletionscosmids $\Delta Dnm1$ #42B8 als Kontrolle für ektopische Integration wurde mit *SspI* restringiert und auf einem 0,8 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde über Nacht in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. *PaDnm1::ble* enthält ausschließlich das 28 kbp-*SspI*-Fragment, somit hat eine ektopische Integration des Deletionscosmids in das Genom nicht stattgefunden.

Im *PaDnm1::ble*-Ansatz ist ein Signal bei 28 kbp erkennbar (Abb. 29 B). Anhand der genomischen *P. anserina*-Sequenz wurde abgeleitet, dass dies die korrekte Größe des *SspI*-Fragments ist, auf dem sich zuvor *PaDnm1* befand. Weitere Signale sind in *PaDnm1::ble* nicht erkennbar, sodass eine ektopische Integration von $\Delta Dnm1$ #42B8 nicht stattgefunden hat.

5.3.3.3 Analysen zur mitochondrialen Morphologie und Lebensspanne in *PaDnm1::ble*-Stämmen

Der auf Southern-Ebene verifizierte *PaDnm1*-Deletionsstamm wurde nach Kreuzung mit dem Wildstamm „s“ und Selektion einkerniger (d. h. genetisch einheitlicher) Nachkommen auf die Mitochondrienmorphologie in verschiedenen Altersstadien hin untersucht (Abb. 30).

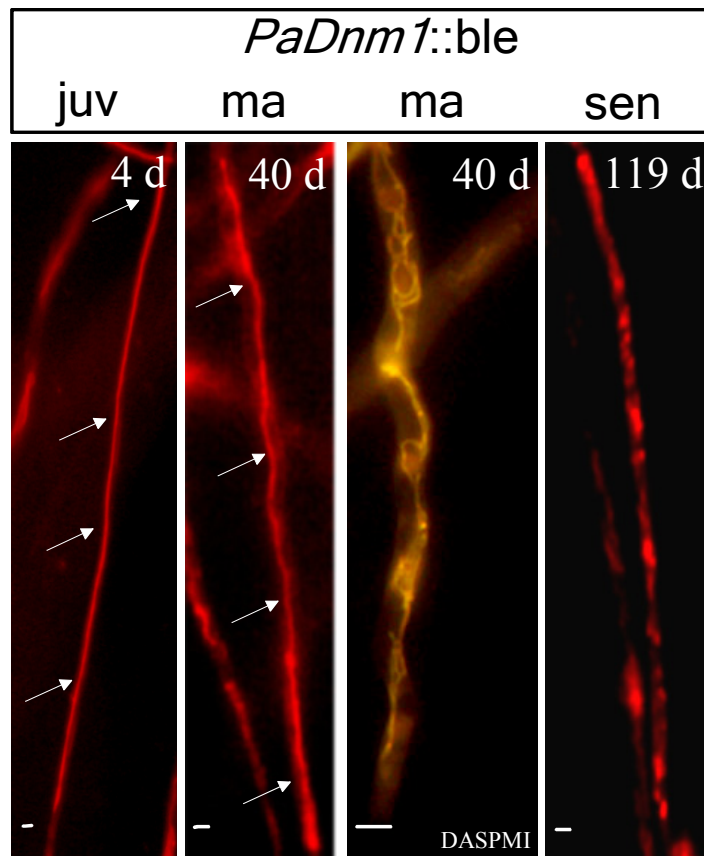


Abb. 30: Mitochondrienmorphologie in juvenilen (juv), mittelalten (ma) und seneszenten Hyphen des *PaDnm1*-Deletionsstammes *PaDm1::ble*. Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1% Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchtekammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien wurde entweder eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) oder eine DASPMI-Lösung (25 µg/ml) auf die Myzelien pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop („Mitotracker Red“: λ_{ex} 515-560 nm, λ_{em} > 590 nm; DASPMI: λ_{ex} 450-490 nm, λ_{em} > 515 nm) analysiert. Juvenile und mittelalte *PaDnm1::ble*-Isolate zeigen extrem lange Mitochondrien (elongierte Einzelmitochondrien sind durch weiße Pfeile markiert) bzw. die Ausbildung von großen mitochondrialen Netzwerken. Seneszente Isolate erhalten dagegen fragmentierte Mitochondrien. Rechts oben in den Teilabbildungen ist jeweils das Alter der Kultur angegeben. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 µm.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Myzelpräparate mit „Mitotracker Red CMXRos“ zeigte, dass im juvenilen und mittelalten Stadium extrem elongierte Mitochondrien in den Hyphen vorhanden sind (Abb. 30). In seltenen Fällen lassen sich umfangreiche mitochondriale Netzwerke erkennen (siehe DASPMI-Färbung eines mittelalten Isolats, Abb. 30). Die mitochondriale Morphologie in *PaDnm1::ble* ist mit derjenigen von *Dnm1*-Deletionsmutanten anderer Modellorganismen, insbesondere *S. cerevisiae* (Otsuga et al., 1998, Fukushima et al., 2001), vergleichbar. Im seneszenten Stadium von *PaDnm1::ble* erscheinen jedoch, wie in seneszenten Isolaten des Wildstammes „s“ und der Mutante *grisea* (siehe Abb. 5), die Mitochondrien fragmentiert (Abb. 30), sodass möglicherweise andere Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie eine Rolle spielen (siehe Diskussion). Bemerkenswert ist jedoch, dass *PaDnm1::ble*-Nachkommen das seneszente Stadium sehr viel später erreichen als Wildstamm „s“-Isolate (Abb. 31).

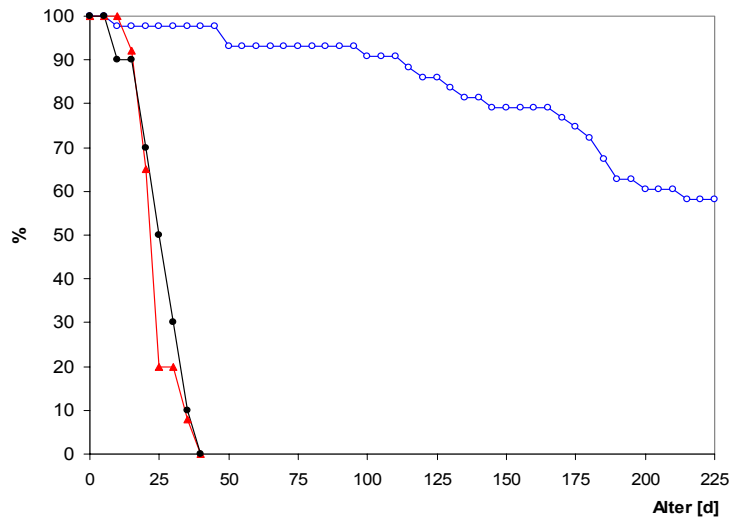


Abb. 31: Charakterisierung der Lebensspannen von Wildstamm „s“- und *PaDnm1::ble*-Nachkommen. Die jeweiligen Isolate wurden auf Petrischalen mit 30 ml BM-Medium bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert. Wenn die Myzelien den Rand der Schale erreichten, wurden sie auf frisches Medium vom Wuchsrand her überimpft. Die Graphen stellen die prozentualen Anteile der überlebenden Isolate im Verlauf der Zeit dar. Die mittlere Lebensspanne (= die Zeit, zu der noch 50 % der Isolate leben) entspricht 22 Tage beim Wildstamm (▲, rote Linie, n = 12). Sie kann bei der *PaDnm1::ble*-Mutante (○, blaue Linie, n = 43) noch nicht angegeben werden, da im Analysezeitraum bis 225 Tage noch mehr als 50 % der Isolate leben. Die Deletion von *PaDnm1* führt somit zu einer starken Verlängerung der Lebensspanne. Wildstammisolate aus einer Wildstamm „s“ x *PaDnm1::ble*-Kreuzung (●, schwarze Linie, n = 10) haben eine mittlere Lebensspanne von 23 Tagen.

Die mittlere Lebensspanne der *PaDnm1::ble*-Nachkommen wurde durch Analyse von 43 Isolaten ermittelt. Nach 225 Tagen sind weniger als 50 % der Isolate gestorben (Abb. 31). Dagegen beträgt die mittlere Lebensspanne bei den Wildstamm „s“-Isolaten nur 22 Tage. Zur Kontrolle wurden Wildstämme, die aus einer Kreuzung zwischen Wt „s“ und *PaDnm1::ble* isoliert wurden, auf die mittlere Lebensspanne hin untersucht: Sie entspricht mit 23 Tagen der charakteristischen mittleren Lebensspanne des Wildstammes „s“ (Abb. 31).

Deletion von *PaDnm1* führt somit zu einer Änderung der mitochondrialen Morphologie (starke Elongation der Mitochondrien, mitochondriale Netzwerke), zu einer Verzögerung der Mitochondrienfragmentierung im seneszenten Stadium und zu einer deutlichen Verlängerung der Lebensspanne.

5.3.3.4 Reversion des *PaDnm1::ble*-Phänotyps

Um zu bestätigen, dass die veränderte mitochondriale Morphologie und die Erhöhung der Lebensspanne in *PaDnm1::ble* tatsächlich auf die *PaDnm1*-Deletion zurückzuführen ist, wurde dieses Gen in das Genom des Deletionsstammes wieder eintransformiert. Zunächst wurden 20 g (Feuchtgewicht) Myzel mit Glucanex protoplastiert. 1×10^7 Protoplasten wurden mit zehn μg des *PaDnm1*-Cosmids #42B8 transformiert. Die Selektion von Primärtransformanten erfolgte durch Anzucht auf Hygromycin B-haltigem Medium, da das Cosmid über eine Resistenzkassette gegen dieses Fungizid verfügt. Eine putative Primärtransformante wurde erhalten. Bemerkenswerterweise waren sowohl die Regenerations- als auch die Positivkontrolle negativ. Die Transformation wurde wiederholt, wobei zwei Kandidaten erhalten wurden. Auch hier konnte auf den Platten der Regenerations- und Positivkontrolle kein Wachstum beobachtet werden. Diese Befunde zeigen, dass die Regeneration der *PaDnm1::ble*-Protoplasten in dem Transformationsmedium stark beeinträchtigt ist. Die insgesamt drei putativen Primärtransformanten wurden durch eine Southern-blot-Analyse auf die Integration des Cosmids hin untersucht (Abb. 32 A).

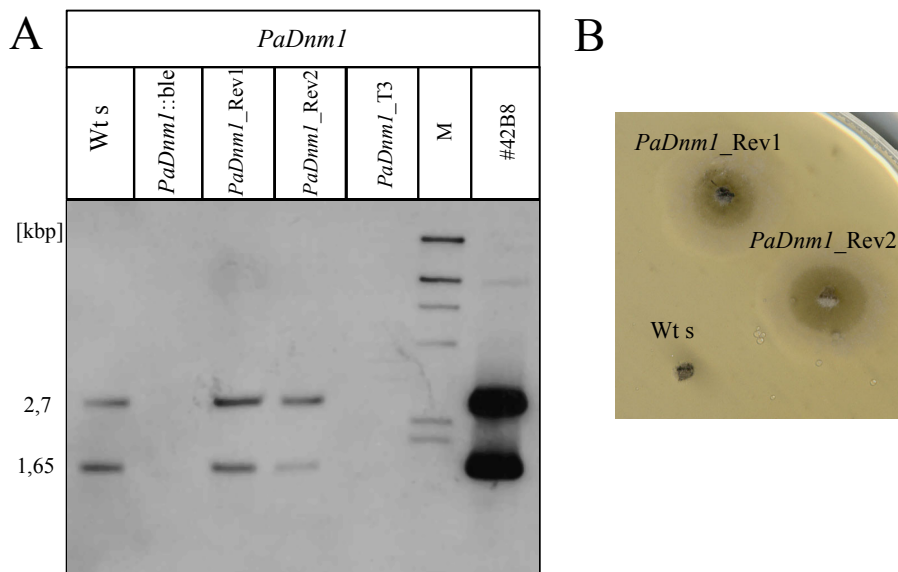


Abb. 32: Verifizierung der Revertanten *PaDnm1_Rev1* und *PaDnm1_Rev2*. (A) Jeweils 300 ng genomische DNA des Wildstammes „s“ (Wt „s“), der *PaDnm1::ble*-Mutante und der Transformanten *PaDnm1_Rev1*, *PaDnm1_Rev2* und *PaDnm1_T3* wurde mit *Bam*HI restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die *PaDnm1*-Hybridisierung über Nacht mit dem DIG-markiertem 1,7 kbp-*Eco*RI/*Nco*I-Fragment des Plasmids p*PaDnm1* (Tinazli, 2002) in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. Im Wildstamm und in den Transformanten *PaDnm1_Rev1* und *PaDnm1_Rev2* werden nach *Bam*HI-Restriktion der genomischen DNA zwei Fragmente (2,7 und 1,65 kbp) detektiert. In dem *PaDnm1*-Deletionsstamm (*PaDnm1::ble*) und der falsch positiven Transformante *PaDnm1_T3* fehlen diese Fragmente. Die *Bam*HI-Restriktion des Cosmids #42B8 dient als Positivkontrolle. M = λ *Hind* III (DIG-markiert) (40 ng) (B) Die beiden in der Southern-blot-Analyse als positiv verifizierten Revertanten *PaDnm1_Rev1* und *PaDnm1_Rev2* können beide auf Phleomycin-haltigem BMM wachsen. Somit handelt es sich nicht um Wildstammkontaminationen.

In zwei der drei Primärtransformanden wurde das Cosmid #42B8 integriert. Sie erhielten die Bezeichnung *PaDnm1_Rev1* und *PaDnm1_Rev2*. Die Transformande *PaDnm1_T3* zeigte keine *PaDnm1*-spezifischen Signale (Abb. 32 A). Möglicherweise hatte sie das Cosmid wieder verloren. Um zu verifizieren, dass es sich bei den anderen Isolaten nicht um Wildstamm-Kontaminationen handelt, wurde das Wachstum auf Phleomycin-haltigem BMM überprüft (Abb 32 B). Sowohl *PaDnm1_Rev1* als auch *PaDnm1_Rev2* konnten auf diesem Medium wachsen und wurden somit als positiv bestätigt. Die mitochondriale Morphologie der beiden unabhängigen Revertanten wurde anschließend fluoreszenzmikroskopisch mit „Mitotracker Red CMXRos“ bestimmt (Abb. 33 A). Beide Stämme zeigen im mittelalten Stadium eine dem Wildstamm „s“ identische Mitochondrienmorphologie. Die extrem elongierten Mitochondrien der *PaDnm1::ble*-Mutante (siehe Abb. 30) treten nicht mehr auf.

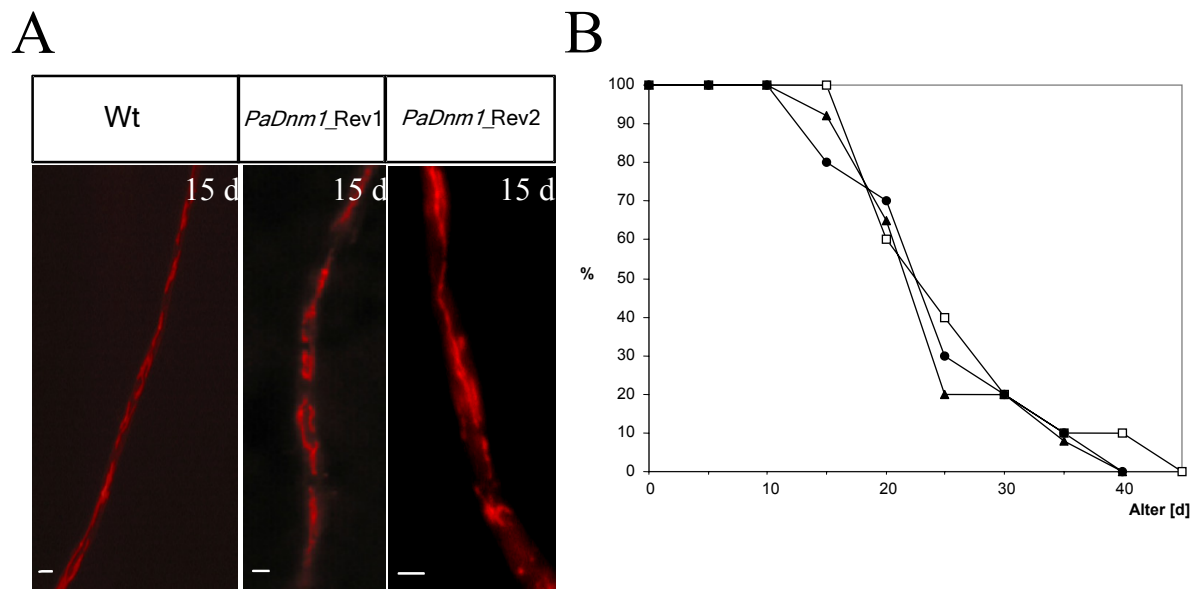


Abb. 33: Charakterisierung der Mitochondrienmorphologie und der Lebensspannen von *PaDnm1_Rev1* und *PaDnm1_Rev2*. (A) Die jeweiligen Isolate wurden auf Objektträgern, deren zentrale Mulde mit BMM:1% Agarose (1:1) gefüllt war, für einen Tag in einer Feuchtekammer bei 27 °C angezogen. Zur Färbung der Mitochondrien wurde eine 1 µM Lösung „Mitotracker Red CMXRos“ (Molecular Probes) auf die Myzelien pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} 515-560 nm, λ_{em} > 590 nm) analysiert. Die Mitochondrienmorphologie der Revertanten ist mit der des Wildstammes vergleichbar. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 2 µm. (B) Die mittlere Lebensspanne von Nachkommen der Revertanten *PaDnm1_Rev1* (□, n=10) und *PaDnm1_Rev2* (●, n=10) und der Wildstamm „s“-Isolate (▲, n=12) ist nahezu identisch (jeweils ~ 23 Tage) (u-Test, $p > 0,05$).

PaDnm1_Rev1 und *PaDnm1_Rev2* wurden durch Kreuzung mit *PaDnm1::ble* und Selektion der Revertanten-Nachkommen (durch Wachstumstest auf Hygromycin B-haltigem Medium) regeneriert. Die mittlere Lebensspanne dieser Isolate wurde bestimmt und ist identisch mit der von Wildstamm „s“-Isolaten (Abb. 37 B). Die Analysen der Revertanten belegen somit, dass sowohl die Elongation der Mitochondrien als auch die markante Lebensspannenverlängerung in den *PaDnm1::ble*-Isolaten durch die gezielte Deletion von *PaDnm1* hervorgerufen werden.

5.3.3.5 Phänotypische Charakterisierung von *PaDnm1::ble* (I): Myzelmorphologie, Wachsrates, Fertilität, Sporenkeimung und Mitochondriensegregation während der Ascosporengese

In weiteren Analysen sollte untersucht werden, ob weitere phänotypische Parameter in *PaDnm1::ble* durch die *PaDnm1*-Deletion beeinflusst sind. Für die vergleichende phänotypische Analyse wurden mittelalte Wildstämme (15 d) und *PaDnm1::ble*-Isolate (110 d) eingesetzt. Zur Bestimmung der Pigmentierung und der Ausbildung von Luftmyzel wurden Myzelstücke von Wildstamm „s“ und *PaDnm1::ble* auf Platten mit BMM für zehn Tage bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert (Abb. 34 A). Zwischen den Isolaten bestehen keine Unterschiede. Die Wachsrates auf BMM-Platten entspricht ebenfalls der des Wildstammes „s“ (0,6 cm/d). Dies trifft auch auf die männliche (Zahl der Spermastien [$6,2 \times 10^5/\text{ml}$]) und weibliche (Zahl der gebildeten Perithezien nach Befruchtung mit Wildstamm „s“-Spermastien [$103 \text{ Perithezien}/\text{cm}^2$]) Fertilität zu (Abb. 34 B). Im Alter von 110 Tagen ist die physiologische „Fitness“ von *PaDnm1::ble* somit gegenüber mittelalten Wildstämmen nicht beeinträchtigt.

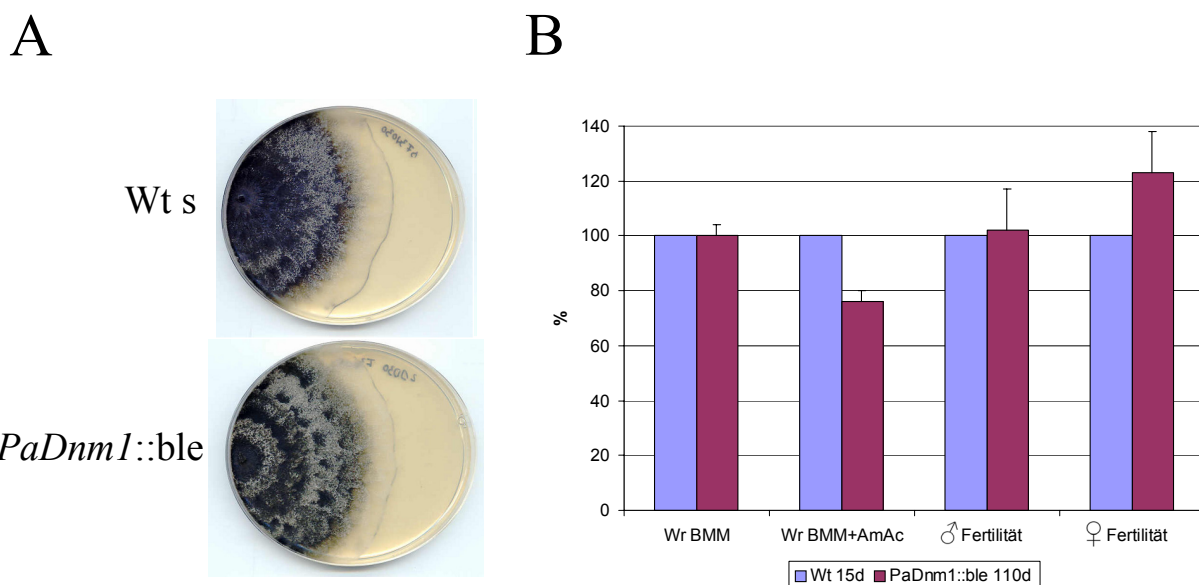


Abb. 34: Phänotypische Charakterisierung des *PaDnm1*-Deletionsstammes *PaDnm1::ble*. (A) Myzelien von Wildstamm (Wt) „s“ und *PaDnm1::ble* wurden auf BM-Medium für zehn Tage bei 27 °C im Dauerlicht inkubiert. Hinsichtlich der Myzelmorphologie und -pigmentierung bestehen keine Unterschiede zwischen den Ansätzen. **(B)** Vergleich der Wachsrates auf BM-Medium (Wr BMM) (n = jeweils 20), BM-Medium mit 60 mM Ammoniumazetat (Wr BMM+AmAc) (n = jeweils 10) und der männlichen (n = jeweils 10 Isolate) und weiblichen Fertilität (n = jeweils 5 Kreuzungen) zwischen mittelalten Isolaten vom Wildstamm (15 Tage, blaue Balken) und *PaDnm1::ble* (110 Tage, dunkelrote Balken). Die Balken geben den Mittelwert \pm Standardfehler an. Die Wachsrates der *PaDnm1::ble*-Stämme auf BMM+AmAc beträgt $\sim 75\%$ der Wildstammisolate (u-Test, $p < 0,01$). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Ansätzen sind nicht erkennbar (u-Test, $p > 0,05$). Wt „s“ (100 %): Wr BMM = 0,6 cm/d, Wr BMM+AmAc = 0,9 cm/d, männliche Fertilität = $6,2 \times 10^5$ Spermastien/ml, weibliche Fertilität = $103 \text{ Perithezien}/\text{cm}^2$.

Im Gegensatz zu langlebigen *P. anserina*-Mutanten wie z. B. *grisea* (Prillinger und Esser, 1977), *ex1* (Kück et al., 1985), *PaCox5::ble* (Dufour et al., 2000) und *PaCox17::* (Stumpferl et al., 2004) zeigt *PaDnm1::ble* keine physiologischen Beeinträchtigungen auf BM-Medium. Die Mutante ist jedoch sensitiv gegenüber Ammoniumazetat (AmAc), das normalerweise der Sporenkeimung dient (Abb. 35). *PaDnm1::ble*-Sporen sind nicht in der Lage, auf BMM+AmAc zu keimen. Dagegen beträgt die Keimungsrate von Sporen des Wildstammes „s“ im Mittel 90 %. Auf un-supplementiertem Medium ist die Keimungsrate der *PaDnm1::ble* Sporen im Mittel jedoch deutlich höher (50 %) als beim Wildstamm „s“ (10 %) (Abb. 35). Die Wachsrates von Myzelien, die auf BMM+AmAc überimpft wurden, ist bei *PaDnm1::ble*-Isolaten mit 0,6 cm/d ebenfalls deutlich gegenüber den Wildstamm „s“-Isolaten (0,9 cm/d) erniedrigt (Abb. 34 B). Bisher ist nicht bekannt, warum *PaDnm1::ble* sensitiv gegenüber AmAc im Medium ist (siehe Diskussion).

Bei diploiden *S. cerevisiae*-Stämmen, in denen *ScDnm1* deletiert wurde, konnte, unabhängig von Zusatzstoffen im Medium, eine stark erhöhte Zahl nicht lebensfähiger Ascosporen beobachtet werden (Gorsich und Shaw, 2004). Um zu analysieren, ob bei *PaDnm1::ble* ein ähnlicher Effekt vorliegt, wurden unreife Asci von Wildstamm „s“ *mat+* x Wildstamm „s“ *mat-* bzw. *PaDnm1::ble mat+* x *PaDnm1::ble mat-*-Kreuzungen fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 36).

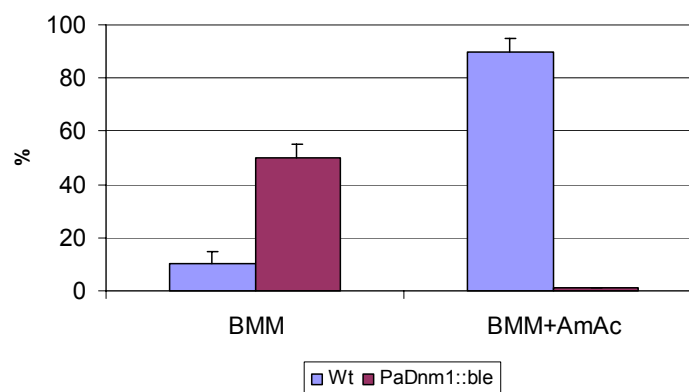


Abb. 35: Analyse der Keimungsfähigkeit von Ascosporen des Wildstammes „s“ (Wt) und der *PaDnm1::ble*-Mutante. Jeweils 50 Ascosporen wurden aus einer Wildstamm *mat-* x Wildstamm *mat+*- und einer *PaDnm1::ble mat-* x *PaDnm1::ble mat+*-Kreuzung isoliert. Die Sporenkeimung von je 25 Sporen der beiden Stämme wurde auf mit 60 mM Ammoniumazetat supplementiertem BMM (BMM+AmAc) und Standard-BMM (BMM) nach dreitägiger Inkubation bei 27 °C im Dunkeln bestimmt. Das Experiment wurde zwei mal wiederholt. Die Balken geben den Mittelwert \pm Standardabweichung an. Im Gegensatz zum Wt können *PaDnm1::ble*-Sporen nicht auf BMM+AmAc keimen. Auf BMM hingegen ist die Keimungsrate bei *PaDnm1::ble* signifikant höher (50 %) als beim Wt (nur 10 %) (u-Test, $p < 0,01$).

Die in den unreifen Asci enthaltenen Sporen verfügen in den meisten Fällen noch nicht über eine Zellwand und sind daher der Behandlung mit Fluoreszenzfarbstoffen zugänglich. Als Mitochondrienfarbstoff diente DASPMI, weil dieser in Abhängigkeit vom mitochondrialen

Membranpotenzial quantitativ aufgenommen wird. Mitochondrien, die in ihrer Funktion eingeschränkt sind, werden schwächer gefärbt. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Präparaten. In beiden Fällen treten neben Asci, in denen die Sporen homogen gefärbt sind (Abb. 36 A, C), auch Asci mit heterogen gefärbten Meioseprodukten auf (Abb. 36 B, D, E). Einzelne Mitochondrien sind nicht erkennbar. Hier liegt vermutlich eine ähnliche Situation wie in Sporen von *S. cerevisiae* vor, in denen in späten oder reifen Tetradenstadium die Mitochondrien, unabhängig von Proteinen der mitochondrialen Teilung, bis zur Keimung der Sporen stark fragmentiert erscheinen (Miyakawa et al., 1984; Gorsich und Shaw, 2004) (siehe Diskussion). Zusammenfassend zeigen die Befunde, dass die Mitochondriensegregation während der Ascosporengese in *PaDnm1::ble* nicht wie im Fall der $\Delta ScDnm1/\Delta ScDnm1$ -Mutante von *S. cerevisiae* negativ beeinflusst ist.

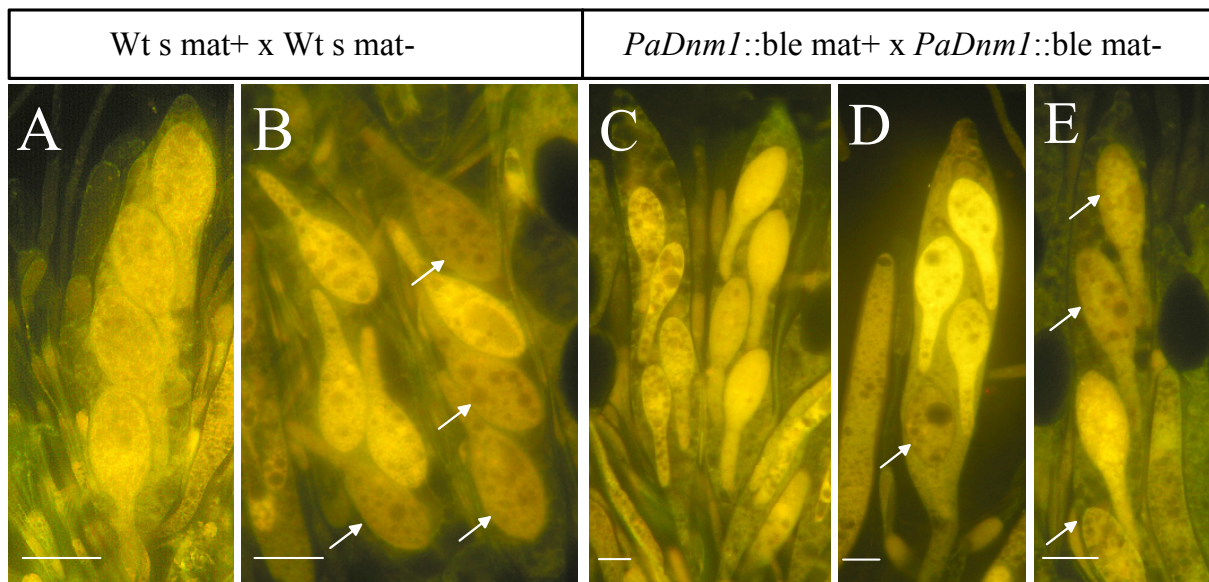


Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopische Analyse zur Mitochondriensegregation während der Ascosporengese in Wildstamm „s“ (Wt s [A, B]) und der *PaDnm1::ble*-Mutante (C-E). Unreife Perithezien der angegebenen Kreuzungen wurden zunächst aufpräpariert. Anschließend folgte die Überführung des Perithezieninhalts (d.h. unreife Asci) auf einen Objektträger. Zur Färbung der Mitochondrien während der Ascosporengese wurde eine DASPMI-Lösung (25 µg/ml) auf die Präparate pipettiert. Nach kurzer Inkubationszeit (2 min) wurden die Ansätze mit einem Fluoreszenzmikroskop (λ_{ex} 450-490 nm, λ_{em} > 515 nm) analysiert. In beiden Kreuzungen sind in gleichem Ausmaß unreife Asci zu beobachten, in denen eine oder mehrere Sporen schwächer gefärbt sind als andere im selben Ascus (B, D, E, weiße Pfeile). Die Mitochondriensegregation während der Ascosporengese ist in *PaDnm1::ble* demnach nicht gegenüber dem Wildstamm eingeschränkt. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils einer Länge von 20 µm. mat+ = Kreuzungstyp „plus“, mat- = Kreuzungstyp „minus“

5.3.3.6 Phänotypische Charakterisierung von *PaDnm1::ble* (II): mtDNA-Stabilität, Zusammensetzung der Atmungskette und ATP-Gehalt

Neben den bereits erwähnten Defekten der Mitochondriensegregation während der Acosporengese zeigen $\Delta ScDnm1$ -Hefemutanten insbesondere auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen Defekte in der Stabilität der mitochondrialen DNA (Hanekamp et al., 2002). Zur Prüfung der mtDNA-Integrität bei *P. anserina* wurde eine Southern-blot-Analyse mit Gesamt-DNA von *PaDnm1::ble*-Isolaten in verschiedenen Altersstadien durchgeführt (Abb. 37). Die Methodik ist hierbei identisch zu der in Kap. 5.3.2.5 vorgestellten Untersuchung (siehe Abb. 21). Wie bereits beschreiben, unterliegt die mtDNA im Wildstamm Instabilitäten, wobei die reorganisationsfördernde pDNA insbesondere in seneszenten Kulturen in stark amplifizierter Form vorliegt (Abb. 21, 37). In den juvenilen (4 Tage) und mittelalten (15 Tage bzw. 65 Tage) Isolaten des *PaDnm1*-Deletionsstammes ist jedoch keine pDNA im Rahmen der Southern-blot-Analyse nachweisbar. Darüber hinaus wird in nur zwei von vier analysierten seneszenten *PaDnm1::ble*-Stämmen überhaupt pDNA gebildet (Abb. 37). Nicht reorganisierte mtDNA ist in diesen Isolaten quantitativ vergleichbar mit dem juvenilen und mittelalten Stadium vorhanden.

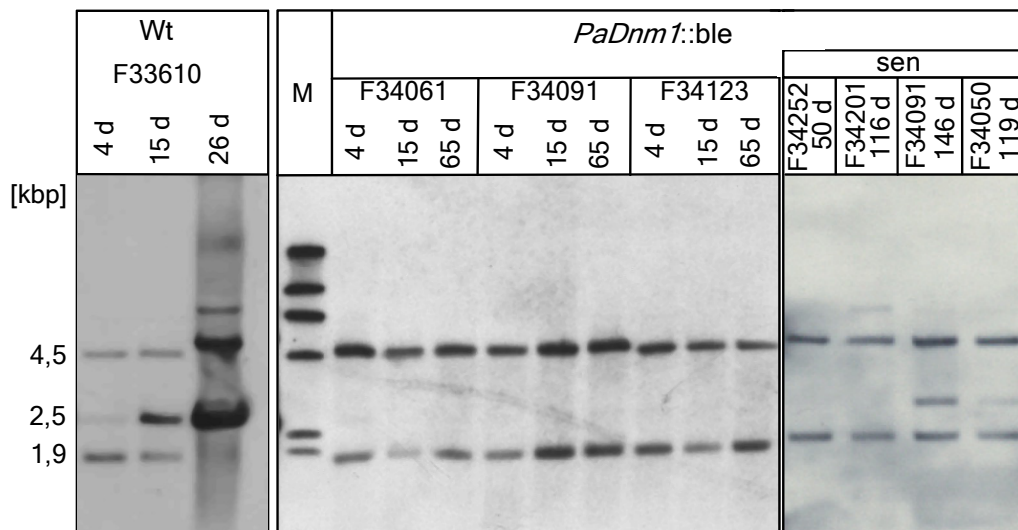


Abb. 37: Vergleichende Analyse der altersabhängigen mtDNA-Reorganisation in Wildstamm „s“ (Wt) und der *PaDnm1::ble*-Mutante. Jeweils 300 ng Gesamt-DNA von Wildstamm s und *PaDnm1::ble*-Isolaten wurde mit *Bgl*II restringiert und auf einem 1 % Agarose-TAE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Fragmente auf eine Nylonmembran erfolgte die Hybridisierung über Nacht mit einer DIG-markierten Sonde gegen die Sequenz des ersten Introns des mitochondrialen *PaCoxI*-Gens (2,5 kbp *Sal*I-Fragment des Plasmids pSP17 [Stahl et al., 1982]) in „High-SDS“-Puffer bei 65 °C. Die Stringenzwaschungen wurden 10 min in 0,1 x SSC, 0,1 % SDS bei 68 °C durchgeführt. Im Gegensatz zum Wt zeigen die *PaDnm1::ble*-Stämme in den meisten Fällen keine altersabhängige Zunahme der pDNA (Signal bei 2,5 kbp). Lediglich in den seneszenten Isolaten *PaDnm1::ble* F34091 und *PaDnm1::ble* F34050 ist eine geringe Menge pDNA nachweisbar. Die Menge an nicht reorganisierter mtDNA (Signale bei 4,5 und 1,9 kbp) bleibt in allen *PaDnm1::ble*-Isolaten während des Alterns konstant.

Diese Befunden zeigen, dass die altersabhängige Bildung von pDNA in *PaDnm1::ble* unterdrückt ist. Dies ist ein Merkmal vieler langlebiger *P. anserina*-Mutanten (z. B. *grisea* [Prillinger und Esser, 1977], *ex1* [Kück et al., 1985], *PaCox5::ble* [Dufour et al., 2000] und *PaCox17::ble* [Stumpferl et al., 2004]). Stabilitätsdefekte der mtDNA wie in einer $\Delta ScDnm1$ -Mutante von *S. cerevisiae* (Hanekamp et al., 2002) konnten nicht beobachtet werden. Möglicherweise trägt die hohe mtDNA-Stabilität in *PaDnm1::ble* zur Langlebigkeit dieser Mutante bei, da auf diese Weise auch in späteren Lebensstadien die genetische Information für das „Recycling“ beschädigter Untereinheiten respiratorischer Komplexe, die vom Chondriom kodiert werden, zur Verfügung steht. Daher wurden zur Analyse der Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette in juvenilen und seneszenten Isolaten von Wildstamm „s“ und *PaDnm1::ble* BN-PAGE und „in Gel“-Aktivitätsassays durchgeführt (Abb. 38). Die Methodik ist hierbei identisch zu der in Kap. 5.2 vorgestellten Untersuchung.

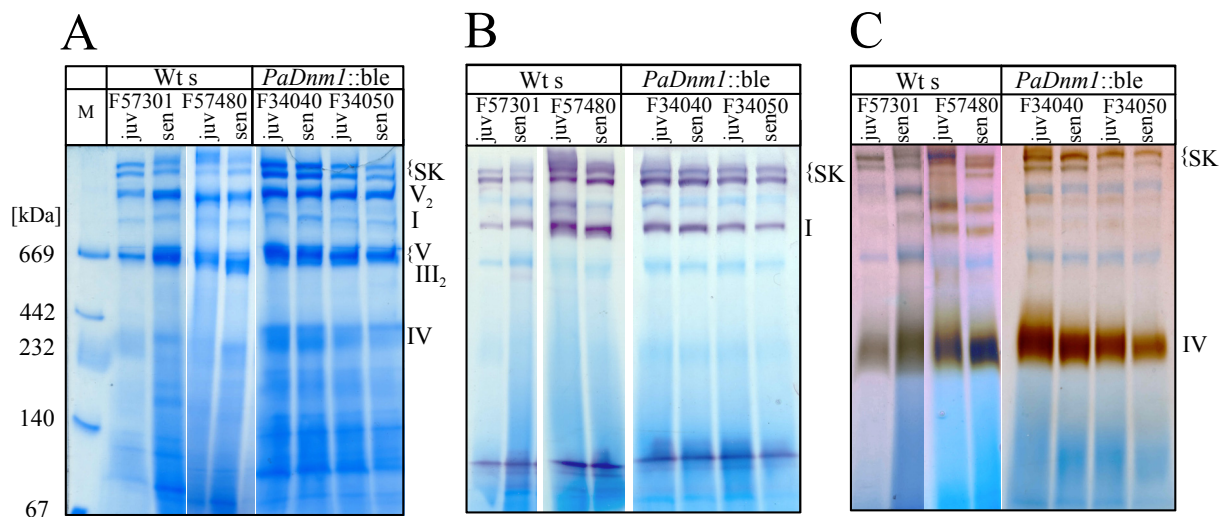


Abb. 38: Analyse altersabhängiger Veränderungen der mitochondrialen Atmungskette von Wildstamm „s“ (Wt s) und der *PaDnm1::ble*-Mutante mit BN-PAGE und „in Gel“-Aktivitätsassays. Nach Isolation der Mitochondrien wurde eine Solubilisierung der Membranproteine mit Digitonin (Massenverhältnis 4:1 [Digitonin:Protein]) durchgeführt. Die Auftrennung der Solubilisate (jeweils 100 µg) erfolgte in BN-Gelen (Sammelgel: 3,5 %, Trenngel: 4-13 %). (A) Zur Proteinfärbung eines der Gele wurde Coomassie Blau G 250 verwendet. Sowohl die Wildstamm- als auch die *PaDnm1::ble*-Isolate zeigen keine signifikanten Veränderungen der Atmungskettenzusammensetzung während des Alterns. Sowohl die Wildstamm- als auch die *PaDnm1::ble*-Isolate zeigen im (B) NADH-Dehydrogenase- und (C) Cytochrom-c-Oxidase-Assay keine signifikanten Aktivitätsunterschiede während des Alterns. SK = Superkomplexe, I = Komplex I, III₂ = Komplex III (Dimer), IV = Komplex IV, V = Komplex V (Monomer), V₂ = Komplex V (Dimer), M = Größenstandard („High molecular weight calibration kit for native electrophoresis“ [Amersham], 5 µg)

In sämtlichen Isolaten sind in Coomassie-gefärbten Gelen neben den Komplexen I, III (Dimer), IV und V (Monomer und Dimer) Superkomplexbanden erkennbar (Abb. 38 A). Aufgrund ihrer molekularen Größe und der positiven NADH-Dehydrogenase- und COX-

Färbungen handelt es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_2$. Deutliche Unterschiede zwischen juvenilen und seneszenten Isolaten sind weder in den Wildstamm- noch in den *PaDnm1::ble*-Isolaten erkennbar. Aufgrund der im Wildstamm ablaufenden Reorganisationen der mtDNA wurde erwartet, dass dieser im seneszenten Stadium quantitative und qualitative Beeinträchtigungen hinsichtlich der Atmungskettenkomponenten zeigt. Möglicherweise werden durch die Mitochondrienisolation bzw. die Solubilisierung der Proben nur intakte Proteinkomplexe erfasst. Die Analysen zeigen jedoch, dass die veränderte Morphologie in *PaDnm1::ble* keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette hat. Möglicherweise ist daher die Fähigkeit zur ATP-Synthese in alten *P. anserina*-Stämmen nicht eingeschränkt. Um dies zu überprüfen, wurde die Bestimmung der Gesamt-ATP-Menge in juvenilen und seneszenten Isolaten von Wildstamm „s“ und *PaDnm1::ble* durchgeführt (Abb. 39).

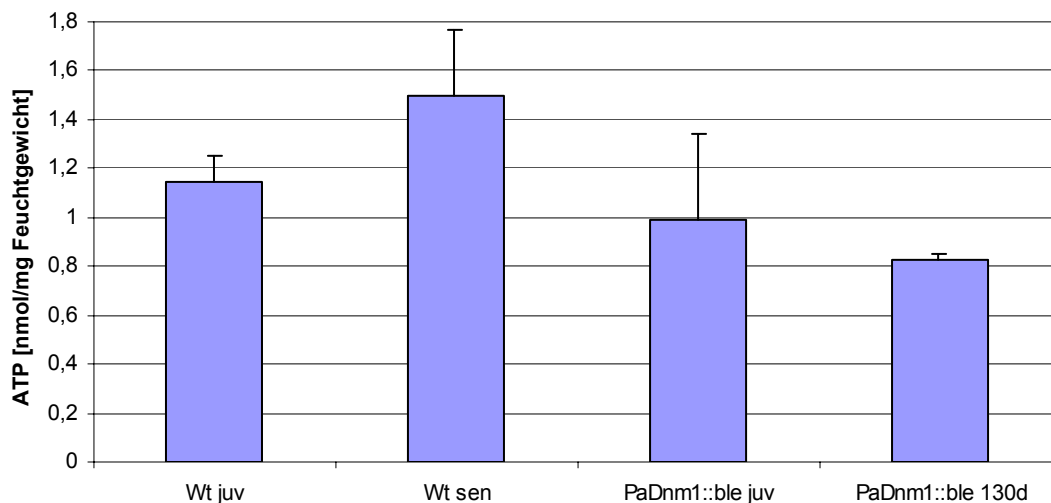


Abb. 39: Bestimmung des ATP-Gehalts in unterschiedlich alten Wildstamm „s“ (Wt)- und *PaDnm1::ble*-Isolaten. Zur ATP-Bestimmung in Myzelpellets (100 mg) der jeweiligen Ansätze wurde ein luminometrischer Assay („ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ [Roche]) durchgeführt. Es wurden jeweils drei Myzelpellets von drei unabhängigen Stämmen dreifach gemessen. Die Balken geben den jeweiligen Mittelwert der Messung \pm Standardfehler an. Zwischen den einzelnen Ansätzen bestehen keine signifikanten Unterschiede (t-Test, $p > 0,05$).

In Puffer aufgenommene Myzelpellets (100 mg) der jeweiligen Proben wurden durch Kochen und Zerreiben mit Glasperlen aufgeschlossen. Der ATP-Gehalt von Aliquots der Überstände wurde luminometrisch mit einem Kit („ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ [Roche]) bestimmt. Für alle Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 39). Die hier vorgestellte Methode wird ursprünglich zur Messung von ATP in *C. elegans* eingesetzt. Prinzipiell ist es demnach möglich, ATP in *P. anserina*-Proben nachzuweisen, obwohl das Protokoll hierfür zu optimieren ist (siehe Diskussion).

5.3.3.7 Phänotypische Charakterisierung von *PaDnm1::ble* (III): Freisetzung von Superoxid und Wasserstoffperoxid

Neben der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung sind die Mitochondrien der „Mitochondrialen Alternstheorie“ nach vor allem durch die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) an akkumulierenden zellulären Schäden beteiligt (Harman, 1972). Durch Myzelfärbungen nach Munkres (1990) sollte daher die Freisetzung von Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in verschiedenen Altersstadien von Wildstamm „s“ und *PaDnm1::ble* untersucht werden. Zusätzlich wurde die langlebige Kupfermangelmutante *grisea* untersucht, die über keine nachweisbare Aktivität der CuZnSOD (in Cytoplasma und mitochondrialem Intermembranraum) und MnSOD (in der mitochondrialen Matrix) verfügt (Borghouts et al., 2001; Borghouts et al., 2002b). Zum Nachweis der Superoxidfreisetzung wurden die Myzelien mit einer NBT-haltigen Lösung überschichtet (Abb. 40 B). Superoxid-anionen vermögen NBT zu reduzieren, sodass ein violette Präzipitat an Orten der O_2^- -Freisetzung entsteht (Abb. 40 A).

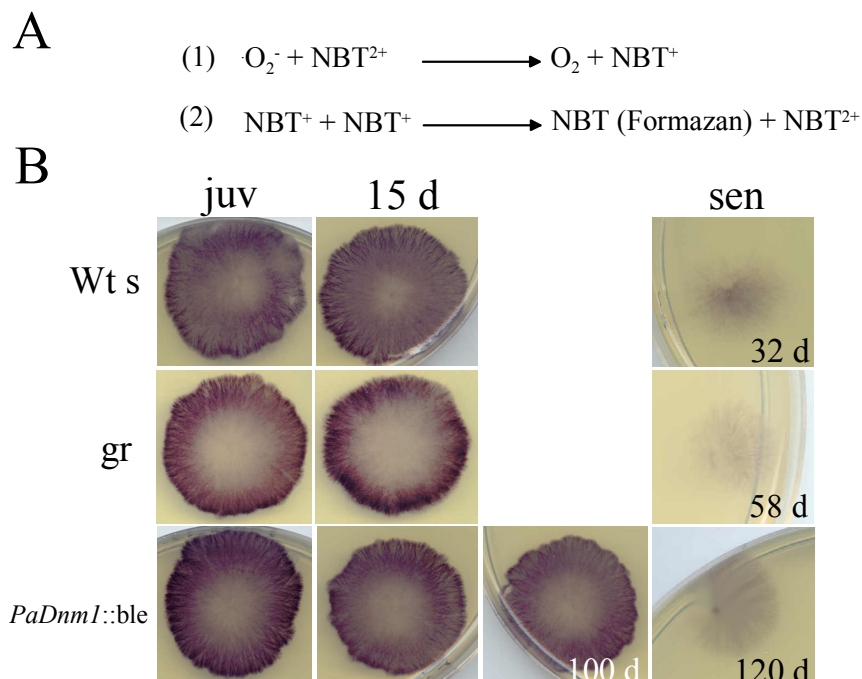


Abb. 40: Bestimmung der Superoxid (O_2^-)-Freisetzung in unterschiedlichen Altersstadien im Wildstamm „s“ (Wt s) und den langlebigen Mutanten *grisea* (gr) und *PaDnm1::ble*. (A) Freigesetztes Superoxid führt zur Bildung eines violetten Niederschlags (Formazan) auf dem Myzel durch Reduktion von Nitroblautetrazolium (NBT) (Reaktionsschritt 1) und anschließender Disproportionierung zweier NBT^+ -Ionen (Reaktionsschritt 2). (B) Die Anzucht der Isolate erfolgte auf synthetischem Medium (M2) für drei Tage bei 27 °C im Dunkeln, um die Pigmentierung des Myzels zu verringern. In den seneszenten Stadien zeigen sämtliche Isolate eine sehr schwache O_2^- -Freisetzung. Ansonsten deuten die Färbungen auf eine starke Superoxidsezerneung, vor allem in den peripheren Bereichen des Myzels, hin.

Die juvenilen und 15 Tage alten Isolate des Wildstammes „s“ und der Mutanten *grisea* und *PaDnm1::ble* zeigen insbesondere im peripheren Bereich der jeweiligen Kultur eine starke NBT-Präzipitation. Dies gilt auch für das 100 Tage alte *PaDnm1::ble*-Isolat. Die seneszenten Myzelien weisen dagegen nur eine schwache Färbung auf (Abb. 40 B). Wachsende Myzelien der untersuchten Stämme sind demnach durch eine starke Freisetzung von Superoxidanionen charakterisiert, während seneszente Isolate, die ihr Wachstum nahezu eingestellt haben, nur eine wesentlich geringe O_2^- -Menge sezernieren (Abb. 40 B). Möglicherweise ist die Freisetzung von Superoxidanionen für das Wachstum von *P. anserina* notwendig (siehe Diskussion).

Im Gegensatz dazu zeichnen sich seneszente Kulturen des Wildstammes „s“ und der *PaDnm1::ble*-Mutante durch eine extrem hohe Produktion von Wasserstoffperoxid aus (Abb. 41 B).

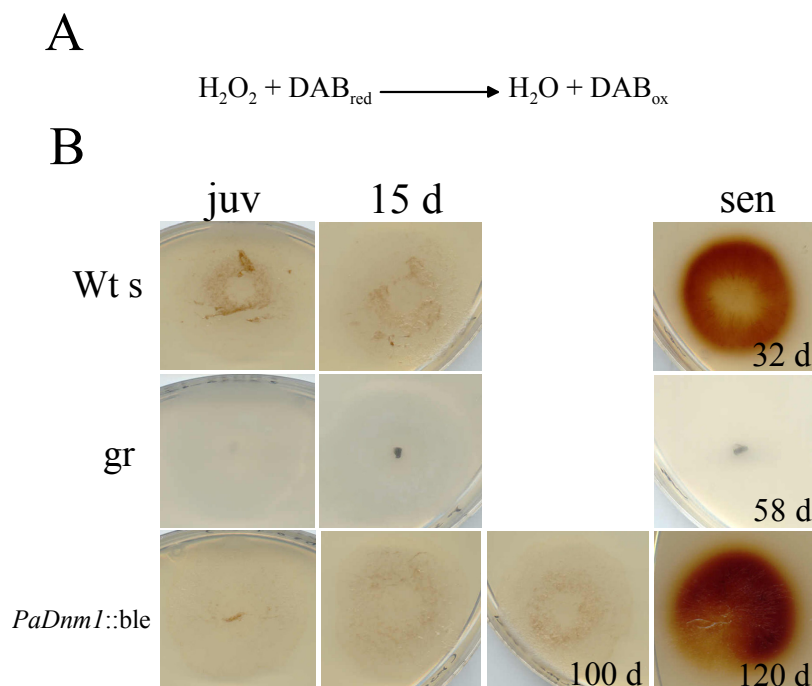


Abb. 41: Bestimmung der H_2O_2 -Freisetzung in unterschiedlichen Altersstadien im Wildstamm „s“ (Wt s) und den langlebigen Mutanten *grisea* (gr) und *PaDnm1::ble*. (A) Freigesetztes H_2O_2 führt zur Bildung eines bräunlichen Niederschlags auf dem Myzel durch Oxidation von Diaminobenzidin (DAB). (B) Die Anzucht der Isolate erfolgte auf synthetischem Medium (M2) für drei Tage bei 27 °C im Dunkeln, um die Pigmentierung des Myzels zu verringern. Nur im seneszenten Stadium zeigen die Isolate vom Wildstamm und *PaDnm1::ble* eine starke H_2O_2 -Freisetzung. Die Färbung des 100 Tage alten *PaDnm1::ble*-Isolats ist vergleichbar mit den entsprechenden juvenilen und 15 Tage alten Stadien. Mutante *grisea* zeigt während des Alterns keine Freisetzung von H_2O_2 .

Aus den Myzelien freigesetztes H_2O_2 oxidiert das in der Nachweislösung befindliche Diaminobenzidin (DAB), welches ein braunes, unlösliches Polymerisat bildet (Abb. 41 A) (Munkres, 1990). Juvenile und 15 Tage alte Isolate von Wildstamm „s“ und *PaDnm1::ble* zeigen nur eine sehr schwache Färbung (Abb. 41 B). Das 100 Tage *PaDnm1::ble*-Isolat zeigt

eine dem entsprechenden 15 Tage alten Isolat vergleichbare Menge an präzipitiertem DAB. In Mutante *grisea* kann dagegen kein freigesetztes H_2O_2 nachgewiesen werden. Im Wildstamm und in *PaDnm1::ble* ist somit neben der in Kap. 5.1 beschriebenen mitochondrialen Fragmentierung ein starker Anstieg der freigesetzten H_2O_2 -Menge ein weiterer, bisher nicht beschriebener, Seneszenzmarker.

Zusammenfassend zeigten die an der *PaDnm1::ble*-Mutante gewonnenen Daten, dass die Kontrolle der mitochondrialen Dynamik den Alterungsprozess in *P. anserina* maßgeblich beeinflusst. Entscheidend und neuartig hierbei ist, dass die Lebensverlängerung nicht mit den physiologischen Defekten einhergeht, wie sie in anderen langlebigen Mutanten beobachtet wird.

6. Diskussion

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung der Mitochondrien für den Alterungsprozess des Ascomyzeten *P. anserina* näher charakterisiert werden. Eine Strategie zur experimentellen Behandlung dieses Themas ist die Untersuchung langlebiger bzw. unsterblicher Mutanten. Auf diese Weise können Faktoren identifiziert werden, die für den Alterungsprozess des Wildstammes von entscheidender Bedeutung sind.

Die Atmungsketten von Wildstamm „s“ und der unsterbliche Mutante ex1 sind durch funktional unterschiedliche Komponenten charakterisiert

Durch BN-PAGE konnten verschiedene Komponenten der Atmungskette von Wildstamm „s“ aufgetrennt werden (Kap. 5.2, siehe Abb. 7). Die Komplexe I (NADH:Ubichinon-Dehydrogenase), III (Cytochrom-c-Reduktase, dimere Form), IV (Cytochrom-c-Oxidase) und V (ATP-Synthase, monomere und dimere Form) wurden durch folgende Analysen identifiziert: (i) Vergleich mit den in der Arbeit von Krause et al. (2004a) vorgestellten Daten, (ii) Größe der Proteinkomplexe im BN-Gel und (iii) „in Gel“-Aktivitätsassays (zum Nachweis von NADH-DH und COX-Aktivität). Neben diesen Bestandteilen der Atmungskette wurden auch so genannte Superkomplexe erhalten. Hierbei handelt es sich vermutlich um $I_1III_2IV_1$ und $I_1III_2IV_2$. Die Stöchiometrie dieser Superkomplexe ist jedoch nicht gesichert, da die Identifizierung lediglich anhand der Größe und des Färbeverhaltens in den Aktivitätsassays erfolgte. Mit Hilfe der 2D-SDS-PAGE ist es möglich, sämtliche Untereinheiten der Superkomplexe aufzutrennen (Schägger und Pfeiffer, 2000). Durch die densitometrische Analyse der erhaltenen Proteinsignale („spots“) kann anschließend die exakte Zusammensetzung der Superkomplexe bestimmt werden. Neben der Quantifizierung können einzelne Untereinheiten aus dem 2D-SDS-Gel eluiert und nach tryptischem Verdau mit massenspektrometrischen Methoden wie z. B. MALDI/TOF identifiziert werden. Auf diesem Weg wurden bereits mehrere *P. anserina*-Atmungskettenproteine wie z. B. PaCOX2 und PaCOX5 bestimmt (Krause et al., 2004a). Im Gegensatz zur COX-abhängigen Atmung im Wildstamm „s“ verläuft in der unsterblichen Mutante ex1 die Endoxidation über die alternative Oxidase (PaAOX). In dieser Mutante fehlt durch eine umfangreiche Deletion in der mtDNA das für die COX-Funktionalität entscheidende Gen *PaCoxI* vollständig (Schulte et al., 1988; Borghouts et al., 2001). Die Atmungskette von ex1 unterscheidet sich daher von der des Wildstammes „s“ hinsichtlich der enzymatischen Ausstattung. In der vorliegenden Arbeit

wurden die respiratorischen Komplexe I, III (Dimer) und V (monomere bzw. dimere Form) in mitochondrialen ex1-Solubilisaten nachgewiesen. Durch BN-PAGE/2D-SDS-PAGE lassen sich noch weitere Komponenten erhalten: Komplex I (als Dimer), I₁III₂ und I₂III₂ (Krause et al., 2004a). Mutante ex1 enthält jedoch eine große Menge an Komplex III (siehe Abb. 7). Innerhalb der AOX-abhängigen Atmung dieser Mutante ist Komplex III nicht am Transport der Elektronen beteiligt, da diese direkt vom Semiubichinol auf Sauerstoff übertragen werden (Palmer, 1976). Darüber hinaus ist die spezifische Aktivität von Komplex III in mitochondrialen Präparationen von ex1 wesentlich niedriger als beim Wildstamm „s“ (siehe Abb. 8). Möglicherweise übernimmt Komplex III weitere essenzielle Funktionen. In Pflanzen wurde gezeigt, dass die „Core“-Untereinheiten I und II von Komplex III homolog zur mitochondrialen Prozessierungspeptidase sind, die die Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids während des Imports von Proteinen aus dem Cytoplasma durchführt (Braun und Schmitz, 1995). In dem zu *P. anserina* nahe verwandten Ascomyzeten *Neurospora crassa* ist die β -Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungspeptidase identisch mit der „Core“-Untereinheit I von Komplex III, wobei allerdings die proteolytische Aktivität löslich in der Matrix vorliegt (Schulte et al., 1989; Arretz et al., 1994). Weiterhin könnte Komplex III auch für die Assemblierung bzw. Stabilität von anderen Komponenten der Atmungskette von Bedeutung sein. Beim Menschen führen z. B. Defekte des *Cytb*-Gens zu einer Verringerung von vollständig assembliertem Komplex III, wobei auch der Komplex I-Gehalt beeinträchtigt ist (Schägger, 2001). In der Mutante ex1 könnte durch Deletion eines essenziellen Komplex III-Gens die Assemblierung dieses Komplexes unterbunden werden. Wenn Komplex III wichtig für Komplex I ist, sollte der Gehalt der NADH:Ubichinon-Dehydrogenase in dem Deletionsstamm erniedrigt sein. Bei starkem Mangel bzw. vollständigem Fehlen von Komplex I sind die Transformanden jedoch wahrscheinlich nicht lebensfähig, da in ihnen ausschließlich die NADH:Ubichinon-Dehydrogenase zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran beiträgt. Die Bedeutung von Komplex I für ex1 wird durch den hohen Gehalt in der Mutante unterstrichen (siehe Abb. 7).

Neben der höheren spezifischen Aktivität von Komplex III im Wildstamm „s“ existieren noch weitere funktionale Unterschiede, die durch enzymkinetische Messungen identifiziert wurden. Die gekoppelte Aktivität der Komplexe I+III in mitochondrialen Solubilisaten des Wildstammes „s“ ist insbesondere nach Zugabe von 50 μ M DBQ deutlich höher als bei der Mutante ex1. Dem gekoppelten Elektronentransfer kommt im Wildstamm „s“ daher eine wesentliche Bedeutung zu, wobei dies in ex1 nicht der Fall ist.

Die erbrachten Befunde deuten somit darauf hin, dass sich wesentliche Komponenten der COX-abhängigen Atmungskette im Wildstamm „s“ (insbesondere Komplex III und Super-

komplexe) funktional deutlich von denen der PaAOX-abhängigen Atmungskette in ex1 unterscheiden.

In seneszenten Isolaten des Wildstammes „s“ und den langlebigen Mutanten grisea und PaDnm1::ble sind die Mitochondrien fragmentiert

Die Mutante ex1 ist gut geeignet für die molekulare Charakterisierung der PaAOX-abhängigen Atmungskette, die Möglichkeit zur Analyse des seneszenten Stadiums bietet sie wegen ihrer Unsterblichkeit jedoch nicht. Die experimentelle Untersuchung der Seneszenzphase ist aber entscheidend für das Verständnis der Grundlagen des Alterns in *P. anserina*. Auf makroskopischer Ebene zeigen seneszente Wildstämme eine Verlangsamung der Wachstumsrate und eine erhöhte Pigmentsynthese (Rizet, 1953). Weiterhin unterbleibt die Ausbildung von Luftmyzel. Durch mikroskopische Analysen wurde belegt, dass seneszente Hyphen dünner als juvenile sind und ein undulierendes („schlägelndes“) Wachstum zeigen, wobei die Hyphenspitzen häufig platzen (Delay, 1963; Esser und Tudzynski, 1980).

Wie bereits erwähnt, spielen die Mitochondrien bei dem Alterungsprozess von *P. anserina* eine entscheidende Rolle (siehe Kap. 1.2.2). Im Gegensatz zu altersabhängigen Reorganisationen der mtDNA, die intensiv untersucht worden sind, ist die Frage, ob die Mitochondrien im Laufe des Alterns morphologischen Änderungen unterliegen, noch weitgehend ungeklärt. Durch TEM-Analysen wurde gezeigt, dass die Cristaemembranen in seneszenten Wildstammmitochondrien weniger stark gefaltet bzw. gänzlich verschwunden sind (Delay et al., 1963). Säugermitochondrien liefern ein ähnliches Bild mit altersabhängigen Degenerationen wie z. B. dem vollständigen Verlust der Cristae (Vanneste und van den Bosch de Aguilar, 1981; Beregi et al., 1988; Jendrach et al., 2005). Die in dieser Arbeit vorgestellten initialen Untersuchungen zur mitochondrialen Ultrastruktur von *P. anserina*-Mitochondrien deuten auf Unterschiede hinsichtlich der Cristae zwischen dem Wildstamm „s“ und der Mutante ex1 hin (siehe Abb. 6). In Mitochondrien von ex1 ist die Zahl der Cristae möglicherweise erniedrigt, außerdem ist hier ihre lamellenartige Anordnung, wie sie in Wildstamm „s“- und grisea-Mitochondrien beobachtet wird, nicht deutlich erkennbar. Zur Absicherung dieser Befunde müssen diese Analysen jedoch mit einer höheren Anzahl von Präparaten wiederholt werden, um z. B. Artefakte durch die Probenvorbereitung (z. B. durch die Fixierung) ausschließen zu können.

Auf lichtmikroskopischer Ebene erscheinen Mitochondrien von filamentösen Pilzen wie z. B. *P. anserina* (Jamet-Vierny et al., 1997), *N. crassa* (Minke et al., 1999), *Aspergillus nidulans* (Suelmann und Fischer, 2000) und *Allomyces macrogynus* (McDaniel und Roberson, 2000)

als kurze, filamentöse Strukturen, die gleichmäßig in den Zellen verteilt und entlang der Hyphenachse angeordnet sind (Übersicht bei: Westermann und Prokisch, 2002). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Kap. 5.1, Abb. 5): In juvenilen und mittelalten Stadien zeigen sowohl der Wildstamm „s“ und die Mutanten *grisea* und *ex1* überwiegend fadenförmige Mitochondrien mit einer durchschnittlichen Länge zwischen ca. 4 und 8 μm (Abschätzung der Länge anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen). Eine exaktere Bestimmung der morphologischen Eigenschaften der *P. anserina*-Mitochondrien mit Hilfe eines konfokalen Laser-„Scanning“-Mikroskops konnte nicht durchgeführt werden, weil sie sich, vermutlich durch die Laserbestrahlung, abkugeln. Eine sphärische mitochondriale Morphologie wird jedoch ebenfalls im Fluoreszenzmikroskop beobachtet, wenn seneszenten Myzel von Wildstamm „s“ und den Mutanten *grisea* und *PaDnm1::ble* analysiert wird (siehe Abb. 5, 30). Der Übergang von einer filamentösen zu einer sphärischen Mitochondrienmorphologie ist ein wichtiges Merkmal im Verlaufe der Apoptose in Säugerzellen (Desagher und Martinou, 2000; Frank et al., 2001; Pinton et al., 2001). Es ist durchaus denkbar, dass *P. anserina* durch eine Apoptoseinduktion im seneszenten Stadium stirbt, obwohl dies bislang nur spekulativ ist. Der programmierte Zelltod spielt auch während des Alterns in Säugern eine entscheidende Rolle, wobei noch unbekannt ist, wodurch er schließlich induziert wird (siehe Kap. 1.2.4) (Kujoth et al., 2005). Die Analyse phänotypischer Parameter wie H_2O_2 -Freisetzung (siehe unten), Mitochondrienfragmentierung und Lebensspanne von *P. anserina*-Stämmen auf Medien, die Apoptoseinhibitoren (wie z. B. Cyclosporin A [Bulut et al., 2005]) enthalten, könnte zur experimentellen Bearbeitung dieser Frage von Nutzen sein. Das Phänomen der Apoptose bei Pilzen wurde bereits u. a. bei *S. cerevisiae* (siehe Kap. 1.3.3) und *A. nidulans* beschrieben (Cheng et al., 2003). Behandlung von *A. nidulans* mit den Sphingoidbasen Dihydrosphingosin und Phytosphingosin führt zu einer Caspase-unabhängigen apoptotischen Reaktion mit Kondensation und Fragmentierung der genomischen DNA und Externalisierung von Phosphatidylserin. Diese Merkmale treten auch bei der Caspase-unabhängigen Apoptose in Säugersystemen auf (Dalla et al., 2001; Lee et al., 2001). *A. nidulans* verfügt offensichtlich über einen Metacaspase-abhängigen Weg der Apoptose, weil die Überexpression des Metacaspasegens *AnCasA* zur Induktion des programmierten Zelltodes führt (Cheng et al., 2003). Weiterführende Untersuchungen zur Rolle von Metacaspasen in der Apoptose von Pilzen wurden in Hefe durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Metacaspase ScYCA1 ein Schlüsselregulator des programmierten Zelltodes in *S. cerevisiae* ist (Madeo et al., 1999). Bemerkenswerterweise wird hierbei ScYCA1-Aktivität durch Wasserstoffperoxid induziert. Ob H_2O_2 eine ähnliche Funktion in *P. anserina* wahrnimmt, ist noch nicht geklärt. Bisher wurden in diesem System zwei Metacaspasegene

identifiziert, *PaMca1* (Silar et al., 2003) und *PaMca2* (Hamann, persönliche Mitteilung), die durch ROS aktiviert werden könnten. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, dass im seneszenten Stadium des Wildstammes und der Mutante *PaDnm1::ble* eine intensive Freisetzung von Wasserstoffperoxid beobachtet wird (siehe Abb. 41). Eine starke ROS-Produktion wird bei vielen Formen der Apoptose beschrieben (Slater et al., 1995). Darüber hinaus sind ROS in Pflanzen- und Hefezellen notwendig und hinreichend, um apoptotische Prozesse in Gang zu setzen (Alvarez et al., 1998; Madeo et al., 1999). Abweichend von dieser Beobachtung zeigen seneszente Stämme der Mutante *grisea* zwar eine Fragmentierung der Mitochondrien, aber keine Freisetzung von Wasserstoffperoxid (siehe Abb. 5, 41). Möglicherweise wird das H₂O₂ im seneszenten Stadium von Wildstamm „s“ und der *PaDnm1::ble*-Mutante durch die Aktivität von Superoxiddismutasen erzeugt. *Grisea* verfügt nicht über CuZnSOD (wegen des Kupfermangels) und MnSOD (*PaSod2* ist ein Zielgen des Transkriptionsfaktors GRISEA) (Borghouts et al., 2001; Borghouts et al., 2002b), sodass hier die Bildung von Wasserstoffperoxid stark eingeschränkt ist. Ebenso wie seneszente Isolate des Wildstammes „s“ und der *PaDnm1::ble*-Mutante verfügt *grisea* im Alter über eine schwache Freisetzung von Superoxid (siehe Abb. 40). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung kommt es in juvenilen und mittelalten Stadien der analysierten *P. anserina*-Stämme zu einer starken $\cdot\text{O}_2^-$ -Bildung. Möglicherweise ist dies ein Charakteristikum im Wachstum befindlicher *P. anserina*-Isolate. In Pflanzen wird Superoxid u. a. durch in der Plasmamembran lokalisierte NADPH-Oxidasen gebildet, um die Zellwandstruktur durch Schneiden von Polysaccharidketten aufzulockern (Fry, 1998; Schopfer, 2001). Diese gezielte Modifikation ist für pflanzliche Wachstumsvorgänge entscheidend. Bisher ist noch nicht erklärt, ob dieser Prozess auch bei Pilzen eine Rolle spielt. In *P. anserina* wurden jedoch zwei NADPH-Oxidasen (PaNOX1 und PaNOX2) charakterisiert, die durch die Bildung von ROS (u.a. Superoxidanionen) eine wichtige Rolle bei zellulären Differenzierungsprozessen (z. B. Protoperithezienbildung) spielen (Malagnac et al., 2004).

Überexpression von PaDnm1 führt zu mitochondrialer Fragmentierung

Durch Homologieanalysen der von dem *PaDnm1*-Gen kodierten Aminosäuresequenz konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Dynamin-verwandtes Protein (PaDNM1) handelt (Tinazli, 2002, diese Arbeit: siehe Abb. 13). Diese Proteine sind für die mitochondriale Teilung wichtig, wobei der genaue Ablauf dieses Prozesses jedoch noch ungeklärt ist (siehe Kap. 1.3.2). In *P. anserina*-Wildstamm „s“ korreliert die Induktion der *PaDnm1*-Transkription mit mitochondrialer Fragmentierung (siehe Abb. 5, 14). Darüber hinaus wird in

juvenilen und mittelalten Wildstammisolaten nahezu keine *PaDnm1*-mRNA in Northern-blot-Analysen detektiert. Erstaunlicherweise zeigt Mutante *grisea* während des Alterns eine konstitutive Transkription von *PaDnm1* (siehe Abb. 14), während sich die Mitochondrienmorphologie wie im Wildstamm von überwiegend kurz filamentös (juveniles und mittelaltes Stadium) hin zu abgekugelt (senescentes Stadium) verändert (siehe Abb. 5). Demnach wird im Fall der Mutante *grisea* keine Korrelation zwischen der *PaDnm1*-Induktion und einer Veränderung der mitochondrialen Morphologie beobachtet. Um dieses Phänomen näher zu untersuchen, könnten z. B. Western-blot-Analysen mit Hilfe von PaDNM1-Antikörpern durchgeführt werden, die bislang jedoch noch nicht zur Verfügung stehen. Möglicherweise wird die *PaDnm1*-Expression posttranskriptionell reguliert, sodass die Transkriptmengen nicht zwangsläufig mit der Menge an PaDNM1 korrelieren. Weiterhin könnte *grisea* erst durch konstitutive *PaDnm1*-Transkription befähigt sein, eine mitochondriale Morphologie wie der Wildstamm zu etablieren. Dies wäre insbesondere dann von Nutzen, wenn dadurch ein putativer Energiemangel aufgrund der PaAOX-abhängigen Atmung zumindest teilweise kompensiert werden könnte. Deletion von *PaDnm1* in der Mutante bzw. Wachstum auf Kupfer-haltigem Medium (Komplementierung des *grisea*-Phänotyps [Marbach et al., 1994]) und anschließende *PaDnm1*-Transkriptanalysen in den verschiedenen Altersstadien sind geeignete experimentelle Ansätze, um dieser Fragestellung zukünftig nachzugehen.

Überexpression von *PaDnm1* führt im Wildstamm „s“ zu einem erhöhten Anteil an fragmentierten Mitochondrien bereits in mittelaltem Myzel (Kap. 5.3.2.3, siehe Abb. 19). Merkmale wie Wachstumsrate, Myzelmorphologie, Fertilität, mtDNA-Reorganisationen und Lebensspanne sind in den beiden unabhängigen Transformanten *PaDnm1_Ex1* und *PaDnm1_Ex2* jedoch nicht beeinflusst. Möglicherweise reicht die durch *PaDnm1*-Überexpression induzierte Fragmentierung der Mitochondrien nicht aus, um physiologische Effekte zu erzielen. Überexpression von *ScDnm1* in *S. cerevisiae* führt ebenfalls lediglich zu einem moderaten Effekt (15 % mehr Hefezellen mit partiell fragmentierten Mitochondrien) (Fukushima et al., 2001). Darüber hinaus kann in Säugerzellen nur durch starke Überexpression des *PaDnm1*-homologen Gens *Drp1* mitochondriale Fragmentierung erreicht werden (Smirnova et al., 1998; Szabadkai et al., 2004). Im Gegensatz dazu reicht schon eine geringe Steigerung der Expression von *hFis1* (siehe Kap. 1.3.2) aus, um in Zellen von Säugern eine starke Fragmentierung zu erreichen (Yoon et al., 2003). Dies funktioniert auch dann, wenn die DRP1-Aktivität durch Expression der dominant-negativen Form *Drp1_{K38A}* eingeschränkt ist. Die Autoren klassifizieren HFIS1 daher als limitierenden Faktor der mitochondrialen Teilung in Säugerzellen (Yoon et al., 2003). Möglicherweise liegt in *P. anserina* ein ähnlicher Sachverhalt vor: Um einen deutlicheren Effekt auf die mitochondriale Morphologie zu

erhalten, müssten in diesem Fall weitere, ansonsten limitierende Faktoren der mitochondrialen Teilung zusätzlich zu *PaDnm1* überexprimiert werden. Alternativ könnte ein Gen der mitochondrialen Fusion in *P. anserina* deletiert werden, wie z. B. *PaFzo1*, das jedoch noch nicht kloniert worden ist. Vorläufige Analysen haben allerdings gezeigt, dass putative Gene für die meisten Faktoren der mitochondrialen Dynamik in der genomischen *P. anserina*-Sequenz enthalten sind (Tab. 2). In *S. cerevisiae* führt die Deletion von *ScFzo1* (Kap. 1.3.2) zu einer starken mitochondrialen Fragmentierung und mtDNA-Verlust, weil das Gleichgewicht der Mitochondriendynamik auf die Seite der Teilung hin verlagert wird (Hermann et al., 1998; Rapaport et al., 1998). Dies könnte z. B. durch eine Southern-blot-Analyse mit Gesamt-DNA von *PaFzo1*-Deletionsstämmen überprüft werden. Wenn die Menge an mtDNA in den transgenen Stämmen ebenfalls abnimmt, wäre ein negativer Effekt auf die Lebensspanne in dem obligaten Aerobier *P. anserina* wahrscheinlich.

Tab. 2: Putative Gene in der genomischen Sequenz von *P. anserina*, die für Faktoren der mitochondrialen Dynamik kodieren. Die Datenbankrecherche wurden mit dem „tblastn“-Algorithmus (Protein vs. DNA) durchgeführt, wobei mit der jeweiligen Aminosäuresequenz der entsprechenden Proteine aus *S. cerevisiae* in der genomischen *P. anserina*-Sequenz nach Homologien gesucht wurde. In allen Fällen konnten putative Kandidaten identifiziert werden, wobei ihre Sequenzen, wie z. B. die N-terminalen Bereiche mit den Startcodons, noch nicht vollständig bekannt sind. Die genomische Sequenz des *P. anserina*-Wildstammes „S“ (Kreuzungstyp „+“) ist im Internet (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/>) veröffentlicht worden.

Putatives Gen	Contig-Nr. der genomischen <i>P. anserina</i> -Sequenz	Homologie zur <i>S. cerevisiae</i> -Sequenz (p-Wert)	Homologer Bereich des Hefeproteins (As-Position)	Größe des Hefeproteins (As)
Teilung:				
<i>PaFis1</i>	691	2e-21	16-155	155
<i>PaMdv1</i>	1603	3e-66	363-712	714
Fusion:				
<i>PaFzo1</i>	287	1e-97	131-853	855
<i>PaMgm1</i>	977	e-146	182-848	881
<i>PaUgol</i>	243	6e-19	230-456	502

PaDnm1-Deletion im Wildstamm „s“ führt zu einer starken Lebensspannenverlängerung ohne Einschränkungen der Wachsrates und Fertilität

Die Deletion des an der mitochondrialen Teilung beteiligten Gens *PaDnm1* führt zu einer starken Beeinflussung der mitochondrialen Morphologie in *P. anserina*. Stark elongierte Mitochondrien durchziehen die Hyphen entlang ihrer Längsachse in juvenilen und mittelalten Stadien der *PaDnm1::ble*-Mutante (siehe Abb. 30). Ihre Länge ist ungefähr um den Faktor 10-15 im Vergleich zu Wildstamm „s“-Mitochondrien erhöht. Hierbei handelt es sich um eine

Abschätzung anhand der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Das Auftreten von vernetzten mitochondrialen Filamenten wird seltener beobachtet (siehe Abb. 30). In anderen Modellsystemen, in denen das für das Dynamin-verwandte Protein 1 kodierende Gen deletiert bzw. durch RNA-Interferenz epigenetisch stillgelegt wurde, sind ähnliche Änderungen der mitochondrialen Morphologie beobachtet worden (Kap. 1.3.2). $\Delta ScDnm1$ -Hefemutanten beispielsweise enthalten elongierte tubuläre Mitochondrien (Otsuga et al., 1998) bzw. engmaschige Netzwerke mit einer hohen mitochondrialen Interkonnektivität (Bleazard et al., 1999).

Bisher ist jedoch noch nicht geklärt, ob innerhalb der mitochondrialen Filamente in der *PaDnm1::ble*-Mutante eine Kontinuität des Matrixlumens besteht. Experimentell könnte diese Frage mit Hilfe von photoaktivierbarem GFP (PGFP) mit vorgeschalteter mitochondrialer Importsequenz für die Matrix bearbeitet werden. Durch gezielte Aktivierung des PGFP wird es in die fluoreszierende Form überführt. Das Ausmaß der Diffusion dieses Markers würde anzeigen, in welchem Umfang ein Kontinuum der Matrix besteht. Ähnliche Analysen wurden bereits zur Bestimmung der funktionalen mitochondrialen Einheit in dynamischen Mitochondrienetzwerken durchgeführt (Shirihai, persönliche Mitteilung). Problematisch an diesem Ansatz ist jedoch, dass die PGFP-Aktivierung mit Laserimpulsen im konfokalen Laser-„Scanning“-Mikroskop erfolgt und somit die empfindlichen *P. anserina*-Mitochondrien schnell mit morphologischen Änderungen (d. h. Abkuglung) reagieren könnten.

Seneszente *PaDnm1::ble*-Stämme zeigen mitochondriale Fragmentierung, wie sie ebenfalls in entsprechend alten Isolaten des Wildstammes „s“ und der Mutante *grisea* beobachtet wird (siehe Abb. 30). Die Zeitspanne bis zum Eintreten der Seneszenz ist in der *PaDnm1::ble*-Mutante jedoch stark verlängert (siehe Abb. 31). Ihre mittlere Lebensspanne beträgt > 225 Tage und ist somit um mehr als den Faktor 10 gegenüber Wildstammisolaten erhöht. Die Frage, ob die Verlängerung der Lebensspanne mit der veränderten Morphologie der Mitochondrien und/oder der Verzögerung der mitochondrialen Fragmentierung zusammenhängt, ist von zentraler Bedeutung. In elongierten Mitochondrien ist der Transport von Sauerstoff und Fettsäuren wesentlich effizienter (Skulachev 1990, Skulachev 2001), sodass die Versorgung des Myzels der *PaDnm1::ble*-Mutante mit lebensnotwendigen Stoffen verbessert wäre. Weiterhin könnten Schädigungen wichtiger mitochondrialer Bestandteile, wie z. B. der mtDNA, in verlängerten Mitochondrien besser kompensiert werden, da in ihnen evtl. eine größere Zahl intakter Kopien vorliegt, die komplementierende Effekte ausüben können. Dass es durch mitochondriale Fusion zur Kompensation schädlicher mtDNA-Mutationen kommt, wurde bereits bei *S. cerevisiae* (Clark-Walker und Miklos, 1975) und in menschlichen Zellkulturen (Ono et al., 2001) gezeigt.

Wie bereits erwähnt, ist die starke mitochondriale Fragmentierung ein Charakteristikum zahlreicher apoptotischer Prozesse. Wenn Apoptose für die Seneszenz von *P. anserina* eine Rolle spielt, könnte die Lebensspannenverlängerung der *PaDnm1::ble*-Mutante mit einem antiapoptotischen Effekt durch die Deletion des *PaDnm1*-Gens erklärt werden. Befunde, die diese Hypothese bekräftigen, wurden sowohl in Säugerzellen als auch in *S. cerevisiae* erbracht (Kap. 1.3.3). HeLa-Zellen zeigen eine erhöhte Apoptoseresistenz nach Applikation diverser Stimuli, wenn die Expression des *PaDnm1*-homologen Gens *Drp1* durch siRNA posttranskriptionell herunterreguliert wird (Lee et al., 2004). In den Zellen ist die Ausschüttung von Cytochrom-c inhibiert. Die Autoren sehen in diesem Befund einen wichtigen Hinweis, dass DRP1 an der Cytochrom-c-Freisetzung beteiligt ist. Bei Hefe reagieren $\Delta ScDnm1$ -Mutanten mit einer verzögerten Apoptoseantwort auf entsprechende Stimulantien (Fannjiang et al., 2004). Hierbei kommt es wie in der *PaDnm1::ble*-Mutante trotz des fehlenden *ScDnm1*-Gens zur mitochondrialen Fragmentierung. Analysen zur Freisetzung von Cytochrom-c während des Alterns von *P. anserina* könnten wichtige Hinweise auf die Beteiligung apoptotischer Prozesse an der begrenzten Lebensspanne dieses Pilzes geben. Eine Möglichkeit zur experimentellen Bearbeitung dieses Themas wären z. B. Western-blot-Analysen mit Antikörpern gegen Cytochrom-c mit mitochondrialen und cytoplasmatischen Proteinproben, die aus dem Wildstamm und der *PaDnm1::ble*-Mutante in verschiedenen Altersstadien isoliert worden sind.

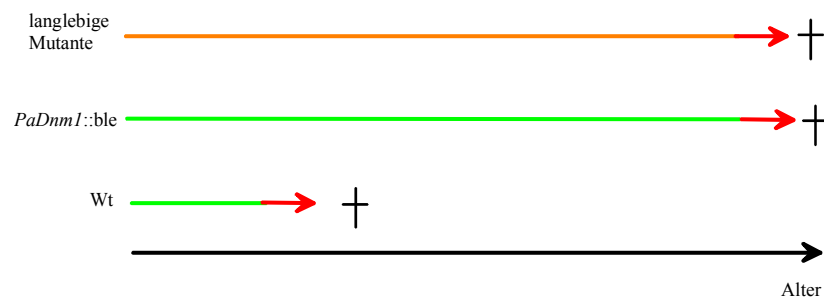


Abb. 42: Zusammenhang zwischen der physiologischen „Fitness“ und der Lebensspanne in verschiedenen *P. anserina*-Stämmen. Wildstämme (Wt) sind durch eine vergleichsweise kurze Lebensspanne (Länge des Pfeils) charakterisiert. Während des Alterns kommt es schnell zu einer Abnahme der „Fitness“ (grün = hohe „Fitness“, rot = niedrige „Fitness“). *PaDnm1::ble* zeigt nach der Sporenkeimung im Gegensatz zu anderen langlebigen *P. anserina*-Mutanten keine physiologischen Einschränkungen (orange Färbung). Die Seneszenzphase verläuft jedoch wie bei den Wildstämmen. *PaDnm1::ble*-Mutanten sind demnach durch eine stark verlängerte Lebensspanne mit hoher „Fitness“ charakterisiert.

Die bisher charakterisierten langlebigen *P. anserina*-Mutanten verfügen über unterschiedliche physiologische Defekte (siehe Mutantenauswahl in Kap. 1.2.2). Hierbei handelt es sich meistens um eine Verringerung der Wachstumsrate bzw. der weiblichen Fertilität, d. h. die Fähigkeit, nach der Befruchtung Perithezien auszubilden. Sie weisen außerdem eine Stabilisierung der mtDNA und die Induktion der Respiration über die PaAOX aufgrund

eingeschränkter bzw. nicht vorhandener COX-abhängiger Atmung auf. Die pDNA-Amplifikation scheint in der *PaDnm1::ble*-Mutante ebenfalls unterdrückt zu sein. Nur in einigen seneszenten Stämmen kann pDNA detektiert werden, wobei in ihnen außerdem eine mit dem juvenilen Stadium vergleichbare Menge nicht reorganisierter mtDNA vorhanden ist (siehe Abb. 37). Interessanterweise zeigen *PaDnm1::ble*-Isolate nach der Sporenkeimung keine physiologischen Defekte wie andere langlebige *P. anserina*-Mutanten: Myzelmorphologie, Wachstumsrate und Fertilität entsprechen dem Wildtyp (siehe Abb. 34). Diese Daten legen nahe, dass die effiziente Respiration über die COX nicht eingeschränkt ist. In den BN-PAGE-Analysen zeigen *PaDnm1::ble*-Isolate daher eine mit Wildstämmen vergleichbare Ausstattung der mitochondrialen Atmungskette mit einem hohem COX-Gehalt (siehe Abb. 38). Signifikante Unterschiede der Menge an freiem ATP werden ebenfalls nicht beobachtet (siehe Abb. 39). Im Rahmen der BN-PAGE- und ATP-Analysen zeigte sich, dass sich die alten Isolate sowohl vom Wildstamm „s“ als auch von der *PaDnm1::ble*-Mutante nicht signifikant von den entsprechenden juvenilen Proben unterscheiden. Die fehlenden Unterschiede im Wildstamm „s“ sind überraschend, da es hier zu einer starken altersabhängigen Degradation der mtDNA kommt, sodass die genetische Information für den Umsatz beschädigter, mitochondrial kodierter Untereinheiten verloren geht (siehe Kap. 1.2.2). Insbesondere das für die erste Untereinheit der COX kodierende Gen, *PaCoxI*, ist davon stark betroffen (Albert und Sellem, 2002). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl COX-Gehalt als auch -Aktivität (spektralphotometrische Bestimmung) in alten Wildstämmen erniedrigt sind (Belcour und Begel, 1978; Kunstmann, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten „in Gel“-Aktivitätsassays lassen allerdings keine deutlichen Unterschiede zwischen verschiedenen alten Proben erkennen. Möglicherweise gehen durch die Isolationsprozedur (siehe 4.4.2) beschädigte Mitochondrien(proteine) verloren. Ein verbesserter experimenteller Ansatz wären evtl. spektralphotometrische Messungen des Substratumsatzes der jeweiligen Atmungskettenkomponente in weniger stark aufgereinigten mitochondrialen Präparationen. Allerdings besteht hierbei eine erhöhte Gefahr der Kontamination mit Verunreinigungen, die zu einer Beeinträchtigung des enzymatischen Umsatzes kommen könnte. Es müsste dann gezeigt werden, dass Aktivitätsunterschiede zwischen juvenilen und alten Proben nicht auf unterschiedlich starken Verunreinigungen beruhen.

Erwartungsgemäß sollte durch einen Verlust der COX-abhängigen Atmung der ATP-Gehalt erniedrigt sein, was innerhalb der initialen ATP-Messungen in dieser Arbeit nicht belegt werden konnte. Problematisch könnte hierbei der Myzelaufschluss (siehe 4.5.3) sein, der bei seneszenten Kulturen evtl. effizienter ist, sodass aus diesen mehr ATP freigesetzt werden kann.

Schließlich wird die Frage, ob es mit steigendem Alter in Säugern überhaupt zu signifikanten Schäden der mitochondrialen Atmungskette kommt, kontrovers diskutiert (Übersicht bei: Maklashina und Ackrell, 2004). Ursprünglich wurde z. B. eine altersbedingte Abnahme der Aktivitäten von Komplex I, II und IV in menschlichen Skelettmuskeln beschrieben (Trounce et al., 1989). Neuere Arbeiten mit verbesserten Methoden zur Mitochondrienaufräumung widersprachen diesen Befunden (Barrientos et al., 1996; Rasmussen et al., 2003). Defizite hinsichtlich Atmungsrate, Zusammensetzung und Aktivität der Atmungskette und Pyruvatdehydrogenaseaktivität, konnten nicht in den Skelettmuskelproben alter Probanden gefunden werden (Rasmussen et al., 2003). Jedoch zeigt eine aktuelle Publikation (Short et al., 2005) signifikante Abnahmen von Enzymen der oxidativen Phosphorylierung und des Zitronensäurezyklus in Skelettmuskelpräparaten von alten Menschen. Die Autoren dieser Arbeit nennen die genau definierte Auswahl der Probanden (nur gesunde Personen mit vergleichbarem Lebensstil) als grundlegende Voraussetzung, um vergleichende Studien an Muskelbiopsien durchführen zu können. In mitochondrialen Präparaten von Herzmuskelzellen von über 80jährigen wurden jedoch keine signifikant geringeren Aktivitäten der Komplexe I, II, III und IV als in den Proben von jungen Menschen festgestellt (Miro et al., 2000).

Die PaDnm1::ble-Mutante ist sensitiv gegenüber Ammoniumazetat

Nach der Sporenkeimung weist die *PaDnm1::ble*-Mutante keine physiologischen Defekte auf. Allerdings sind *PaDnm1::ble*-Sporen nicht in der Lage, auf dem Standard-Keimungsmedium (BMM + 60 mM AmAc) anzuwachsen (siehe Abb. 35). Die Wachstumsrate von *PaDnm1::ble*-Isolaten, die von einer ungesupplementierten BMM-Platte auf BMM+AmAc überimpft werden, ist ebenfalls signifikant eingeschränkt (siehe Abb. 34 B). AmAc-Sensitivität bei *P. anserina* wurde bereits bei einem Stamm mit zwei Mutationen in Genen, die für ribosomale Untereinheiten kodieren, beschrieben (Crouzet und Begueret, 1980). Die Autoren fanden jedoch keinen kausalen Zusammenhang zwischen diesen Mutationen und der Empfindlichkeit gegenüber AmAc.

AmAc führt zu einem osmotisch bedingten Anschwellen der Mitochondrien, weil das Ammonium (NH_4^+)- und Azetat (CH_3COO^-)-Ion im zellulären Milieu mit den ungeladenen und daher membrandurchlässigen Formen Ammoniak (NH_3) und Essigsäure (CH_3COOH) im Gleichgewicht stehen (Bellei et al., 1989) (siehe Abb. 43).

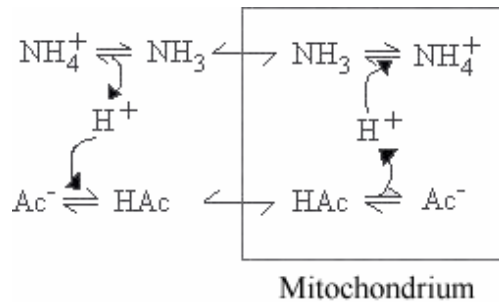


Abb. 43: Aufnahme von Ammoniak und Essigsäure in Mitochondrien. Ammoniumazetat dissoziiert in der Zelle jeweils in ein Ammonium (NH_4^+)- und ein Azetat (Ac^-)-Ion. Diese stehen mit den ungeladenen Formen (Ammoniak [NH_3] und Essigsäure [HAc]) im Gleichgewicht, die in die Mitochondrien diffundieren können. Die Osmolarität in der mitochondrialen Matrix steigt und führt zum Einstrom von Wasser. Schließlich kommt es zur mitochondrialen Volumenzunahme (Bellei et al., 1989).

Die AmAc-abhängige mitochondriale Volumenzunahme verhindert möglicherweise, dass die bereits durch die *PaDnm1*-Deletion elongierten Organellen aus der Ascospore in die auswachsende Hyphe einwandern können. *PaDnm1::ble*-Isolate, die von einer un-supplementierten Platte auf BMM+AmAc überimpft werden, könnten ebenfalls aufgrund eines stark vergrößerten Mitochondrienvolumens nur langsamer als der Wildstamm wachsen. Experimentell sollte diese Frage z. B. durch fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Mitochondrienmorphologie von auf BMM+AmAc wachsenden *PaDnm1::ble*-Isolaten im Vergleich zu Wildstämmen bearbeitet werden.

S. cerevisiae-Mutanten, in denen Gene für die mitochondriale Teilung deletiert wurden, zeigen, unabhängig von Zusatzstoffen im Medium, starke Defizite in der Sporenkeimung (Gorsich und Shaw, 2004). Beispielsweise steigt in $\Delta\text{ScDnm1} / \Delta\text{ScDnm1}$ -Stämmen der Anteil von Sporen ohne Mitochondrien um das vierfache. Der Anteil nicht lebensfähiger Sporen beträgt darüber hinaus 27 % (Wildstamm: 6 %), weil sie nicht eine ausreichende Menge an Mitochondrien erhalten haben. Schließlich steigt der Anteil von „petite“-Kolonien um den Faktor 14, da es zu Defekten in der mtDNA-Verteilung kommt. Diese Befunde belegen, dass *ScDnm1* und weitere Gene der mitochondrialen Dynamik wie z. B. *ScFis1* und *ScMdv1* von essenzieller Bedeutung in der Mitochondriensegregation während der Ascosporengese in Hefe sind (Gorsich und Shaw, 2004). Die Verteilung der Mitochondrien bei der Bildung von Ascosporen in der *PaDnm1::ble*-Mutante ist hingegen nicht eingeschränkt (siehe Abb. 36). In den wesentlich größeren *P. anserina*-Ascosporen ist die Wahrscheinlichkeit, nach dem Ausbilden der Sporenwand Mitochondrien mit einzuschliessen, viel größer als bei den kleinen *S. cerevisiae*-Sporen. Eine durch die mitochondriale Teilungsmaschinerie ausgelöste Fragmentierung der Mitochondrien vor der Sporulation, wie sie bei *S. cerevisiae* beobachtet wird (Miyakawa et al., 1984; Gorsich und Shaw, 2004), wäre somit in *P. anserina* nicht zwingend notwendig.

Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten identifizieren die Kontrolle der mitochondrialen Morphologie als neues Element, das den Alterungsprozess von *P. anserina* beeinflusst. Bemerkenswert hierbei ist, dass die beobachtete Erhöhung der Lebensspanne in der *PaDnm1::ble*-Mutante nicht mit physiologischen Defekten wie der Einschränkung von Fertilität bzw. Wachstumsrate einhergeht, wie sie für andere langlebige *P. anserina*-Mutanten beschrieben worden ist.

Ob die beobachtete Lebensspannenverlängerung durch eine Verzögerung apoptotischer Prozesse im seneszenten Stadium hervorgerufen wird, kann noch nicht beantwortet werden. Bislang ist unklar, ob die Aktivierung eines programmierten Zelltodes an der begrenzten Lebensspanne von *P. anserina* überhaupt beteiligt ist. Über die Aufklärung des Apoptoseablaufs hinaus wäre demnach insbesondere die Identifizierung der Signale bedeutend, die Apoptose in alten *P. anserina*-Stämmen auslösen.

Neben der Deletion von *PaDnm1* ist die Überexpression und Deletion anderer Gene, die die mitochondriale Dynamik regulieren, eine geeignete Möglichkeit, einen tieferen Einblick in die Rolle der mitochondrialen Morphologie für das Alternsphänomen zu erlangen. In Säugern wird HFIS1 als limitierender Faktor der Mitochondrienteilung angesehen (siehe S. 116) (Yoon et al., 2003). Wenn *PaFIS1* eine ähnliche Bedeutung für die mitochondriale Teilung in *P. anserina* zukommt, würde die Modulation der Expression von *PaFis1* wahrscheinlich noch stärkere phänotypische Effekte als im Fall von *PaDnm1* hervorrufen. Darüber hinaus könnte *PaDnm1* durchaus weitere, bisher nicht in *P. anserina* untersuchte, zelluläre Mechanismen beeinflussen. In Säugern wurde gezeigt, dass das *PaDnm1*-homologe Gen *Drp1* (bzw. *Dlp1*) an der Peroxisomenproliferation beteiligt ist (Li und Gould, 2003).

Peroxisomen sind ubiquitäre Organellen, die zahlreiche Oxidasen und Katalase enthalten, die der Synthese bzw. dem Abbau von Wasserstoffperoxid dienen (De Duve und Baudhuin, 1966). Neben der β -Oxidation langkettiger Fettsäuren können sie spezialisierte Funktionen ausüben. In Säugern sind Peroxisomen an der Synthese von Membranbestandteilen wie z. B. Phospholipiden und Cholesterin beteiligt (Übersicht bei: van den Bosch et al., 1992). In dem filamentösen Pilz *Penicillium chrysogenum* wird z. B. ein Penicillin-Syntheseschritt in den Peroxisomen katalysiert (Müller et al., 1991).

Peroxisomenelongation wird sogar in Säugern als Marker für eine effiziente epigenetische Stilllegung von *Drp1* angesehen (Boll und Schrader, 2005). Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der Peroxisomenmorphologie im Wildstamm und der *PaDnm1::ble*-Mutante könnte zeigen, ob *PaDnm1* neben der Mitochondrienteilung auch die Peroxisomendynamik beeinflusst.

7. Zusammenfassung

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

1. Vergleichende Charakterisierung von COX- und PaAOX-abhängiger Respiration

Im Wildstamm „s“ wurde im Gegensatz zu ex1 durch enzymkinetische Analysen eine starke Interaktion der Komplexe I und III nachgewiesen. Ein Großteil der Komplexe I und III ist im Wildstamm „s“ in Form von Superkomplexen organisiert. In der Mutante ex1 liegen die Komplexe I und III dagegen hauptsächlich frei vor. Die spezifische Aktivität der Cytochrom-c-Reduktase ist in ex1 niedriger als im Wildstamm „s“.

2. Freisetzung von H₂O₂ in seneszenten *P. anserina*-Isolaten des Wildstammes „s“ und der *PaDnm1::ble*-Mutante

Seneszente Isolate des Wildstammes „s“ und der *PaDnm1::ble*-Mutante weisen im Gegensatz zur Mutante grisea eine starke Freisetzung von Wasserstoffperoxid auf.

3. Analyse der Mitochondrienmorphologie im Wildstamm „s“ und den langlebigen Mutanten grisea und ex1

Juvenile und mittelalte Wildstamm „s“-Isolate enthalten überwiegend kurze, filamentöse Mitochondrien, die entlang der Hyphenachse im Cytoplasma orientiert sind. Im seneszenten Stadium kommt es zu einer starken mitochondrialen Fragmentierung. Der Übergang von einer filamentösen zu einer sphärischen Morphologie dieser Organellen tritt auch in Mutante grisea auf. In ex1-Hyphen sind hauptsächlich filamentöse Mitochondrien enthalten.

Initiale Analysen zur mitochondrialen Feinstruktur zeigen, dass in Wildstamm „s“ und Mutante grisea eine lamellenartige Cristaestruktur erkennbar ist. In der Mutante ex1 hingegen erscheinen die Cristae ungeordneter und weniger zahlreich.

4. Charakterisierung von *PaDnm1*

Die Mitochondrienfragmentierung im seneszenten Wildstamm „s“ korreliert mit einer Induktion der Transkription von *PaDnm1*. In Mutante grisea ist die *PaDnm1*-Transkriptmenge während des Alterns konstant, obwohl sich die mitochondriale Morphologie wie im Wildstamm „s“ verändert. Überexpression von *PaDnm1* führt zur Mitochondrienfragmentierung während die gezielte Deletion dieses Gens eine starke Elongation der Mito-

chondrien zur Folge hat. *PaDnm1* ist somit das erste in einem filamentösen Pilz charakterisierte Gen der mitochondrialen Teilungsmaschinerie.

5. Charakterisierung der *PaDnm1::ble*-Mutante

PaDnm1::ble-Isolate zeigen im seneszenten Stadium mitochondriale Fragmentierung wie Wildstamm „s“ und Mutante grisea. Das mitochondriale Genom von *PaDnm1::ble* ist stabilisiert, d. h. die Bildung der seneszenzfördernden pIDNA wird unterdrückt. Die mittlere Lebensspanne der *PaDnm1::ble*-Mutante ist deutlich (> Faktor 10) gegenüber der des Wildstammes „s“ erhöht. Bemerkenswerterweise zeigt *PaDnm1::ble* im Gegensatz zu anderen langlebigen *P. anserina*-Mutanten nach der Sporenkeimung keine physiologischen Defekte: Wachsrates, männliche und weibliche Fertilität, Myzelmorphologie und Mitochondrien-segregation während der Ascosporengese sind nicht eingeschränkt. Allerdings weist *PaDnm1::ble* eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Ammoniumazetat auf. Dies äußert sich in einer Inhibierung der Sporenkeimung und einer Verringerung der Wachsrates bei Anzucht der Mutante auf AmAc-haltigem Medium.

8. Literatur

- Albert,B. und Sellem,C.H. (2002). Dynamics of the mitochondrial genome during *Podospora anserina* aging. *Curr. Genet.*, **40**, 365-373.
- Alexander,C., Votruba,M., Pesch,U.E., Thiselton,D.L., Mayer,S., Moore,A., Rodriguez,M., Kellner,U., Leo-Kottler,B., Auburger,G., Bhattacharya,S.S. und Wissinger,B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.*, **26**, 211-215.
- Alvarez,M.E., Pennell,R.I., Meijer,P.J., Ishikawa,A., Dixon,R.A. und Lamb,C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- Andrade,M.A., Perez-Iratxeta,C. und Ponting,C.P. (2001). Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J. Struct. Biol.*, **134**, 117-131.
- Arimura,S. und Tsutsumi,N. (2002). A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 5727-5731.
- Arretz,M., Schneider,H., Guiard,B., Brunner,M. und Neupert,W. (1994). Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 4959-4967.
- Barrientos,A., Casademont,J., Rotig,A., Miro,O., Urbano-Marquez,A., Rustin,P. und Cardellach,F. (1996). Absence of relationship between the level of electron transport chain activities and aging in human skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **229**, 536-539.
- Begel,O., Boulay,J., Albert,B., Dufour,E. und Sainsard-Chanet,A. (1999). Mitochondrial group II introns, cytochrome c oxidase, and senescence in *Podospora anserina*. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 4093-4100.
- Belcour,L., Begel,O., Mosse,M.O. und Vierny-Jamet,C. (1981). Mitochondrial DNA amplification in senescent cultures of *Podospora anserina*: Variability between the retained, amplified sequences. *Curr. Genet.*, **3**, 13-21.
- Belcour,L. und Begel,O. (1978). Lethal mitochondrial genotypes in *Podospora anserina*: a model for senescence. *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 113-123.
- Bellei,M., Battelli,D., Guarriero,D.M., Muscatello,U., DiLisa,F., Siliprandi,N. und Bobyleva-Guarriero,V. (1989). Changes in mitochondrial activity caused by ammonium salts and the protective effect of carnitine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **158**, 181-188.
- Beregi,E., Regius,O., Huttli,T. und Gobl,Z. (1988). Age-related changes in the skeletal muscle cells. *Z. Gerontol.*, **21**, 83-86.
- Bereiter-Hahn,J. (1976). Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodine (DASPMI) as a fluorescent probe for mitochondria *in situ*. *Biochim. Biophys. Acta*, **423**, 1-14.
- Bereiter-Hahn,J. und Vöth,M. (1994). Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.*, **27**, 198-219.
- Bleazard,W., McCaffery,J.M., King,E.J., Bale,S., Mozdy,A., Tieu,Q., Nunnari,J. und Shaw,J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 298-304.
- Boll,A. und Schrader,M. (2005). Elongation of peroxisomes as an indicator for efficient dynamin-like protein 1 knock down in mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 1037-1040.
- Borghouts,C., Benguria,A., Wawryn,J. und Jazwinski,S.M. (2004). Rtg2 protein links metabolism and genome stability in yeast longevity. *Genetics*, **166**, 765-777.
- Borghouts,C., Kerschner,S. und Osiewacz,H.D. (2000). Copper-dependence of mitochondrial DNA rearrangements in *Podospora anserina*. *Curr Genet*, **37**, 268-275.

- Borghouts,C., Kimpel,E. und Osiewacz,H.D. (1997). Mitochondrial DNA rearrangements of *Podospora anserina* are under the control of the nuclear gene *grisea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 10768-10773.
- Borghouts,C. und Osiewacz,H.D. (1998). GRISEA, a copper-modulated transcription factor from *Podospora anserina* involved in senescence and morphogenesis, is an ortholog of MAC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **260**, 492-502.
- Borghouts,C., Scheckhuber,C.Q., Stephan,O. und Osiewacz,H.D. (2002a). Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of *PaCtr3* encoding a copper transporter. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, **34**, 1355-1371.
- Borghouts,C., Scheckhuber,C.Q., Werner,A. und Osiewacz,H.D. (2002b). Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology*, **3**, 143-153.
- Borghouts,C., Werner,A., Elthon,T. und Osiewacz,H.D. (2001). Copper-modulated gene expression and senescence in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 390-399.
- Bossy-Wetzels,E., Barsoum,M.J., Godzik,A., Schwarzenbacher,R. und Lipton,S.A. (2003). Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 706-716.
- Braun,H.P. und Schmitz,U.K. (1995). The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 423-436.
- Bulut,S., Ozdemir,B.H., Alaaddinoglu,E.E., Oduncuoglu,F.B., Bulut,O.E. und Demirhan,B. (2005). Effect of cyclosporin A on apoptosis and expression of p53 and bcl-2 proteins in the gingiva of renal transplant patients. *J. Periodontol.*, **76**, 691-695.
- Campbell,A.K. (1983). Intracellular calcium: its universal role as regulator. John Wiley and Sons, New York.
- Cervený,K.L. und Jensen,R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4126-4139.
- Cervený,K.L., McCaffery,J.M. und Jensen,R.E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 309-321.
- Chaverroche,M.K., Ghigo,J.M. und d'Enfert,C. (2000). A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.*, **28**, E97.
- Chen,H., Detmer,S.A., Ewald,A.J., Griffin,E.E., Fraser,S.E. und Chan,D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.*, **160**, 189-200.
- Cheng,J., Park,T.S., Chio,L.C., Fischl,A.S. und Ye,X.S. (2003). Induction of apoptosis by sphingoid long-chain bases in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 163-177.
- Clapham,D.E. (1995). Calcium signaling. *Cell*, **80**, 259-268.
- Clark-Walker,G.D. und Miklos,G.L. (1975). Complementation in cytoplasmic petite mutants of yeast to form respiratory competent cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**, 372-375.
- Clarkson,A.B., Jr., Bienen,E.J., Pollakis,G. und Grady,R.W. (1989). Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J. Biol. Chem.*, **264**, 17770-17776.
- Corral-Debrinski,M., Horton,T., Lott,M.T., Shoffner,J.M., Beal,M.F. und Wallace,D.C. (1992). Mitochondrial DNA deletions in human brain: regional variability and increase with advanced age. *Nat. Genet.*, **2**, 324-329.
- Cortopassi,G.A. und Arnheim,N. (1990). Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 6927-6933.
- Crouzet,M. und Begueret,J. (1980). Altered ribosomal proteins in mutants of the fungus *Podospora anserina*. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4996-4999.

- Csordas,G., Thomas,A.P. und Hajnoczky,G. (1999). Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria. *EMBO J.*, **18**, 96-108.
- Cummings,D.J., Belcour,L. und Grandchamp,C. (1979). Mitochondrial DNA from *Podospora anserina*. II. Properties of mutant DNA and multimeric circular DNA from senescent cultures. *Mol. Gen. Genet.*, **171**, 239-250.
- Cypser,J.R. und Johnson,T.E. (2002). Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **57**, B109-B114.
- Dalla,L.L., Sabbadini,R., Renken,C., Ravara,B., Sandri,M., Betto,R., Angelini,A. und Vescovo,G. (2001). Apoptosis in the skeletal muscle of rats with heart failure is associated with increased serum levels of TNF-alpha and sphingosine. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **33**, 1871-1878.
- De Duve,C. und Baudhuin,P. (1966). Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev.*, **46**, 323-357.
- Delay,C. (1963). Observations inframicroscopiques sur le mycelium 'senescent' du *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **256**, 4721-4724.
- Delettre,C., Lenaers,G., Griffoin,J.M., Gigarel,N., Lorenzo,C., Belenguer,P., Pelloquin,L., Grosgeorge,J., Turc-Carel,C., Perret,E., Astarie-Dequeker,C., Lasquelles,L., Arnaud,B., Ducommun,B., Kaplan,J. und Hamel,C.P. (2000). Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.*, **26**, 207-210.
- Desagher,S. und Martinou,J.C. (2000). Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **10**, 369-377.
- Dillin,A., Hsu,A.L., Arantes-Oliveira,N., Lehrer-Graiwer,J., Hsin,H., Fraser,A.G., Kamath,R.S., Ahringer,J. und Kenyon,C. (2002). Rates of behavior and aging specified by mitochondrial function during development. *Science*, **298**, 2398-2401.
- Doudican,N.A., Song,B., Shadel,G.S. und Doetsch,P.W. (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5196-5204.
- Dufour,E., Boulay,J., Rincheval,V. und Sainsard-Chanet,A. (2000). A causal link between respiration and senescence in *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 4138-4143.
- Dujon,E. und Belcour,L. (1989). Mitochondrial DNA instabilities and rearrangements in yeast and fungi. In: Mobile DNA, Berg,D. und Howe,M. (Hrsg.), American Society for Microbiology, Washington DC, 861-878.
- Egner,A., Jakobs,S. und Hell,S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 3370-3375.
- Epstein,C.B., Waddle,J.A., Hale,W., Dave,V., Thornton,J., Macatee,T.L., Garner,H.R. und Butow,R.A. (2001). Genome-wide responses to mitochondrial dysfunction. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 297-308.
- Esser,K. (1974). *Podospora anserina*. In: Handbook of genetics, King,R.C. (Hrsg.), Plenum Press, New York, 531-551.
- Esser,K. und Minuth,W. (1972). Abnormal cell wall structure in rhythmically growing mycelia of *Podospora anserina*. *Cytobiologie*, **5**, 319-323.
- Esser,K. und Tudzynski,P. (1980). Senescence in fungi. In: Senescence in plants, Thimann,K.V. (Hrsg.), CRC Press, Boca Raton, 67-83.
- Eubel,H., Jansch,L. und Braun,H.P. (2003). New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*, **133**, 274-286.
- Eura,Y., Ishihara,N., Yokota,S. und Mihara,K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem. (Tokyo)*, **134**, 333-344.

- Fabrizio,P., Battistella,L., Vardavas,R., Gattazzo,C., Liou,L.L., Diaspro,A., Dossen,J.W., Gralla,E.B. und Longo,V.D. (2004). Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **166**, 1055-1067.
- Fannjiang,Y., Cheng,W.C., Lee,S.J., Qi,B., Pevsner,J., McCaffery,J.M., Hill,R.B., Basanez,G. und Hardwick,J.M. (2004). Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev.*, **18**, 2785-2797.
- Fekkes,P., Shepard,K.A. und Yaffe,M.P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.*, **151**, 333-340.
- Frank,S., Gaume,B., Bergmann-Leitner,E.S., Leitner,W.W., Robert,E.G., Catez,F., Smith,C.L. und Youle,R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev. Cell*, **1**, 515-525.
- Frese,D. und Stahl,U. (1992). Oxidative stress and ageing in the fungus *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.*, **65**, 277-288.
- Frieden,M., James,D., Castelbou,C., Danckaert,A., Martinou,J.C. und Demaurex,N. (2004). Ca²⁺ homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 22704-22714.
- Fritz,S., Rapaport,D., Klanner,E., Neupert,W. und Westermann,B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 683-692.
- Fry,S.C. (1998). Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.*, **332 (Pt 2)**, 507-515.
- Fukushima,N.H., Brisch,E., Keegan,B.R., Bleazard,W. und Shaw,J.M. (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2756-2766.
- Fuller,M.T. (1993). Spermatogenesis. In: The Development of *Drosophila melanogaster*, Bate,M. und Martinez-Arias,A. (Hrsg.), Cold Spring Harbor, New York, 71-147.
- Gammie,A.E., Kurihara,L.J., Vallee,R.B. und Rose,M.D. (1995). *DNM1*, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell Biol.*, **130**, 553-566.
- Gorsich,S.W. und Shaw,J.M. (2004). Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 4369-4381.
- Gralla,E.B. und Kosman,D.J. (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv. Genet.*, **30**, 251-319.
- Griparic,L., van der Wel,N.N., Orozco,I.J., Peters,P.J. und van der Blik,A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **279**, 18792-18798.
- Hales,K.G. und Fuller,M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*, **90**, 121-129.
- Hamann,A., Krause,K., Werner,A. und Osiewacz,H.D. (2005). A two-step protocol for efficient deletion of genes in the filamentous ascomycete *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, 1-6.
- Hanekamp,T., Thorsness,M.K., Rebbapragada,I., Fisher,E.M., Seebart,C., Darland,M.R., Coxbill,J.A., Updike,D.L. und Thorsness,P.E. (2002). Maintenance of mitochondrial morphology is linked to maintenance of the mitochondrial genome in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **162**, 1147-1156.

- Harman,D. (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *Am. J Clin. Nutr.*, **25**, 839-843.
- Hattori,K., Tanaka,M., Sugiyama,S., Obayashi,T., Ito,T., Satake,T., Hanaki,Y., Asai,J., Nagano,M. und Ozawa,T. (1991). Age-dependent increase in deleted mitochondrial DNA in the human heart: possible contributory factor to presbycardia. *Am. Heart J*, **121**, 1735-1742.
- Heeren,G., Jarolim,S., Laun,P., Rinnerthaler,M., Stolze,K., Perrone,G.G., Kohlwein,S.D., Nohl,H., Dawes,I.W. und Breitenbach,M. (2004). The role of respiration, reactive oxygen species and oxidative stress in mother cell-specific ageing of yeast strains defective in the RAS signalling pathway. *FEMS Yeast Res.*, **5**, 157-167.
- Herker,E., Jungwirth,H., Lehmann,K.A., Maldener,C., Fröhlich,K.U., Wissing,S., Buttner,S., Fehr,M., Sigrist,S. und Madeo,F. (2004). Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, **164**, 501-507.
- Herlan,M., Vogel,F., Bornhovd,C., Neupert,W. und Reichert,A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27781-27788.
- Hermann,G.J., Thatcher,J.W., Mills,J.P., Hales,K.G., Fuller,M.T., Nunnari,J. und Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.*, **143**, 359-373.
- Hodgson,A.N. und Bernard,R.T.F. (1986). Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae *Mollusca bivalvia*. *Gamete Res.*, **15**, 123-136.
- Hoffmann,H.P. und Avers,C.J. (1973). Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science*, **181**, 749-751.
- Honda,S., Ishii,N., Suzuki,K. und Matsuo,M. (1993). Oxygen-dependent perturbation of life span and aging rate in the nematode. *J. Gerontol.*, **48**, B57-B61.
- Horvitz,H.R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer Res.*, **59**, 1701s-1706s.
- Huq,S. und Palmer,J.M. (1978). Isolation of a cyanide-resistant duroquinol oxidase from *Arum maculatum* mitochondria. *FEBS Lett.*, **95**, 217-220.
- Ikura,M., Osawa,M. und Ames,J.B. (2002). The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays*, **24**, 625-636.
- Ishii,N., Fujii,M., Hartman,P.S., Tsuda,M., Yasuda,K., Senoo-Matsuda,N., Yanase,S., Ayusawa,D. und Suzuki,K. (1998). A mutation in succinate dehydrogenase cytochrome b causes oxidative stress and ageing in nematodes. *Nature*, **394**, 694-697.
- Ishii,N., Takahashi,K., Tomita,S., Keino,T., Honda,S., Yoshino,K. und Suzuki,K. (1990). A methyl viologen-sensitive mutant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Mutat. Res.*, **237**, 165-171.
- Jagasia,R., Grote,P., Westermann,B. und Conradt,B. (2005). DRP-1-mediated mitochondrial fragmentation during EGL-1-induced cell death in *C. elegans*. *Nature*, **433**, 754-760.
- Jakobs,S., Martini,N., Schauss,A.C., Egner,A., Westermann,B. und Hell,S.W. (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J. Cell Sci.*, **116**, 2005-2014.
- James,D.I., Parone,P.A., Mattenberger,Y. und Martinou,J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J. Biol. Chem.*, **278**, 36373-36379.
- Jamet-Vierny,C., Contamine,V., Boulay,J., Zickler,D. und Picard,M. (1997). Mutations in genes encoding the mitochondrial outer membrane proteins Tom70 and Mdm10 of *Podospora anserina* modify the spectrum of mitochondrial DNA rearrangements associated with cellular death. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 6359-6366.
- Jarmuszkiewicz,W., Wagner,A.M., Wagner,M.J. und Hryniewiecka,L. (1997). Immunological identification of the alternative oxidase of *Acanthamoeba castellanii* mitochondria. *FEBS Lett.*, **411**, 110-114.

- Jazwinski,S.M. (2000). Metabolic control and gene dysregulation in yeast aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **908**, 21-30.
- Jazwinski,S.M. (2005). Yeast longevity and aging--the mitochondrial connection. *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 243-248.
- Jendrach,M., Pohl,S., Vöth,M., Kowald,A., Hammerstein,P. und Bereiter-Hahn,J. (2005). Morpho-dynamic changes of mitochondria during ageing of human endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.*, **126**, 813-821.
- Jin,J.B., Bae,H., Kim,S.J., Jin,Y.H., Goh,C.H., Kim,D.H., Lee,Y.J., Tse,Y.C., Jiang,L. und Hwang,I. (2003). The *Arabidopsis* dynamin-like proteins ADL1C and ADL1E play a critical role in mitochondrial morphogenesis. *Plant Cell*, **15**, 2357-2369.
- Jung,C., Higgins,C.M. und Xu,Z. (2000). Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **286**, 214-223.
- Kang,B.H., Busse,J.S., Dickey,C., Rancour,D.M. und Bednarek,S.Y. (2001). The *Arabidopsis* cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development. *Plant Physiol*, **126**, 47-68.
- Karbowski,M., Arnoult,D., Chen,H., Chan,D.C., Smith,C.L. und Youle,R.J. (2004). Quantification of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during Bax activation phase of apoptosis. *J. Cell Biol.*, **164**, 493-499.
- Karbowski,M., Lee,Y.J., Gaume,B., Jeong,S.Y., Frank,S., Nechushtan,A., Santel,A., Fuller,M., Smith,C.L. und Youle,R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J. Cell Biol.*, **159**, 931-938.
- Katayama,M., Tanaka,M., Yamamoto,H., Ohbayashi,T., Nimura,Y. und Ozawa,T. (1991). Deleted mitochondrial DNA in the skeletal muscle of aged individuals. *Biochem. Int.*, **25**, 47-56.
- Kennedy,B.K., Austriaco,N.R., Jr. und Guarente,L. (1994). Daughter cells of *Saccharomyces cerevisiae* from old mothers display a reduced life span. *J. Cell Biol.*, **127**, 1985-1993.
- Khaidakov,M., Heflich,R.H., Manjanatha,M.G., Myers,M.B. und Aidoo,A. (2003). Accumulation of point mutations in mitochondrial DNA of aging mice. *Mutat. Res.*, **526**, 1-7.
- Kirchman,P.A., Kim,S., Lai,C.Y. und Jazwinski,S.M. (1999). Interorganelle signaling is a determinant of longevity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **152**, 179-190.
- Kirichok,Y., Krapivinsky,G. und Clapham,D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature*, **427**, 360-364.
- Kirkwood,T.B. und Austad,S.N. (2000). Why do we age? *Nature*, **408**, 233-238.
- Kong,D., Xu,L., Yu,Y., Zhu,W., Andrews,D.W., Yoon,Y. und Kuo,T.H. (2005). Regulation of Ca²⁺-induced permeability transition by Bcl-2 is antagonized by Drp1 and hFis1. *Mol. Cell Biochem.*, **272**, 187-199.
- Kortvely,E. und Gulya,K. (2004). Calmodulin, and various ways to regulate its activity. *Life Sci.*, **74**, 1065-1070.
- Krause,F., Reifschneider,N.H., Vocke,D., Seelert,H., Rexroth,S. und Dencher,N.A. (2004b). "Respirasome"-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach. *J. Biol. Chem.*, **279**, 48369-48375.
- Krause,F., Scheckhuber,C.Q., Werner,A., Rexroth,S., Reifschneider,N.H., Dencher,N.A. und Osiewacz,H.D. (2004a). Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26453-26461.
- Kruger,J.C.D. (1991). Ultrastructure of sperm development in the plant-parasitic nematode *Xiphinema theresiae*. *J. Morph.*, **210**, 163-174.

- Kück,U., Kappelhoff,B. und Esser,K. (1985a). Despite mtDNA polymorphism the mobile intron (pIDNA) of the *COI* gene is present in ten different races of *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, **10**, 59-67.
- Kück,U., Stahl,U. und Esser,K. (1981). Plasmid-like DNA is part of mitochondrial DNA in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, **3**, 151-156.
- Kück,U., Osiewacz,H.D., Schmidt,U., Kappelhoff,B., Schulte,E., Stahl,U. und Esser,K. (1985b). The onset of senescence is affected by DNA rearrangements of a discontinuous mitochondrial gene in *Podospora anserina*. *Curr. Genet.*, **9**, 373-382.
- Kujoth,G.C., Hiona,A., Pugh,T.D., Someya,S., Panzer,K., Wohlgemuth,S.E., Hofer,T., Seo,A.Y., Sullivan,R., Jobling,W.A., Morrow,J.D., van Remmen,H., Sedivy,J.M., Yamasoba,T., Tanokura,M., Weindruch,R., Leeuwenburgh,C. und Prolla,T.A. (2005). Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, **309**, 481-484.
- Kunstmann,B. (2004). Vergleichende Proteomanalyse bei dem Ascomyceten *Podospora anserina* unter besonderer Berücksichtigung mitochondrialer Proteine. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Labrousse,A.M., Zappaterra,M.D., Rube,D.A. und van der Blik,A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell*, **4**, 815-826.
- Lahaye,A., Leterme,S. und Foury,F. (1993). PIF1 DNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*. Biochemical characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, **268**, 26155-26161.
- Lai,C.Y., Jaruga,E., Borghouts,C. und Jazwinski,S.M. (2002). A Mutation in the *ATP2* Gene Abrogates the Age Asymmetry Between Mother and Daughter Cells of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **162**, 73-87.
- Lambowitz,A.M., Sabourin,J.R., Bertrand,H., Nickels,R. und McIntosh,L. (1989). Immunological identification of the alternative oxidase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 1362-1364.
- Laun,P., Pichova,A., Madeo,F., Fuchs,J., Ellinger,A., Kohlwein,S., Dawes,I., Fröhlich,K.U. und Breitenbach,M. (2001). Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1166-1173.
- Lecellier,G. und Silar,P. (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.*, **25**, 122-123.
- Lee,H.C. und Wei,Y.H. (2005). Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 822-834.
- Lee,H.C., Yin,P.H., Chi,C.W. und Wei,Y.H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J. Biomed. Sci.*, **9**, 517-526.
- Lee,H.C., Yin,P.H., Lu,C.Y., Chi,C.W. und Wei,Y.H. (2000). Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem. J.*, **348 Pt 2**, 425-432.
- Lee,J.S., Min,D.S., Park,C., Park,C.S. und Cho,N.J. (2001). Phytosphingosine and C₂-phytoceramide induce cell death and inhibit carbachol-stimulated phospholipase D activation in Chinese hamster ovary cells expressing the *Caenorhabditis elegans* muscarinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett.*, **499**, 82-86.
- Lee,Y.J., Jeong,S.Y., Karbowski,M., Smith,C.L. und Youle,R.J. (2004). Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 5001-5011.
- Legros,F., Lombes,A., Frachon,P. und Rojo,M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 4343-4354.
- Legros,F., Malka,F., Frachon,P., Lombes,A. und Rojo,M. (2004). Organization and dynamics of human mitochondrial DNA. *J. Cell Sci.*, **117**, 2653-2662.
- Li,X. und Gould,S.J. (2003). The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17012-17020.

- Longo, V.D., Butler Gralla, E. und Selverstone Valentine, J. (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 12275-12280.
- Longo, V.D., Liou, L.L., Valentine, J.S. und Gralla, E.B. (1999). Mitochondrial superoxide decreases yeast survival in stationary phase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **365**, 131-142.
- Lorin, S., Dufour, E., Boulay, J., Begel, O., Marsy, S. und Sainsard-Chanet, A. (2001). Overexpression of the alternative oxidase restores senescence and fertility in a long-lived respiration-deficient mutant of *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.*, **42**, 1259-1267.
- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. und Fröhlich, K.U. (2002a). Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr. Genet.*, **41**, 208-216.
- Madeo, F., Fröhlich, E. und Fröhlich, K.U. (1997). A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis. *J. Cell Biol.*, **139**, 729-734.
- Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. und Fröhlich, K.U. (1999). Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J. Cell Biol.*, **145**, 757-767.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lächelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S. und Fröhlich, K.U. (2002b). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol. Cell*, **9**, 911-917.
- Maklashina, E. und Ackrell, B.A. (2004). Is defective electron transport at the hub of aging? *Aging Cell*, **3**, 21-27.
- Malagnac, F., Lalucque, H., Lepere, G. und Silar, P. (2004). Two NADPH oxidase isoforms are required for sexual reproduction and ascospore germination in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Fungal. Genet. Biol.*, **41**, 982-997.
- Marbach, K., Fernandez-Larrea, J. und Stahl, U. (1994). Reversion of a long-living, undifferentiated mutant of *Podospora anserina* by copper. *Curr. Genet.*, **26**, 184-186.
- Marchler-Bauer, A. und Bryant, S.H. (2004). CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic Acids Res.*, **32**, W327-W331.
- Marcou, D. (1961). Notion de longévité et nature cytoplasmatique du déterminant de sénescence chez quelques champignons. *Ann Sci Natur Bot*, 653-764.
- Maxwell, D.P., Wang, Y. und McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 8271-8276.
- McCormack, J.G. und Osbaldeston, N.J. (1990). The use of the Ca²⁺-sensitive intramitochondrial dehydrogenases and entrapped fura-2 to study Sr²⁺ and Ba²⁺ transport across the inner membrane of mammalian mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **192**, 239-244.
- McDaniel, D.P. und Roberson, R.W. (2000). Microtubules are required for motility and positioning of vesicles and mitochondria in hyphal tip cells of *Allomyces macrogynus*. *Fungal. Genet. Biol.*, **31**, 233-244.
- McQuibban, G.A., Saurya, S. und Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*, **423**, 537-541.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M. und Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*, **305**, 1747-1752.
- Mekalanos, J.J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.*, **174**, 1-7.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W. und Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, **160**, 553-564.

- Minke,P.F., Lee,I.H. und Plamann,M. (1999). Microscopic analysis of *Neurospora* ropy mutants defective in nuclear distribution. *Fungal. Genet. Biol.*, **28**, 55-67.
- Miro,O., Casademont,J., Casals,E., Perea,M., Urbano-Marquez,A., Rustin,P. und Cardellach,F. (2000). Aging is associated with increased lipid peroxidation in human hearts, but not with mitochondrial respiratory chain enzyme defects. *Cardiovasc. Res.*, **47**, 624-631.
- Misaka,T., Miyashita,T. und Kubo,Y. (2002). Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15834-15842.
- Miyakawa,I., Aoi,H., Sando,N. und Kuroiwa,T. (1984). Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, **66**, 21-38.
- Moore,A.L. und Siedow,J.N. (1991). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1059**, 121-140.
- Mortimer,R.K. und Johnston,J.R. (1959). Life span of individual yeast cells. *Nature*, **183**, 1751-1752.
- Mozdy,A.D., McCaffery,J.M. und Shaw,J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.*, **151**, 367-380.
- Müller,W.H., van der Krift,T.P., Krouwer,A.J., Wosten,H.A., van der Voort,L.H., Smaal,E.B. und Verkleij,A.J. (1991). Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *EMBO J.*, **10**, 489-495.
- Munkres,K.D. (1990) Histochemical detection of superoxideradicals and hydrogen peroxide by Age-1 mutants of *Neurospora*. *Fungal Genetics Newsletter*, **37**, 24-25.
- Nakada,K., Inoue,K., Ono,T., Isobe,K., Ogura,A., Goto,Y.I., Nonaka,I. und Hayashi,J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nat. Med.*, **7**, 934-940.
- Nunnari,J., Marshall,W.F., Straight,A., Murray,A., Sedat,J.W. und Walter,P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 1233-1242.
- Olichon,A., Emorine,L.J., Descoins,E., Pelloquin,L., Bricchese,L., Gas,N., Guillou,E., Delettre,C., Valette,A., Hamel,C.P., Ducommun,B., Lenaers,G. und Belenguer,P. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.*, **523**, 171-176.
- Ono,T., Isobe,K., Nakada,K. und Hayashi,J.I. (2001). Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat. Genet.*, **28**, 272-275.
- Orrenius,S., Zhivotovsky,B. und Nicotera,P. (2003). Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 552-565.
- Osiewacz,H.D. und Esser,K. (1984). The mitochondrial plasmid of *Podospora anserina*: A mobile intron of a mitochondrial gene. *Curr. Genet.*, **8**, 299-305.
- Osiewacz,H.D., Skaletz,A. und Esser,K. (1991). Integrative transformation of the ascomycete *Podospora anserina*: identification of the mating-type locus on chromosome VII of electrophoretically separated chromosomes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 38-45.
- Otsuga,D., Keegan,B.R., Brisch,E., Thatcher,J.W., Hermann,G.J., Bleazard,W. und Shaw,J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.*, **143**, 333-349.
- Palmer,J. (1976). The organization and regulation of electron transport in plant mitochondria. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **27**, 133-157.
- Pettersson,J., Nordfelth,R., Dubinina,E., Bergman,T., Gustafsson,M., Magnusson,K.E. und Wolf-Watz,H. (1996). Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science*, **273**, 1231-1233.

- Pfanner,N., Wiedemann,N. und Meisinger,C. (2004). Cell biology. Double membrane fusion. *Science*, **305**, 1723-1724.
- Pinton,P., Ferrari,D., Rapizzi,E., Di Virgilio,F., Pozzan,T. und Rizzuto,R. (2001). The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.*, **20**, 2690-2701.
- Porter,J.A., Minke,B. und Montell,C. (1995). Calmodulin binding to *Drosophila* NinaC required for termination of phototransduction. *EMBO J.*, **14**, 4450-4459.
- Praefcke,G.J. und McMahon,H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 133-147.
- Prillinger,H. und Esser,K. (1977). The phenoloxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. XIII. Action and interaction of genes controlling the formation of laccase. *Mol. Gen. Genet.*, **156**, 333-345.
- Punt,P.J., Oliver,R.P., Dingemans,M.A., Pouwels,P.H. und van den Hondel,C.A. (1987). Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, **56**, 117-124.
- Raha,S. und Robinson,B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 502-508.
- Rapaport,D., Brunner,M., Neupert,W. und Westermann,B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**, 20150-20155.
- Rasmussen,U.F., Krstrup,P., Kjaer,M. und Rasmussen,H.N. (2003). Human skeletal muscle mitochondrial metabolism in youth and senescence: no signs of functional changes in ATP formation and mitochondrial oxidative capacity. *Pflugers Arch.*, **446**, 270-278.
- Renzaglia,K.S. und Duckett,J.G. (1989). Ultrastructural studies of spermatogenesis in *Antherocero phyta* V. Nuclear metamorphosis and the posterior mitochondrion of *Notothylas orbicularis* and *Phaeoceros laevis*. *Protoplasma*, **151**, 137-150.
- Ridder,R. und Osiewacz,H.D. (1992). Sequence analysis of the gene coding for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gpd) of *Podospora anserina*: use of homologous regulatory sequences to improve transformation efficiency. *Curr. Genet*, **21**, 207-213.
- Rizet,G. (1953). Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue illimitée de l'ascomycète *Podospora anserina*. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **237**, 838-855.
- Rizzuto,R., Pinton,P., Carrington,W., Fay,F.S., Fogarty,K.E., Lifshitz,L.M., Tuft,R.A. und Pozzan,T. (1998). Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca^{2+} responses. *Science*, **280**, 1763-1766.
- Rojo,M., Legros,F., Chateau,D. und Lombes,A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.*, **115**, 1663-1674.
- Sachs,H.G., Colgan,J.A. und Lazarus,M.L. (1977). Ultrastructure of the aging myocardium: a morphometric approach. *Am. J. Anat.*, **150**, 63-71.
- Sanders,D., Brownlee,C. und Harper,J.F. (1999). Communicating with calcium. *Plant Cell*, **11**, 691-706.
- Santel,A., Frank,S., Gaume,B., Herrler,M., Youle,R.J. und Fuller,M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J. Cell Sci.*, **116**, 2763-2774.
- Santel,A. und Fuller,M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.*, **114**, 867-874.
- Schägger,H. (2001). Respiratory chain supercomplexes. *IUBMB. Life*, **52**, 119-128.

- Schägger,H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 154-159.
- Schägger,H. und Pfeiffer,K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 1777-1783.
- Schägger,H. und von Jagow,G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-231.
- Scheffler,I.E. (1999). Mitochondria. John Wiley and Sons, New York.
- Schopfer,P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth. *Plant J.*, **28**, 679-688.
- Schulte,E., Kück,U. und Esser,K. (1988). Extrachromosomal mutants from *Podospira anserina*: Permanent vegetative growth in spite of multiple recombination events in the mitochondrial genome. *Mol. Gen. Genet.*, **211**, 342-349.
- Schulte,U., Arretz,M., Schneider,H., Tropschug,M., Wächter,E., Neupert,W. und Weiss,H. (1989). A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature*, **339**, 147-149.
- Schwarze,S.R., Lee,C.M., Chung,S.S., Roecker,E.B., Weindruch,R. und Aiken,J.M. (1995). High levels of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of old rhesus monkeys. *Mech. Ageing Dev.*, **83**, 91-101.
- Sekito,T., Thornton,J. und Butow,R.A. (2000). Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p. *Mol. Biol Cell*, **11**, 2103-2115.
- Sellem,C.H., Lecellier,G. und Belcour,L. (1993). Transposition of a group II intron. *Nature*, **366**, 176-178.
- Senoo-Matsuda,N., Yasuda,K., Tsuda,M., Ohkubo,T., Yoshimura,S., Nakazawa,H., Hartman,P.S. und Ishii,N. (2001). A defect in the cytochrome b large subunit in complex II causes both superoxide anion overproduction and abnormal energy metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 41553-41558.
- Sesaki,H. und Jensen,R.E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.*, **147**, 699-706.
- Sesaki,H. und Jensen,R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **152**, 1123-1134.
- Sesaki,H. und Jensen,R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.*, **279**, 28298-28303.
- Sesaki,H., Southard,S.M., Hobbs,A.E. und Jensen,R.E. (2003b). Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 276-283.
- Sesaki,H., Southard,S.M., Yaffe,M.P. und Jensen,R.E. (2003a). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 2342-2356.
- Shaw,J.M. und Nunnari,J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.*, **12**, 178-184.
- Shepard,K.A. und Yaffe,M.P. (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.*, **144**, 711-720.
- Shin,H.W., Shinotsuka,C., Torii,S., Murakami,K. und Nakayama,K. (1997). Identification and subcellular localization of a novel mammalian dynamin-related protein homologous to yeast Vps1p and Dnm1p. *J. Biochem. (Tokyo)*, **122**, 525-530.

- Shin,H.W., Takatsu,H., Mukai,H., Munekata,E., Murakami,K. und Nakayama,K. (1999). Intermolecular and interdomain interactions of a dynamin-related GTP-binding protein, Dnm1p/Vps1p-like protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 2780-2785.
- Short,K.R., Bigelow,M.L., Kahl,J., Singh,R., Coenen-Schimke,J., Raghavakaimal,S. und Nair,K.S. (2005). Decline in skeletal muscle mitochondrial function with aging in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **102**, 5618-5623.
- Silar,P., Barreau,C., Debuchy,R., Kicka,S., Turcq,B., Sainsard-Chanet,A., Sellem,C.H., Billault,A., Cattolico,L., Duprat,S. und Weissenbach,J. (2003). Characterization of the genomic organization of the region bordering the centromere of chromosome V of *Podospora anserina* by direct sequencing. *Fungal. Genet. Biol.*, **39**, 250-263.
- Skulachev,V.P. (1990). Power transmission along biological membranes. *J. Membr. Biol.*, **114**, 97-112.
- Skulachev,V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.*, **26**, 23-29.
- Slater,E.C. (1983). The Q cycle, an ubiquitous mechanism for electron transfer. *Trends Biochem. Sci.*, **8**, 239-242.
- Slater,A.F., Stefan,C., Nobel,I., van den Dobbelsteen,D.J. und Orrenius,S. (1995). Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol. Lett.*, **82-83**, 149-153.
- Smirnova,E., Griparic,L., Shurland,D.L. und van der Blik,A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 2245-2256.
- Smirnova,E., Shurland,D.L., Ryazantsev,S.N. und van der Blik,A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J. Cell Biol.*, **143**, 351-358.
- Stahl,U., Lemke,P.A., Tudzynski,P., Kück,U. und Esser,K. (1978). Evidence for plasmid like DNA in a filamentous fungus, the ascomycete *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.*, **162**, 341-343.
- Stahl,U., Tudzynski,P., Kück,U. und Esser,K. (1982). Replication and expression of a bacterial--mitochondrial hybrid plasmid in the fungus *Podospora anserina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **79**, 3641-3645.
- Stevens,B. J. (1977). Variation in number and volume of the mitochondria in yeast according to growth conditions. A study based on serial sectioning and computergraphics reconstruction. *Biol. Cell*, **28**, 37 -56.
- Stevens,B. J. (1981). Mitochondrial structure. In: The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, life cycle and inheritance, Strathern,J.N., Jones,E.W. und Broach,J.R. (Hrsg.), Cold Spring Harbor, New York, 471-504.
- Stojanovski,D., Koutsopoulos,O.S., Okamoto,K. und Ryan,M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.*, **117**, 1201-1210.
- Stumpferl,S.W., Stephan,O. und Osiewacz,H.D. (2004). Impact of a disruption of a pathway delivering copper to mitochondria on *Podospora anserina* metabolism and life span. *Eukaryotic Cell*, **3**, 200-211.
- Suelmann,R. und Fischer,R. (2000). Mitochondrial movement and morphology depend on an intact actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **45**, 42-50.
- Sugioka,R., Shimizu,S. und Tsujimoto,Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 52726-52734.
- Sulston,J.E. (1983). Neuronal cell lineages in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **48 Pt 2**, 443-452.
- Sulston,J.E. und Horvitz,H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.*, **56**, 110-156.
- Szabadkai,G., Simoni,A.M., Chami,M., Wieckowski,M.R., Youle,R.J. und Rizzuto,R. (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis. *Mol. Cell*, **16**, 59-68.

- Szalai,G., Krishnamurthy,R. und Hajnoczky,G. (1999). Apoptosis driven by IP₃-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J.*, **18**, 6349-6361.
- Tates,A.D. (1971). Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*: an electron microscope study. Rijksuniversiteit, Leiden.
- Tieu,Q. und Nunnari,J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.*, **151**, 353-366.
- Tieu,Q., Okreglak,V., Naylor,K. und Nunnari,J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.*, **158**, 445-452.
- Tinazli,A. (2002). Altersabhängige Transkriptionsprofile kupferregulierter Gene bei dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Trifunovic,A., Wredenberg,A., Falkenberg,M., Spelbrink,J.N., Rovio,A.T., Bruder,C.E., Bohlooly,Y., Gidlof,S., Oldfors,A., Wibom,R., Tornell,J., Jacobs,H.T. und Larsson,N.G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**, 417-423.
- Trounce,I., Byrne,E. und Marzuki,S. (1989). Decline in skeletal muscle mitochondrial respiratory chain function: possible factor in ageing. *Lancet*, **1**, 637-639.
- Tullis,R., Fetherolf,P. und O'Hara,B. (1989). Synthesis considerations for PCR primers and probes. *Amplifications*, **3**, 17-18.
- van den Bosch de Aguilar,P. und Vanneste,J. (1981). Ultrastructural study of the neurons of the spinal ganglia during aging in the rat. *Acta Anat. (Basel)*, **110**, 59-70.
- van den Bosch,B.H., Schutgens,R.B., Wanders,R.J. und Tager,J.M. (1992). Biochemistry of peroxisomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 157-197.
- Vanneste,J. und van den Bosch de Aguilar,P. (1981). Mitochondrial alterations in the spinal ganglion neurons in ageing rats. *Acta Neuropathol. (Berl)*, **54**, 83-87.
- Verbeet,M.P., Klootwijk,J., van Heerikhuizen,H., Fontijn,R., Vreugdenhil,E. und Planta,R.J. (1983). Molecular cloning of the rDNA of *Saccharomyces rosei* and comparison of its transcription initiation region with that of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Gene*, **23**, 53-63.
- Visser,W., van Spronsen,E.A., Nanninga,N., Pronk,J.T., Gijs,K.J. und van Dijken,J.P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **67**, 243-253.
- Wallace,D.C. (2001). A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis. Found. Symp.*, **235**, 247-263.
- Wang,X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 2922-2933.
- Westermann,B. und Prokisch,H. (2002). Mitochondrial dynamics in filamentous fungi. *Fungal. Genet. Biol.*, **36**, 91-97.
- Whitaker,M. und Larman,M.G. (2001). Calcium and mitosis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **12**, 53-58.
- Wong,E.D., Wagner,J.A., Gorsich,S.W., McCaffery,J.M., Shaw,J.M. und Nunnari,J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.*, **151**, 341-352.
- Wong,E.D., Wagner,J.A., Scott,S.V., Okreglak,V., Holewinski,T.J., Cassidy-Stone,A. und Nunnari,J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.*, **160**, 303-311.

8. Literatur

Wu,D.Y., Ugozzoli,L., Pal,B.K., Qian,J. und Wallace,R.B. (1991). The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol.*, **10**, 233-238.

Yoon,Y., Krueger,E.W., Oswald,B.J. und McNiven,M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 5409-5420.

You,H.J., Swanson,R.L. und Doetsch,P.W. (1998). *Saccharomyces cerevisiae* possesses two functional homologues of *Escherichia coli* endonuclease III. *Biochemistry*, **37**, 6033-6040.

9. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ÄMM	äußere mitochondriale Membran
$\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP	$\alpha^{32}\text{P}$ -2'-Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
AM	Aufschlußmedium
AmAc	Ammoniumazetat
Amp	Ampicillin
AOX	alternative Oxidase
ADOA	Autosomale dominante optische Atrophie
AIF	Apoptoseinduzierender Faktor
APS	Ammoniumperoxidsulfat
As	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Chlor-4-Brom-3-indolylphosphat
BCS	Bathocuproindisulfonsäure
Ble	Phleomycin
BMM	Biomalz-Mais-Medium
BN	blau-nativ
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
Bsd	Blasticidin
CaM	Calmodulin
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cytochrom-c-Oxidase
CSPD	Dinatrium 3-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)-tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl)phenylphosphat
CuZnSOD	Kupfer, Zink-Superoxiddismutase
d	Tage
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DBQ	Decylubichinon
DQA	2- <i>n</i> -Decylchinazolin-4-yl-amin
DH	Dehydrogenase
DASPMI	Dimethylaminostyrylmethylpyridiniumiodid
DIG	Digoxigenin
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-triphosphate
DLP	„Dynamin-like protein“
DRP	„Dynamin-related protein“
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
em	Emission
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ex	Excitation
FZO	„fuzzy onions“
g	Gramm
GED	GTPase-Effektordomäne

GFP	grün fluoreszierendes Protein
gr	Mutante grisesa
GTC	Guanidinthiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
HUVEC	„Human umbilical vein endothelial cell“
IMM	innere mitochondriale Membran
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
juv	juvenil
l	Liter
LB	Luria Bertani
LBA	Luria Bertani Ampicillin
LBAB	Luria Bertani Ampicillin Blastocidin
LBAC	Luria Bertani Chloramphenicol
LBT	Luria Bertani Tetrazyklin
M	molar
mat	Kreuzungstyp
MFN	Mitofusin
MGM	„Mitochondrial genome maintenance“
min	Minute(n)
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
mtDNA	mitochondriale DNA
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	optische Dichte
OPL	„Oligo-primed labeling“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGFP	photoaktivierbares grün fluoreszierendes Protein
pH	potentia hydrogenii
pIDNA	„plasmid-like“ DNA
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkript PCR
SDS	Natriumdodezylsulfat
sen	seneszent
SG	Sammelgel
SHAM	Salizylhydroxaminsäure
shRNA	„small hairpin RNA“
siRNA	„small interfering RNA“
SK	Superkomplex
SSC	Natriumsalzzitrat
SSH	suppressive subtraktive Hybridisierung
STS	Staurosporin
Tab.	Tabelle

TAE	Tris-Azetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetrazyklin
TEZ	Transformationseffizienz
TG	Trenngel
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	„volume/volume“
Vol.	Volumen
Wr	Wuchsrate
Wt	Wildtyp
w/v	„weight/volume“
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-galactosid

10. Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. H. D. Osiewacz u. a. für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit und seine Anteilnahme an meiner akademischen Ausbildung.

Dr. Andrea Hamann u. a. für die Etablierung des effizienten Verfahrens zum Genaustausch in *Podospora anserina* und die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die mir sehr bei der Arbeit geholfen haben.

Birgit Kunstmann u. a. für die Etablierung der BN-PAGE und verwandter Techniken, von denen ich profitieren konnte.

Alexandra Werner, dass sie mich immer an ihren reichhaltigen Erfahrungen mit molekularbiologischen Methoden teilhaben lies.

Ali Tinazli u. a. für die Identifizierung, Klonierung und initiale Charakterisierung von *PaDnm1* im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Tina Hofmann, Ruhina Khalid, Theres Matjeka und Benjamin Gabriel, die im Rahmen ihrer Praktika wichtige Beiträge zur Charakterisierung von *PaDnm1* geleistet haben.

Dr. Markus Bucher u. a. für die Durchsicht der Arbeit und die vielen guten Ratschläge.

Dr. Ricardo Gredilla u. a. für das Protokoll zur Isolation gekoppelter *P. anserina*-Mitochondrien und viele aufschlussreiche Gespräche.

Dr. Koen Houthoofd und Annemie De Vreese für die exzellente Einweisung in die Technik der ATP-Bestimmung.

Dr. Frank Krause u. a. für die Vermittlung von fundiertem Proteomik-„Know How“.

Katrin Koch für die Demonstration der Mitochondrienfärbung bei *Aspergillus* und die großzügige Gabe von DASPMI-Lösung.

Dr. Marina Jendrach und Monika Vöth für gute Ratschläge zum Mitochondrienfärben und die großzügige Gabe von „Mitotracker Red CMXRos“-Lösung.

Marion Stöhr, Heinz Schewe und Manfred Ruppel für die Unterstützung bei den TEM-Analysen.

Prof. Dr. U. Brandt für die großzügige Gabe von 2-*n*-Decylchinazolin-4-yl-amin.

Meinen Arbeitskreiskolleginnen und -kollegen Aline Bender, Diana Brust, Dr. Markus Bucher, Jürgen Grief, Dr. Andrea Hamann, Karin Jezek, Tobias Kensche, Kristin Krause, Birgit Kunstmann, Sascha Ludwig, Gabriele Seelbach, Dr. Stefan W. Stumpferl, Thomas Veith und Alexandra Werner danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung bedanken.

11. Publikationsliste

- Osiewacz,H.D. und Scheckhuber C.Q. (2002): Senescence in *Podospora anserina*. In: Molecular Biology of Fungal Development, Osiewacz H.D. (Hrsg.), Marcel Dekker, New York: 87-108.
- Borghouts,C., Scheckhuber,C.Q., Stephan,O. und Osiewacz,H.D. (2002). Copper homeostasis and aging in the fungal model system *Podospora anserina*: differential expression of *PaCtr3* encoding a copper transporter. *Int. J. Biochem Cell Biol.*, **34**, 1355-1371.
- Borghouts,C., Scheckhuber,C.Q., Werner,A. und Osiewacz,H.D. (2002). Respiration, copper availability and SOD activity in *P. anserina* strains with different lifespan. *Biogerontology*, **3**, 143-153.
- Krause,F., Scheckhuber,C.Q., Werner,A., Rexroth,S., Reifschneider,N.H., Dencher,N.A. und Osiewacz,H.D. (2004). Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 26453-26461.
- Scheckhuber, C.Q. (2005) Report on the 14th Annual Meeting of the German Society for Geriatric Research. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **1**.
- Scheckhuber, C.Q. und Osiewacz, H.D. (2005) MiMage: a Pan-European project on the role of mitochondria in aging. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **20**.
- Scheckhuber, C.Q. (2005) Mitochondrial Dynamics in Cell Life and Death. *Sci. Aging Knowledge Environ.*, **47**.

12. Lebenslauf



Name:	Christian Quintus Scheckhuber
Geburtsdatum:	15. November 1973
Geburtsort:	Frankfurt am Main
Eltern:	Monika B. E. Scheckhuber-Stieb und Wolfgang R. Stieb
Schulbildung:	
1980-1984	Grundschule, Friedrich-Ebert-Schule, Bad Homburg
1984-1987	Gymnasium, Kaiserin-Friedrich-Schule, Bad Homburg
1987-1990	Realschulzweig der Philipp-Reis-Schule, Friedrichsdorf
1990-1993	Berufliches Gymnasium, Georg-Kerschensteiner- Schule, Bad Homburg
Hochschulausbildung:	
1995-2001	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
2000-2001	Anfertigung einer experimentellen Diplomarbeit im AK „Molekulare Entwicklungsbiologie und Biotechnologie“ bei Prof. Dr. H. D. Osiewacz Thema: „Untersuchungen zur Bedeutung von mitochondrialem oxidativen Stress für Alterungs- prozesse bei dem Ascomyzeten <i>Podospira anserina</i> “
Juni 2001	Diplomabschluss Gesamtnote: sehr gut Erworbener Titel: Diplom-Biologe
2001-2005	Anfertigung einer experimentellen Doktorarbeit im AK von Prof. Dr. H. D. Osiewacz
Berufliche Ausbildung:	
ab Juli 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im AK von Prof. Dr. H. D. Osiewacz