

Untersuchungen zur Bedeutung von Superoxid-Dismutasen für die Alterung von *Podospora anserina*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Sandra Zintel
aus Mühlheim am Main

Frankfurt am Main 2012
(D30)

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

Dekan: Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz

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

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation:

Konvention

In dieser vorliegenden Dissertation werden Gene kursiv (z. B. *PaSod1*, *PaPrx1*) und Proteine mit Großbuchstaben (z. B. PaSOD1, PaPRX1) dargestellt. Dabei kürzen die ersten zwei Buchstaben den Artnamen der Spezies ab. Stämme, die eine Deletion oder Überexpression eines Gens aufweisen, werden mit Δ vor dem Namen des Gens bzw. hinter dem Gen mit _OEx bezeichnet (z. B. $\Delta PaSod1$, *PaPrx1*_OEx).

*„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig, man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach Zeit und Umständen das Mögliche getan hat“*

J W Goethe, Italienreise (1787)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Alterungsprozess.....	1
1.2	Die „Freie-Radikal-Theorie des Alterns“ (FRTA)	2
1.3	Entstehung und Reaktivität von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	3
1.4	Mechanismen zur Regulation des ROS-Spiegels	7
1.5	Der filamentöse Ascomycet <i>Podospora anserina</i> als ein Alterungsmodell.....	13
2	Problemstellung	17
3	Material	18
3.1	Bezugsquellen und Geräte.....	18
3.2	Sonstige Materialien.....	19
3.3	Chemikalien	19
3.4	Puffer und Lösungen.....	20
3.5	Anzuchtsmedien	23
3.6	Verwendete Kits	24
3.7	Verwendete Stämme.....	24
3.8	Plasmide.....	24
3.9	Oligonukleotide	25
3.10	Enzyme.....	26
3.11	Größenstandards	26
3.12	Antikörper.....	26
3.13	Verwendete Computerprogramme.....	27
4	Methoden	28
4.1	Nukleinsäure-spezifische Methoden	28
4.2	RNA-spezifische Methoden	31
4.3	Protein-spezifische Methoden	32

4.4	<i>Podospora anserina</i> -spezifische Methoden	36
5	Ergebnisse	39
5.1	Die Superoxid-Dismutasen (PaSODs) in <i>Podospora anserina</i>	39
5.2	Die Lokalisation der Superoxid-Dismutasen.....	40
5.3	Manipulation der PaSOD-Menge.....	43
5.4	Einfluss der PaSODs auf die ROS-Toleranz	48
5.5	Einfluss auf Proteinschäden	53
5.6	Einfluss auf die Lebensspanne.....	55
5.7	Einfluss der <i>PaSod</i> -Modulation auf andere Komponenten des ROS-Abbausystems	57
6	Diskussion.....	66
6.1	Die Superoxid-Dismutasen (PaSODs) von <i>P. anserina</i>	66
6.2	Die Modulation der <i>PaSods</i> in <i>P. anserina</i>	70
7	Ausblick	81
8	Zusammenfassung	84
9	Literaturverzeichnis	86
10	Anhang	96
10.1	Ergänzende Abbildungen.....	96
10.2	Abkürzungsverzeichnis	104
10.3	Abbildungsverzeichnis	104
10.4	Tabellenverzeichnis	106
11	Danksagung	107
12	Publikationsliste	108
13	Lebenslauf	109

1 Einleitung

1.1 Der Alterungsprozess

Das Altern ist ein fortschreitender dynamischer biologischer Prozess der meisten Lebewesen, der unumkehrbar ist und letztlich zum Absterben einzelner Zellen bis hin zum ganzen Organismus führt. Die Lehre des Alterns, die Gerontologie (gr. gerōn „Greis“, logos „Lehre“), beschäftigt sich mit den Ursachen und den daraus resultierenden Folgen, der Senescenz (lat. Senescere „alt werden“). Der Alterungsprozess geht einher mit einer kontinuierlichen Abnahme physiologischer Funktionen und einer Zunahme der Krankheitsanfälligkeit (Morbidität) sowie der Sterblichkeit des alternden Organismus (Kirkwood und Austad, 2000). Dabei liegt dem Alterungsprozess eine Reihe von exogenen wie auch endogenen Faktoren zu Grunde. Zu den exogenen Faktoren gehören unter anderem Umwelteinflüsse wie das Nahrungsangebot, Temperaturbedingungen (bspw. Hitze- oder Kältestress), Strahlungsexposition oder chemische Stressfaktoren wie toxische Substanzen. Zu den endogenen Faktoren zählen unter anderem die genetische Veranlagung, Krankheiten, oxidativer Stress sowie die physiologischen Prozesse in der Zelle. Eine Übersicht der verschiedenen Einflüsse, die den Alterungsprozess beeinflussen, ist in Abb. 1 dargestellt.



Abb. 1: Einflüsse, die den Prozess des Alterns beeinflussen. Der Alterungsprozess wird durch zahlreiche Prozesse und Einflüsse vorangetrieben. Hierzu zählen unter anderem exogene Faktoren (bspw. Umwelteinflüsse, chemische und toxische Substanzen, Nahrungsangebot, Temperatur oder oxidativer Stress) wie auch endogene Faktoren (bspw. Krankheiten, Mutationen, oxidativer Stress, physiologische Zellfunktionsverluste oder genetische Veranlagung), die den Verlauf des Alterungsprozess durch seine komplexen zellulären und molekularen Veränderungen beschleunigen können.

Die Ursachen und Folgen des Alters sind hochkomplex und beinhalten eine Vielzahl von noch unverstandenen Mechanismen. Es gibt weit mehr als 300 verschiedene Theorien des Alterns

(Medvedev, 1990), aber keine dieser Theorien alleine ist in der Lage das Altern schlüssig zu erklären.

1.2 Die „Freie-Radikal-Theorie des Alterns“ (FRTA)

Unter all den monokausalen Theorien des Alterns, die vorgeschlagen wurden, ist die „free radical theory of aging“ (FRTA), also die „Freie-Radikal-Theorie des Alterns“ oder auch die „oxidative-Stress-Theorie“, ohne Zweifel die meist untersuchte und anerkannte Theorie des Alterns. Diese Theorie, von D. Harman 1956 publiziert, besagt, dass Altern und die damit assoziierten degenerativen Erkrankungen grundsätzlich auf die schädliche Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS: engl. „reactive oxygen species“) auf Zellbestandteile wie DNA, Lipide und Proteine zurückzuführen sind (Harman, 1956).

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden Sauerstoff-haltige Moleküle bezeichnet, die auf Grund ihrer reaktiven Eigenschaften leicht mit anderen Molekülen in ihrer Nähe reagieren können. Zu den ROS zählen unter anderem freie Radikale wie das Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Peroxylradikal ($ROO\cdot$), Hydroxylradikal ($OH\cdot$) und stabile molekulare Oxidantien wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Ozon (O_3). In der Zelle wird etwa 1 bis 2 % des reduzierten Sauerstoffs in der Atmungskette zu Superoxid umgewandelt (Chance et al., 1979; Culotta et al., 2006). Das generierte Superoxid ist dann in der Lage, die mitochondriale DNA (mtDNA), Lipide, Proteine und andere Moleküle zu schädigen.

Später entwickelte sich basierend auf der „Freien-Radikal-Theorie des Alterns“ eine auf die Mitochondrien bezogene Alterungstheorie, die „mitochondrial free radical theory of aging“ (MFRTA). Diese ebenfalls von D. Harman aufgestellte Theorie besagt, dass das Altern hauptsächlich auf der ROS-Produktion durch den Elektronentransport der Atmungskette in den Mitochondrien und ihre schädliche Reaktion mit anderen Molekülen beruhe (Harman, 1972).

In den Mitochondrien, die als die Kraftwerke der Zelle bezeichnet werden, werden durch die Generierung von ATP unter anderem Superoxide gebildet. Gewöhnlich werden in der Atmungskette der Mitochondrien vier Elektronen und Wasserstoffatome stufenweise über mehrere Proteinkomplexe auf Sauerstoff übertragen, wobei Energie in Form von ATP und Wasser entsteht. Unter bestimmten Umständen werden in der Elektronentransportkette aber nur ein statt vier Elektronen übertragen und Hydroxylradikale oder Superoxide entstehen. Die Generierung des Superoxids geschieht in der Atmungskette an Komplex I und

Komplex III, wobei das Superoxid in die Matrix bzw. an Komplex III auch zum Intermembranraum hin produziert wird (Han et al., 2001 und 2003; Miwa und Brand, 2005; Muller et al., 2004; St-Pierre et al., 2002). Werden hingegen zwei statt vier Elektronen übertragen, kommt es zur Generierung von Wasserstoffperoxid. Die FRTA prognostiziert, dass der Verlust von Enzymen, die ROS abbauen, zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress führt und der Organismus nicht mehr ausreichend in der Lage ist, die Zellen zu entgiften. Folglich kommt es zu einer Anhäufung an oxidativen Schäden, was in einer verkürzten Lebensspanne des Organismus resultiert. Die Generierung des Superoxids ist hierbei nur ein Beispiel für den Entstehungsort von ROS und seine schädlichen Eigenschaften. Im nächsten Kapitel wird nun detaillierter auf die reaktiven Sauerstoffspezies, ihre Entstehungsorte und Eigenschaften eingegangen.

1.3 Entstehung und Reaktivität von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden Sauerstoff-haltige Moleküle bezeichnet, die auf Grund ihrer reaktiven Eigenschaften leicht mit anderen Molekülen, wie Nukleinsäuren, Proteine und Lipide, reagieren können. Zu diesen reaktiven Sauerstoffspezies gehören unter anderem das Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Peroxylradikal ($ROO\cdot$), Alkoxyradikal ($RO\cdot$), Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$), Hydroxylradikal ($OH\cdot$) sowie stabile molekulare Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^-$), Hydroperoxid ($ROOH$), Ozon (O_3), Hypochlorit-Anion (OCl^-) und angeregte Sauerstoffmoleküle (Singulett-Sauerstoff (1O_2)). Diese Moleküle werden sowohl intrazellulär bei zellphysiologischen Stoffwechselprozessen (bspw. in der Atmungskette oder durch die Photosynthese) als auch extrazellulär zur Abwehr und zum Schutz vor Feinden oder durch äußere Einflüsse wie UV-Licht gebildet. Eine Zusammenfassung der drei bedeutendsten reaktiven Sauerstoffspezies, ihre Entstehung und Eigenschaften befindet sich in Tab. 1.

Tab. 1: Die drei bedeutendsten reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal). Aufgeführt sind die Entstehungsorte, Eigenschaften und die zu den Aussagen dazugehörigen Quellen.

ROS	Entstehung und Eigenschaften	Referenz
Superoxid-anion (O₂^{·-})	Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette durch die Ubichinon-Oxidoreduktase oder NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) oder durch die Photooxidationsreaktion in Chloroplasten (Mehler Reaktion).	Han et al., 2001 und 2003; Mehler, 1951; Mehler und Brown, 1952; Miwa und Brand, 2005; Miwa et al., 2003; Muller et al., 2004; St-Pierre et al., 2002
	Weitere Enzyme, die Superoxid bilden sind u. a. die Xanthindehydrogenasen, NADPH-Oxidasen, NO-Synthasen, Lipoxygenasen und Glutathion-Reduktasen.	Cai und Harrison, 2000; Droege, 2002; Fleming und Busse, 2001; Imlay und Fridovich, 1991; Massey et al., 1969; Meneshian und Bulkley, 2002
	O ₂ ^{·-} kann nicht die Doppellipidschicht durchdringen, ist jedoch membrangängig durch Anion-Kanäle der Plasmamembran.	Fridovich, 1986; Lynch und Fridovich, 1978; Mao und Poznansky, 1992
	O ₂ ^{·-} ist nicht sehr reaktiv, kein stabiles Radikal in wässriger Lösung. Die Halbwertszeit liegt bei etwa 10 ⁻⁶ bis wenigen Sekunden.	Bielski, 1985; Florence, 1990; Ross und Moldeus, 1991; Sawyer und Valentine, 1981; Sies und Stahl, 1995; Valentine et al., 1984
Wasserstoffperoxid (H₂O₂)	Wasserstoffperoxid entsteht durch den Superoxid-Dismutasen-vermittelten Abbau von Superoxid.	Farr und Kogoma, 1991
	Zu den Entstehungsorten gehören die Glyoxisomen, Peroxisomen, Mitochondrien und Chloroplasten u. a. durch Oxidasen.	Scandalios, 2005
	H ₂ O ₂ ist membrangängig und hochpermeabel.	Dreher und Junod, 1995; Halliwell und Gutteridge, 1986
Hydroxylradikal (OH[·])	Die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals erfolgt hauptsächlich durch die Oxidation von reduzierten Kupfer- oder Eisen-Ionen (ggf. aus der Haber-Weiss-Reaktion mit H ₂ O ₂ im Zuge der Fenton-Reaktion).	Farr und Kogoma, 1991; Haber und Weiss, 1932; Kwan und Voelker, 2003; Storz und Imlay, 1999
	Des Weiteren entstehen Hydroxylradikale durch den Abbau von O ₃ im apoplastischen Raum.	Scandalios, 2005
	Das Hydroxylradikal gehört zu den reaktivsten Sauerstoff-Derivaten.	Farr und Kogoma, 1991; Kwan und Voelker, 2003
	Es reagiert mit diffusionslimitierter Geschwindigkeit (=ortsspezifisch) mit fast allen Biomolekülen.	Dreher und Junod, 1995; Seaver und Imlay, 2001; Singh, 1982; Storz und Imlay, 1999
	Das Hydroxylradikal ist aufgrund seiner Reaktivität kurzlebig (10 ⁻⁶ Sekunden) und reagiert durch seinen geringen Diffusionsradius in nächster Umgebung des Entstehungsortes.	Michelson, 1977; Pryor, 1986

Das Superoxidanion entsteht hauptsächlich als Nebenprodukt der Atmungskette an Komplex I und Komplex III in den Mitochondrien und gelangt in die Matrix bzw. auch in den Intermembranraum (Han et al., 2001 und 2003; Miwa und Brand, 2005; Miwa et al., 2003; Muller et al., 2004; St-Pierre et al., 2002). Die Halbwertszeit des Superoxidanions liegt bei etwa 10⁻⁶ bis wenigen Sekunden und wird daher als ein nicht sehr reaktives Radikal eingestuft (Bielski, 1985; Florence, 1990; Ross und Moldeus 1991; Sies und Stahl, 1995;

Valentine et al., 1984). Auch ist es nicht in der Lage durch die Doppelmembranschicht der Mitochondrien zu diffundieren. Jedoch kann es durch Anionen-Kanäle aus den Mitochondrien gelangen und so seinen Reaktionsradius erweitern (Fridovich, 1986; Lynch und Fridovich, 1978; Mao und Poznansky, 1992). Zusammen mit Wasserstoffperoxid erlangt das Superoxid seine hohe Zytotoxizität durch die Generierung des sehr reaktiven Hydroxylradikals (Abb. 2) in der Haber-Weiss-/Fenton-Reaktion (Benov, 2001; Fenton, 1894; Haber und Weiss, 1932; Halliwell, 1978; McCord und Day, 1978).

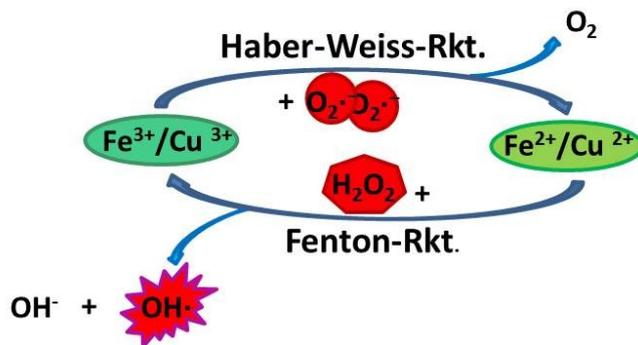


Abb. 2: Schematische Darstellung der Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion. In der Haber-Weiss-Reaktion werden Kupfer- oder Eisen-Ionen ($\text{Cu}^{3+}/\text{Fe}^{3+}$) durch Superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) reduziert (Haber und Weiss, 1932). Diese reduzierten Kupfer- oder Eisen-Ionen ($\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$) können dann zusammen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in der Fenton-Reaktion (Oxidationsreaktion) das hoch reaktive Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) bilden (Farr und Kogoma, 1991; Fenton, 1894; Kwan und Voelker, 2003; Storz und Imlay,

1999). Als Schutzmechanismus zur Verhinderung der Entstehung des Hydroxylradikals stehen der Zelle Superoxid-Dismutasen und Katalasen sowie Peroxidasen zur Verfügung, die das Superoxid bzw. das Wasserstoffperoxid vollständig abbauen.

Das Wasserstoffperoxid entsteht in der Zelle hauptsächlich durch den Superoxid-Dismutasen-vermittelten Abbau von Superoxid sowie durch verschiedene Oxidasen (bspw. in Glyoxisomen, Peroxisomen, Mitochondrien oder Chloroplasten), die Wasserstoff von verschiedenen Substraten abspalten und durch die Übertragung von zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid umwandeln (Farr und Kogoma, 1991). Das Wasserstoffperoxid als ein starkes Oxidationsmittel kann aufgrund seiner apolaren Eigenschaften und mäßigen Reaktivität vom Entstehungsort aus leicht durch Membranen diffundieren und mit entfernteren Molekülen reagieren (Dreher und Junod, 1995; Halliwell und Gutteridge, 1986).

Die Hydroxylradikale entstehen hauptsächlich durch die Oxidation von reduzierten Kupfer- oder Eisen-Ionen ($\text{Cu}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$) (ggf. aus der Haber-Weiss-Reaktion) mit H_2O_2 im Zuge der Fenton-Reaktion (Farr und Kogoma, 1991; Fenton, 1894; Haber und Weiss, 1932; Kwan und Voelker, 2003; Storz und Imlay, 1999). Aufgrund seiner hohen Reaktivität ist dieses Sauerstoffradikal sehr kurzlebig (10^{-6} Sekunden) und reagiert durch seinen daraus resultierenden geringen Diffusionsradius ortsspezifisch (Dreher und Junod, 1995; Kwan und

Voelker, 2003; Michelson, 1977; Pryor, 1986; Seaver und Imlay, 2001; Singh, 1982). Das Hydroxylradikal gilt unter den ROS als besonders toxisch, da es zum einem besonders reaktiv ist und es zum anderem keine effektiven spezifischen Schutzmechanismen, wie für andere reaktive Sauerstoffspezies, gibt.

Im Allgemeinen entstehen ROS durch eine Vielzahl von verschiedenen Stoffwechselprozessen oder als Nebenprodukt von verschiedenen Reaktionen. Schematisch in einer Abbildung ist ein kleiner Ausschnitt der Entstehung und des Abbaus von ROS dargestellt (Abb. 3).

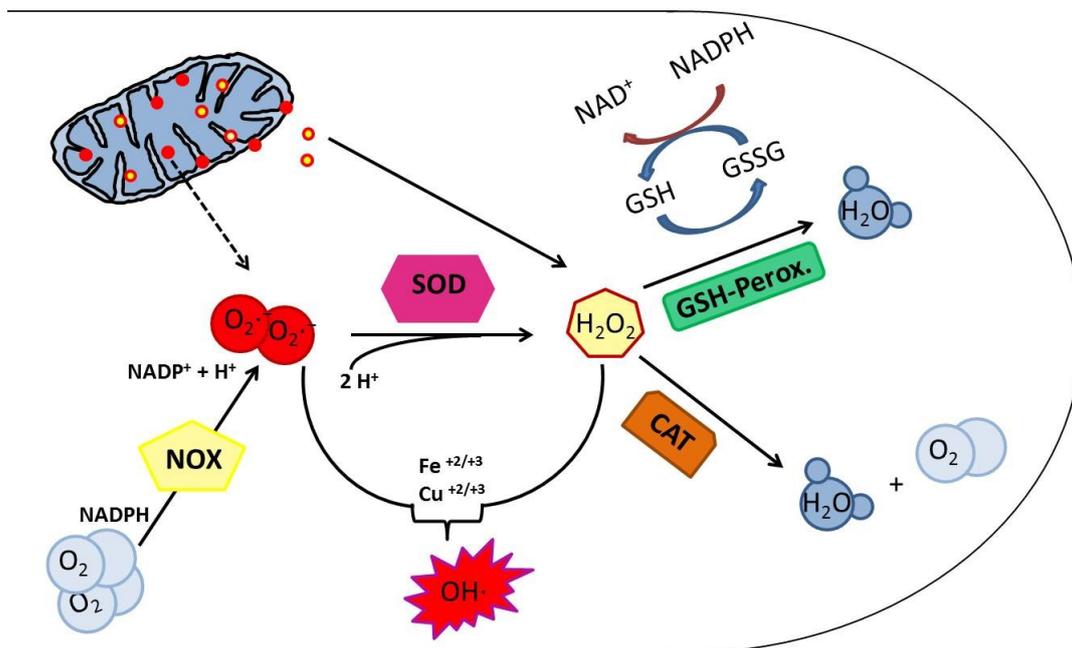


Abb. 3: Schematische Darstellung der Entstehung und des Abbaus von ROS. In der Zelle entsteht eine Vielzahl von ROS durch physiologische Prozesse. Hier dargestellt ist ein kleiner Ausschnitt der Generierung und des Abbaus von Superoxid, Wasserstoffperoxid und die Entstehung des Hydroxylradikals mit besonderem Fokus auf die Rolle der Mitochondrien. Beispielsweise entsteht in der Zelle Superoxid ($O_2^{\cdot-}$) durch die NOX (NADPH-Oxidase) oder in der Atmungskette der Mitochondrien, welches durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt wird. Anschließend katalysieren Katalasen (CAT) und/oder Glutathion-Peroxidasen (GSH-Perox.) den Abbau des Wasserstoffperoxids zu Wasser (H_2O) und molekularem Sauerstoff (O_2). Dabei benötigen GSH-Peroxidasen Glutathion (GSH), das durch die Oxidation eines weiteren Glutathions eine Disulfidbrückenbindung eingeht (GSSG). Unter Energieverbrauch mittels NADPH wird die Disulfidbrücke durch die Reduktion der Glutathionmoleküle wieder gelöst. Sowohl der Abbau des Superoxids als auch des Wasserstoffperoxids ist besonders wichtig, da sonst in der Haber-Weiss-/Fenton-Reaktion durch die Reaktion mit Metall-Ionen ($Fe^{+2/+3}$, $Cu^{+2/+3}$) das hoch reaktive Hydroxylradikal ($OH\cdot$) entsteht.

ROS entsteht aber nicht nur als ein schädliches Nebenprodukt, sondern wird auch gezielt erzeugt, um als Signalmolekül zu wirken (Aguirre et al., 2005; Carol und Dolan, 2006; Finkel, 2003; Halliwell und Gutterige, 1989; Lambeth, 2004). Beispielsweise generiert die NADPH-Oxidase (NOX) Superoxid und spielt eine zentrale Rolle in der mikrobiellen Entwicklung.

Bei *Neurospora crassa* und *Podospora anserina* führt die Deletion dieser NADPH-Oxidasen zu einer Beeinträchtigung der sexuellen Reproduktion, des Hyphenwachstums und der Keimung der Sporen (Cano-Dominguez et al., 2008; Malagnac et al., 2004). In anderen Pilzen, *Epichloe festucae*, *Magnaporthe grisea* oder beim Schleimpilz *Dictyostelium discoideum*, ist die Funktion der NOXs essentiell für das koordinierte Hyphenwachstum, das Eindringen in die Wirtspflanze, sowie ebenfalls für die sexuelle Entwicklung und Sporenbildung (Lardy et al., 2005; Tanaka et al., 2006).

Die NADPH-Oxidasen nehmen aber nicht nur in mikrobiellen Eukaryoten wie Pilzen, sondern auch in hoch entwickelten Organismen wie Pflanzen, Insekten, Fischen und Säugern eine wichtige Funktion ein. Die Regulation und Vielfältigkeit der NOX erlaubt vielen Eukaryoten eine gezielte räumliche und zeitliche Produktion von ROS, sodass ihre Funktion und Wirkungsweise in verschiedenen biologischen Systemen, aber auch innerhalb des gleichen Organismus, unterschiedlich ist (referiert in Aguirre und Lambeth, 2010).

Zu den Funktionen der NOX gehören unter anderem das Abtöten von Krankheitserregern, Auslösung apoptotischer Prozesse, Vernetzung der Proteine der extrazellulären Matrix, Induktion und Aufrechterhaltung der Entwicklung und Morphogenese sowie die Steuerung von intra- und interzellulären Signalwegen durch die spezifische Oxidation von Redox-Sensor-Proteinen und Transkriptionsfaktoren.

Um die Balance zwischen ROS als Signalmolekül und der schädlichen Wirkung auf Moleküle der Zelle zu wahren, haben Organismen eine Vielzahl von Abwehrmechanismen entwickelt, um ROS abzubauen.

1.4 Mechanismen zur Regulation des ROS-Spiegels

Viele aerobe Organismen haben mehrere spezialisierte Mechanismen entwickelt, um sich vor den potenziell schädlichen Auswirkungen von ROS zu schützen. In der Literatur werden diese Mechanismen als ROS-Abwehrsysteme (engl. „ROS scavenger systems“) beschrieben. Durch diese Bezeichnung wird fälschlicherweise nur der Abbau von ROS als schädliches Molekül in den Vordergrund gestellt und dabei wird nicht berücksichtigt, dass ROS auch als Signalmolekül fungiert und ein wichtiger Bestandteil des Organismus darstellt. Viel passender wäre hier von einem Mechanismus zu sprechen, der dafür sorgt, dass der ROS-Spiegel des Organismus reguliert wird. Zu diesen ROS-regulierenden Mechanismen gehören zum einen die enzymatischen und zum anderen die nicht-enzymatischen Antioxidantien. Zu den Letzteren gehören die sogenannten Radikalfänger, wie Vitamin C und E, Glutathion,

Cystein, Harnsäure, Coenzym Q, Melatonin, Carotinoide und verschiedenste polyphenolische Verbindungen (Scandalios, 2005). Sie sind in großen Mengen in der Zelle und in den Zellkompartimenten verteilt. Viel bedeutender und effektiver zur Regulation des ROS-Spiegels stehen den Zellen enzymatische antioxidative Schutzmechanismen wie Superoxid-Dismutasen, Katalasen, Glutathion-Peroxidasen und Peroxiredoxine zur Verfügung, die übergreifend schädliche reaktive Sauerstoffspezies zu weniger oder völlig harmlosen Molekülen abbauen (Scandalios, 2005). In den nächsten Kapiteln soll nun detaillierter auf die ROS-regulierenden Enzyme Katalasen und Superoxid-Dismutasen eingegangen werden.

1.4.1 Die Katalasen

Die Katalase ist das zuerst entdeckte antioxidative Enzym, das charakterisiert wurde. Seine Bezeichnung erhielt es 1900 von Loew, der bemerkte, dass „keine Pflanze und kein Tier zu existieren scheint, das ohne ein solches Enzym ist“ (Loew, 1900). Aber nicht nur in aeroben, sondern auch in einigen anaeroben Organismen, kommen Katalasen vor (Zamocky et al., 2008). Das Enzym Katalase gehört zu der Gruppe der Oxidoreduktasen und katalysiert die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und molekularem Sauerstoff (O_2) (Abb. 4).

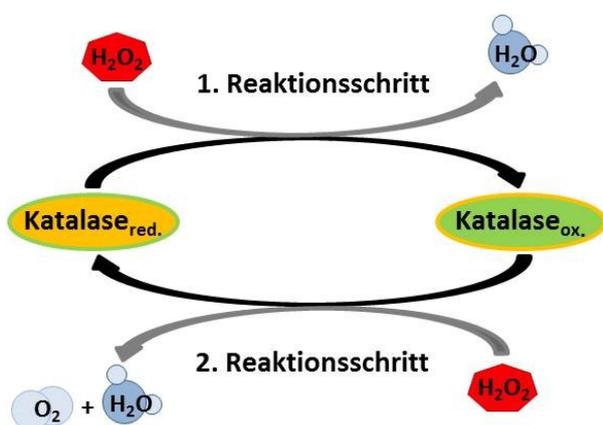


Abb. 4: Enzymatischer Abbau des Wasserstoffperoxids durch Katalasen. Die Katalasen katalysieren die Disproportionierung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Wasser (H_2O) und molekularem Sauerstoff (O_2). Der Abbau des Wasserstoffperoxids erfolgt in zwei Reaktionsschritten. Zunächst wird die Katalase ($\text{Katalase}_{\text{red.}}$) durch ein Molekül H_2O_2 oxidiert ($\text{Katalase}_{\text{ox.}}$) und Wasser entsteht (1. Reaktionsschritt). In einem darauffolgenden Schritt (2. Reaktionsschritt) wird die oxidierte Katalase durch ein weiteres H_2O_2 -Molekül wieder reduziert ($\text{Katalase}_{\text{red.}}$). Dabei wird Sauerstoff gleichzeitig oxidiert und als Endprodukt entsteht molekularer Sauerstoff und Wasser. Die Reaktionsgleichung dieser zwei Schritte lautet dabei: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

Der Abbauweg des Wasserstoffperoxids verläuft dabei in zwei Schritten. Im ersten Reaktionsschritt wird die Katalase durch Wasserstoffperoxid oxidiert und Wasser entsteht. In den darauf folgenden zweiten Schritt wird das Enzym zusammen mit einem weiteren Wasserstoffperoxid-Molekül reduziert und gleichzeitig Sauerstoff oxidiert. Als Produkt

entsteht ein weiteres Wasser-Molekül. Neben den Katalasen gehören unter anderem auch Peroxidasen (Glutathion-Peroxidase) und Peroxiredoxine zu den Wasserstoffperoxid-abbauenden Enzymen. Im Gegensatz zu Katalasen benötigen Glutathion-Peroxidasen und Peroxiredoxine zur Reduzierung sogenannte Reduktionsäquivalente wie Glutathion bzw. Thioredoxin. Diese Reduktionsäquivalente dienen dabei als Elektronendonatoren und bilden an ihrem Cysteinrest Disulfidbrücken aus. Die oxidierten Thioredoxine und Glutathione werden unter Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wieder reduziert. Da bei der Detoxifikation von Wasserstoffperoxid durch Katalasen keine Reduktionsäquivalente verbraucht werden, ist dieser Abbau energiesparender.

Die Katalasen werden anhand ihrer Sequenz und Struktur in drei Klassen unterteilt: (i) monofunktionale Häm-abhängige Katalasen, (ii) bifunktionale Häm-abhängige Katalase-Peroxidasen und (iii) Mangan-abhängige Katalasen. Diese Einteilung in drei Klassen beruht zum einen auf die Metallgruppe im aktiven Zentrum und zum anderen auf ihre weitere funktionale Aktivität als Peroxidase (Brown-Peterson und Salin, 1995; Chelikani et al., 2004; Fraaije et al., 1996; Rocha und Smith, 1997; Terzenbach und Blaut, 1998).

Durch die bifunktionale Katalase-Peroxidaseaktivität wird als Substrat ein Peroxid (ROOH) an die Katalase gebunden. Durch die Oxidation durch einen Wasserstoff-Donator (DH_2) wird das reduzierte Substrat (ROH) wieder freigesetzt. Da die Rückbildung des Wasserstoff-Donators Energie benötigt, ist diese Art des Wasserstoffperoxid-Abbaus energetisch ungünstiger als bei der monofunktionalen Aktivität der Katalase.

Die am besten charakterisierte Klasse der Katalasen ist die Häm-abhängige Katalase, die in den unterschiedlichsten Organismen, wie Tiere, Pilze, Pflanzen und Prokaryoten zu finden ist (Chelikani et al., 2004). Das Enzym setzt sich aus vier Monomeren zu einem Tetramer zusammen, wobei jedes Monomer eine prosthetische Häm-Gruppe im aktiven Zentrum besitzt (Regelsberger et al., 2002). Katalasen kommen häufig an H_2O_2 -reichen Orten vor wie beispielsweise in den Peroxisomen, Glyoxisomen sowie im Cytosol oder werden sogar sekretiert. Vor allem sind sie stark in Leber-, Nieren- und Blutzellen angereichert.

Da ROS an zellphysiologischen Prozessen, wie Entzündungsreaktionen, Krebsbildung, Apoptose und dem Altern beteiligt sind, sind Katalasen sowie auch Superoxid-Dismutasen bedeutende Faktoren bei diesen Vorgängen, da sie die Bildung des Hydroxylradikals unterbinden.

1.4.2 Die Superoxid-Dismutasen

Superoxid-Dismutasen (SODs) kommen in jedem Sauerstoff-metabolisierenden Organismus vor. Erstmals wurde dieses Enzym 1969 von McCord und Fridovich charakterisiert (McCord und Fridovich, 1969). Die SODs gehören zu den Metalloenzymen der Enzymklasse der Oxidoreduktasen und katalysieren die Disproportionierung von Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) (Abb. 5).

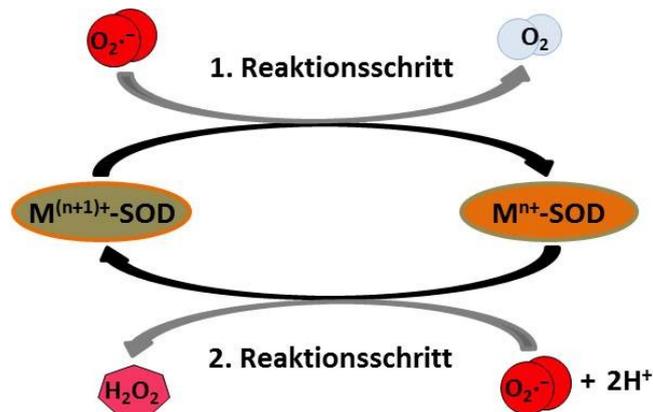


Abb. 5: Enzymatischer Abbau des Superoxids durch Superoxid-Dismutasen. Die Superoxid-Dismutasen (SODs) katalysieren die Disproportionierung (Dismutation) von Superoxid-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2). Im ersten Schritt des Dismutationszyklus wird das Superoxid an den Co-Faktor M gebunden. Anschließend kommt es zu einer Übertragung von Elektronen und zu einer Protonierung des Liganden. Dabei entsteht die oxidierte Form der SOD (M^{n+} -SOD) und Sauerstoff. Durch ein weiteres Superoxid-Molekül und zwei Protonen

($2H^+$) wird die oxidierte Form der SOD wieder in reduziert Ausgangsform ($M^{(n+1)+}$ -SOD) unter Bildung des Wasserstoffperoxids zurückgeführt. Die Reaktionsgleichung dieser zwei Schritte lautet: $2 O_2^{\cdot-} + 2 H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. M ist der Co-Faktor der SOD und kann bspw. Kupfer ($n=1$), Mangan ($n=2$), Eisen ($n=2$) oder Nickel ($n=2$) sein.

Das entstandene Wasserstoffperoxid kann dann weiter durch Katalasen, Peroxidasen oder Peroxiredoxine zu Wasser und molekularem Sauerstoff umgewandelt werden. Die Superoxid-Dismutasen werden an Hand ihres Co-Faktors, ihrer Lokalisation und Cyanid-Sensitivität klassifiziert. Als Co-Faktor besitzen SODs Kupfer/Zink- (Cu/ZnSOD), Mangan/Eisen- (Mn/FeSOD), Nickel- (NiSOD) oder nur Eisen- (FeSOD) Ionen in ihrem katalytischen Zentrum. In den meisten Eukaryonten wie bspw. in *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* oder in Säugern liegt die Cu/ZnSOD meist cytoplasmatisch in der Zelle vor (Hwang et al., 2002; Jensen und Culotta, 2005; Larsen, 1993; McCord und Fridovich, 1969). Es gibt aber auch Cu/ZnSOD-Isoformen, die sekretiert und als EC-SOD (extrazelluläre SOD) bezeichnet werden (Hjalmarsson et al., 1987; Hwang et al., 2002; Martchenko et al., 2004; Martino et al., 2002; Munkres, 1990; Stralin et al., 1995). Zu einem geringen Anteil können Cu/ZnSODs auch im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert sein (McCord und Fridovich, 1969; Okado-Matsumoto und Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001). In der Matrix der Mitochondrien ist ausschließlich die MnSOD zu finden (Brouwer et al., 2003; Hwang et al., 1999; Ravindranath und Fridovich, 1975). MnSODs kommen aber auch im Cytoplasma vor (Brouwer et al., 2003; Keele et al., 1970; Lamarre et al., 2001). In der Regel besitzen die

meisten Organismen eine Cu/ZnSOD im Cytoplasma und eine MnSOD in den Mitochondrien. SODs mit Eisen- oder Nickel-Ionen als Co-Faktoren sind in Bakterien (*Escherichia coli* und *Streptomyces seoulensis*) intrazellulär oder in Chloroplasten einiger Algen und höherer Pflanzen lokalisiert (Bannister et al., 1987; Barondeau et al., 2004; Yost und Fridovich, 1973). Die mitochondrialen MnSODs weisen eine Cyanid-Resistenz auf, während die Cu/ZnSODs des Cytosols bzw. des mitochondrialen Intermembranraumes gegenüber Cyanid sensitiv sind (Munkres, 1992).

Da die Superoxid-Dismutasen beim ROS-Abbau den ersten Entgiftungsschritt darstellen und die Zellen so vor ROS-Schäden schützen, wurden sie im Bezug der „Freien-Radikal-Theorie des Alterns“ ausgiebig untersucht. Die FRTA prognostiziert, dass der Verlust der Aktivität dieses Enzyms eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress verursacht und dazu führt, dass der Organismus nicht mehr ausreichend in der Lage ist, das entstehende Superoxid zu entgiften. Folglich kommt es zu einer Anhäufung oxidativer Schäden, was in einer verkürzten Lebensspanne des Organismus resultiert. Um dieser These nachzugehen, wurden zahlreiche Analysen an verschiedensten Modellorganismen durchgeführt. Für einige Modelle und Analysen scheint diese Theorie des Alterns zu stimmen. So zeigten zahlreiche Studien an *Sod*-Deletionsstämmen, dass sowohl der Verlust der cytoplasmatischen SOD (SOD1, Cu/ZnSOD) als auch der mitochondrialen SOD (SOD2, MnSOD) bei *S. cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* und Mäusen die Lebensspanne negativ beeinflusst wird und eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress auftritt (Carlsson et al., 1995; Duttaroy et al., 2003; Elchuri et al., 2005; Kirby et al., 2002; Lebovitz et al., 1996; Li et al., 1995; Longo et al., 1996 und 1999; Phillips et al., 1989; Unlu und Koc, 2007; Van Remmen et al., 1999 und 2003; Wawryn et al., 1999). Jedoch stellen widersprüchliche Befunde die universale Anwendbarkeit dieser Alterungstheorie in Frage (Lapointe und Hekimi, 2010; Sanz et al., 2010). So zeigen Studien am Alterungsmodell *C. elegans*, dass *Sod*-deletierte Stämme, trotz einer hohen Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, keine verkürzte Lebensspanne aufweisen. Vielmehr noch lebt der Fadenwurm *C. elegans* durch den Verlust der mitochondrial lokalisierten MnSOD länger (Van Raamsdonk und Hekimi, 2009; Yang et al., 2007). Auch zeigten erst vor kurzem veröffentlichte Studien an *C. elegans*, dass die gemeinsame Deletion aller 5 *Sod*-Gene keinen negativen Effekt auf die Lebensspanne ausübt (Van Raamsdonk und Hekimi, 2012). Aber nicht nur durch die Deletion von *Sod*-Genen, sondern auch durch ihre Überexpression wurden bei zahlreichen Modellorganismen

Experimente zur Überprüfung der FRTA durchgeführt. So zeigten Analysen von transgenen *Drosophila*-Stämmen, die entweder *Cu/ZnSod* oder *MnSod* überexprimieren, eine verlängerte Lebensspanne (Phillips et al., 2000; Sun und Tower, 1999; Sun et al., 2002). Im Mausmodell hingegen konnte weder die *Cu/ZnSod*- noch die *MnSod*-Überexpression die Lebensspanne verlängern, obwohl die Mäuse einen erhöhten Schutz vor oxidativem Stress und eine verminderte Anhäufung von oxidativen Schäden aufwiesen (Huang et al., 2000; Muller et al., 2007; Perez et al., 2009). Lediglich eine gleichzeitige Überexpression einer gezielt in die Mitochondrien lokalisierte Katalase führte zu einer verlängerten Lebensspanne bei Mäusen (Schriner et al., 2005). Eine mögliche Erklärung, warum nur die gleichzeitige Überexpression der *Sods* mit einer Katalase zu einer verlängerten Lebensspanne führt, könnte auf der Tatsache beruhen, dass durch die gesteigerte SOD-Aktivität mehr H_2O_2 in den Zellen gebildet wird. So führt in *E. coli* die Überexpression der *FeSod* zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, die auf die erhöhte Produktion von H_2O_2 zurückzuführen ist (Scott et al., 1987). Ebenfalls führt die Überexpression der menschlichen *Cu/ZnSod* in Mensch- und Mauszelllinien, sowie die Überexpression der *MnSod* in menschlichen Ziellinien zu erhöhten Mengen an H_2O_2 (Amstad et al., 1991; Buettner et al., 2006; Elroy-Stein et al., 1986; Kim et al., 2001; Li et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Venkataraman et al., 2004 und 2005; Zhang et al., 2002). Es ist davon auszugehen, dass die Konzentrationen von Superoxid, H_2O_2 und Katalasen in einer Zelle in einem stationären „steady-state“ (stabilen Zustand) sind. Diese „steady-state“-Konzentrationen an Superoxid und Wasserstoffperoxid reflektieren ein ausgewogenes Verhältnis zwischen der Geschwindigkeit von Bildung und Abbauraten. Eine veränderte Geschwindigkeit der Abbauraten (bspw. durch die Überexpression von *Sods*) kann dieses Gleichgewicht ins Schwanken bringen (Buettner et al., 2006). Mathematische Modellierer haben ein Modell entwickelt, mit dem die Erhöhung der „steady-state“-Konzentration an H_2O_2 erklärt werden kann. Dieses Modell sagt einen alternativen Weg des Superoxidabbaus vor, bei dem kein H_2O_2 entsteht (Kowald und Klipp, 2004; Kowald et al., 2006). Wird die SOD-Aktivität erhöht, so läuft der Abbauweg über den H_2O_2 -generierenden Abbau der SODs und die H_2O_2 -Gleichgewichtskonzentration wird dabei erhöht.

Die zahlreichen unterschiedlichsten Befunde in den verschiedenen Modellorganismen zeigen, dass der Einfluss der *Sods* im Alterungsprozess zum einem abhängig ist von der Anzahl der SODs im Organismus selbst, sowie des Expressionsmuster in verschiedenen

Gewebetypen und zum anderem durch die Komplexität und Art der Spezies selbst. Diese Faktoren erschweren es, die genaue Rolle im Alterungsprozess zu ermitteln. Deshalb ist es auch von großer Bedeutung, die Auswirkung einer solchen Modulation in einem einfachen Modellsystem von geringer Komplexität zu untersuchen.

1.5 Der filamentöse Ascomycet *Podospora anserina* als ein Alterungsmodell

P. anserina ist ein Pilz, der systematisch in die Klasse der filamentösen Ascomyceten (Schlauchpilze) der Familie der Sordariaceen eingeordnet wird (Esser et al., 1986). Aufgrund seines Vorkommens in der Natur auf Dung von Pflanzenfressern wird er zu den Saprovoren gezählt. *P. anserina* ist ein einfach kultivierbarer Organismus, der leicht im Labor in Petrischalen oder Flüssigmedium mit einfachem zucker- und mineralstoffhaltigen Nährmedium angezogen werden kann. Zudem besitzt er einen genetisch kontrollierbaren kurzen Entwicklungszyklus und sein Genom ist nahezu vollständig sequenziert und annotiert (<http://podospora.igmors.u-psud.fr>). Da die Sequenz des Genoms bekannt ist, können genetische Manipulationen durch Transformationen durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den meisten Hyphenpilzen besitzt *P. anserina* eine begrenzte Lebensspanne und ist folglich ein intensiv untersuchter Modellorganismus, der zahlreichen Untersuchungen von genetischen Grundlagen des Alterns und der Seneszenz diente (Esser und Keller, 1976; Esser und Tudzynski, 1980; Rizet, 1953).

Effizient vermehrt sich *P. anserina* durch die sexuelle Fortpflanzung. Nach der Befruchtung der weiblichen Gametangien durch männliche Gameten (Spermatien) bilden sich Fruchtkörper, die sogenannten Perithezien (Abb. 6 A bis C). Die Perithezien enthalten zahlreiche Ascosporen (Meiosporen), die zur Bildung von neuem Myzel führen (Abb. 6 D bis E).

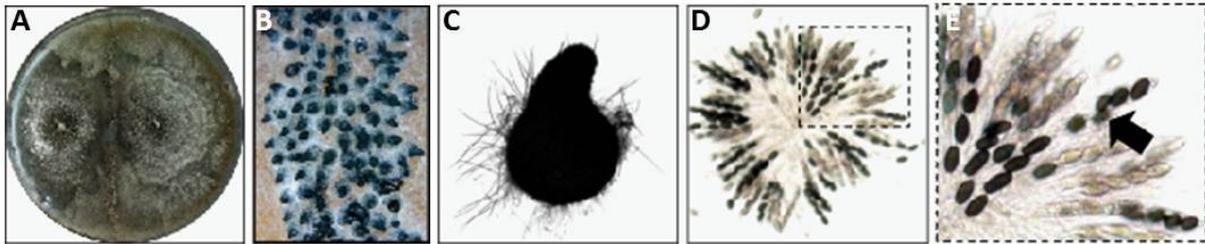


Abb. 6: Bildung und Morphologie des Fruchtkörpers von *P. anserina*. **A** In der Kontaktzone, wo sich das Myzel von zwei Stämmen unterschiedlichen Paarungstyps trifft, kommt es nach der Befruchtung der weiblichen Gametangien durch männlichen Gameten zur Bildung von Fruchtkörper (Perithezien). **B** Vergrößerte Aufnahme der Kontaktzone. Zu sehen sind die dicht aneinander gereihten Perithezien, die sich nach der Befruchtung gebildet haben. **C** Dargestellt ist ein einzelnes Perithezium. Im Perithezium (**D**) befinden sich die in einer Rosette vorliegenden zahlreichen Ascii. In der vergrößerten Ansicht (**E**) sind die einzelnen Ascii zu erkennen. Ein Ascus beinhaltet gewöhnlich vier zweikernige Ascosporen. Gelegentlich, durch eine fehlerhafte Lage des Spindelapparates, werden an Stelle einer zweikernigen Ascospore zwei einkernige Ascosporen gebildet (Pfeil). Diese einkernigen Ascosporen sind kleiner und werden für die genetischen Analysen verwendet. Abbildung modifiziert nach Osiewacz et al. (im Druck).

Das Myzel besteht aus filamentösen, stark verzweigten Zellen (Hyphen), deren Wachstum an den Hyphenspitzen erfolgt. Nach einer Stamm-spezifischen Periode linearen Wachstums kommt es zu einer morphologischen Veränderung (Abb. 7), die gekennzeichnet ist durch eine verstärkte Pigmentierung (Hyperpigmentierung), eine reduzierte Bildung von Luftmyzel, sowie ein verlangsamtes Hyphenwachstum und das Absterben der Hyphen von der Peripherie her (Esser und Tudzynski, 1980).

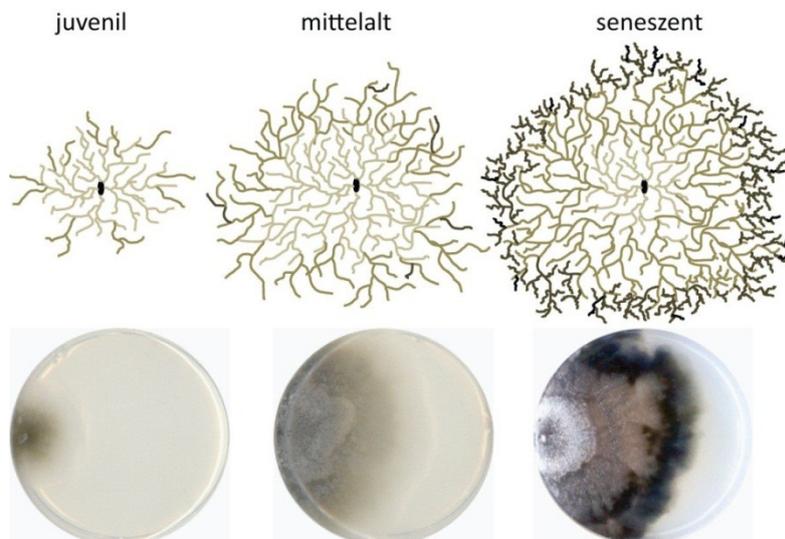


Abb. 7: Die morphologischen Veränderungen des Myzels während des Alterns bei *P. anserina*. Aufgeführt ist eine schematische Darstellung des phänotypischen Erscheinens von *P. anserina*-Kulturen im juvenilen, mittelalten und seneszenten Stadium. Darunter sind abfotografierte Kulturplatten der drei Stadien abgebildet. Myzel von einem zwei Tage alten Wildtyp wurde am Rand einer mit Nährmedium gefüllten Petrischale angeimpft, inkubiert und in Zeitabständen dokumentiert. Das seneszente Myzel ist im Vergleich zu juvenilem und mittelaltem Myzel durch eine verstärkte Pigmentierung (Hyperpigmentierung), eine verminderte Bildung von Luftmyzel, sowie ein reduziertes Wachstum und Absterben der peripheren Hyphen gekennzeichnet. Abbildung modifiziert nach Osiewacz et al. (im Druck).

Bereits in den 1960er Jahren haben Kreuzungsanalysen gezeigt, dass der Alterungsprozess von *P. anserina* von einem cytoplasmatischen Faktor, den Mitochondrien, beeinflusst wird (Marcou, 1961).

Bei diesen Kreuzungsanalysen wurde juveniles, homokaryotisches Myzel mit den Spermastien (männliche Gameten) eines seneszenten Isolates befruchtet und führte zu juvenilen Nachkommen. Wird jedoch umgekehrt seneszenten Myzel mit juvenilen Spermastien befruchtet, führt dies überwiegend zu Nachkommen mit einem seneszenten Phänotyp. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ein cytoplasmatischer Faktor, nämlich die Mitochondrien, die maternal bei *P. anserina* vererbt werden, den Alterungsprozess beeinflussen.

Viele Jahre Forschung am Alterungsmodell *P. anserina* ergaben, dass sowohl die Mitochondrien als auch die Erzeugung und das Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Proteinhomöostase, sowie DNA-Reparatur und Apoptose eine wichtige Rolle im Alterungsprozess von *P. anserina* spielen (Hamann et al., 2007 und 2008; Luce et al., 2010; Müller-Ohldach et al., 2011; Osiewacz, 2002; Scheckhuber et al., 2007; Scheckhuber und Osiewacz, 2008; Zintel et al., 2010). Die mechanistischen Details zu der Rolle der einzelnen Wege, ihrer Komponenten und Wechselwirkungen werden auch weiterhin in der Zukunft eine wichtiger Ansatz für die Aufklärung des Alterungsprozess sein und geben wichtige Hinweise und Perspektiven für die Altersforschung von höheren Organismen wie den Säugern und den Menschen.

1.5.1 Die Superoxid-Dismutasen von *P. anserina*

Wie auch andere aerobe Organismen bildet *P. anserina* zum Schutz vor Superoxid Superoxid-Dismutasen. Noch bevor die komplette Genomsequenz von *P. anserina* bekannt war, wurden die Superoxid-Dismutasen von *P. anserina* (PaSODs) untersucht. Zunächst waren nur zwei PaSODs bekannt: eine Cu/ZnSOD, die PaSOD1 und eine MnSOD, die PaSOD2 (Borghouts et al., 2001). Ausgehend vom Co-Faktor dieser Superoxid-Dismutasen wurde angenommen, dass die Cu/ZnSOD, PaSOD1, im Cytoplasma und zu geringen Teilen im mitochondrialen Intermembranraum, wie bereits auch für die Hefe *S. cerevisiae* und in Leberzellen von Ratten publiziert wurde, lokalisiert ist (Okado-Matsumoto und Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001). Des Weiteren wurde angenommen, dass die Mn-bindende PaSOD2 die in der mitochondriale Matrix lokalisierte PaSOD sei. Weitere Analysen durch SOD-Aktivitätsgele von Gesamtproteinextrakten aus juvenilen und seneszenten Wildtypen zeigten, dass die Aktivität

der PaSOD1 in seneszenten Stämmen zunimmt, während die PaSOD2-Aktivität abnimmt (Borghouts et al., 2001). Erst später, durch die Veröffentlichung des vollständig sequenzierten und annotierten Genoms von *P. anserina* und durch Analysen von Proteinextrakten aus isolierten Mitochondrien, ergaben sich Hinweise auf eine weitere MnSOD, benannt PaSOD3 (Grief, 2007; persönliche Mitteilung Luce, AK Osiewacz). Tatsächlich wurde diese SOD und nicht PaSOD2 in mitochondrialen Proteinextrakten von *P. anserina* in einer Proteomanalyse identifiziert. Interessanterweise ist die Menge von PaSOD3 in juvenilen Wildtypen im Verhältnis zu seneszenten Wildtypen um den Faktor 1,7 signifikant geringer (Groebe et al., 2007). Die Tatsache, dass alle drei PaSODs im Alter reguliert zu sein scheinen, veranlasste, weitere Untersuchungen vorzunehmen, um die Rolle der PaSODs im Alterungsprozess detaillierter zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen einer Diplomarbeit für jedes *PaSod*-Gen (*PaSod1*, *PaSod2* und *PaSod3*) Überexpressionsplasmide und Deletionscosmide zur Erzeugung von Überexpressions- und Deletionsmutante konstruiert, sowie *PaSod-Gfp*-fusionierte Plasmide zur Erzeugung von *PaSod::gfp*-Stämme zur mikroskopischen Untersuchung der Lokalisation des GFP-fusionierten PaSOD-Proteins hergestellt (Schwitalla, 2007).

2 Problemstellung

Die Bedeutung der Superoxid-Dismutasen als ROS-abwehrende Enzyme wurde in zahlreichen Experimenten an verschiedenen Modellorganismen und Zellen in Bezug auf den Alterungsprozess und den Schutz vor oxidativem Stress untersucht. Die bisherigen Befunde sind umfangreich aber auch widersprüchlich. Einige Studien mit Hefen, Fliegen und Mäusen unterstützen mit ihren Befunden die „Freie-Radikal-Theorie des Alterns“ (siehe Kapitel 1.4.2), jedoch werden in jüngster Zeit zunehmend Studien veröffentlicht, deren Autoren an den Hauptthesen der FRTA zweifeln (Lapointe und Hekimi, 2010; Sanz et al., 2010).

Aufgrund der komplexen Situation in höheren Modellorganismen - da manche Organismen bis zu 5 verschiedene *Sod*-Gene besitzen, die gewebs- und entwicklungspezifisch exprimiert werden - soll nun die Rolle dieser Proteinfamilie in einem weniger komplexen Organismus, dem filamentösen Ascomyceten *P. anserina* untersucht werden. Um die Funktion und Rolle der Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* in Bezug auf den Alterungsprozess und der Resistenz gegenüber oxidativem Stress zu ermitteln, sollen folgende Zielsetzungen und Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wo sind die drei Superoxid-Dismutasen (PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3) in der Hyphe lokalisiert?
2. Welche Rolle spielen die einzelnen PaSODs beim Abbau von ROS?
3. Welchen Einfluss haben die PaSODs bei der Entstehung von Proteinschäden durch oxidativen Stress?
4. Welche Rolle besitzen die drei PaSODs im Alterungsmodell *P. anserina*?
5. Welche Auswirkungen auf andere Komponenten des ROS-Abbausystems hat die Modulation der *PaSods*?

Ausgehend von diesen Fragestellungen und Zielsetzungen zur Charakterisierung der Superoxid-Dismutasen im Modellorganismus *P. anserina* sowie die Bedeutung der PaSODs im Alterungsprozess und Toleranz gegenüber oxidativem Stress wurde diese vorliegende Doktorarbeit angefertigt.

3 Material

3.1 Bezugsquellen und Geräte

Die verwendeten Bezugsquellen und Geräte in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Geräte.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	GE 446 EC-1	Getinge
Binokular	GZ6	Leica
Brutschränke	Kelvitron Ruarth Hannover	Heraeus
Crosslinker	UV-Stratalinker 1800	Stratagene
Einschweißgerät	CIATRONIC	Petra
Elektrophorese	Mini SUB DNA Cell Wide-Mini SUB DNA Cell Mini Protean II Protean II	BioRad
Filmentwickler	Protec 45 compact	Protec
Fluoreszenzmikroskop	CLSM TCS SP5	Leica
Gefrierschranke -20 °C,	Economic-froster	Bosch
Gefrierschrank – 80 °C	Ultra Low	SANYO
Heizbad	U3	Julabo
Heizblock	Thermomixer compact	Eppendorf
Homogenisator	Bead-Beater™ Disruptor Genie Waring-Blendor	Roth Scientific Industries Waring
Hybridisierungsöfen	Hybridization Oven/Shaker	Amersham
Kühlschrank	profi line	Liebherr
Magnetrührer	Ikameg Reo	Ikameg
Mikroskop	Laborlux S DM LB	Leitz Leica
Mikrowelle	Jet 900w	Whirlpool
Minizentrifuge	C-1200	National Labnet Co.
NanoDrop® Spectrometer	ND-1000	Peqlab
Netzgeräte	GPS 200/400	GE Healthcare
PCR-Geräte	TGradient	Biometra
pH-Meter	Calimatic 761	Knick
Photometer	Safire 2	Tecan
Pipetten	1000µl, 200µl, 20µl, 2µl	Abimed
Real Time-PCR-Gerät	My iQ	BioRad
Schüttelinkubator	HT-Infors	Infors
Sterilbank	NSF 49; LF 460 EC	Clean Air
Transilluminator	CSI	Cybertech
Vakuum-Transferapparatur	LKB VacuGene XL	Pharmacia
Vortex	Vortex Genie 2	Scientific Ind.
Waage	PB 303 LC 82	Mettler Toledo Sartorius
Wasseraufbereitung	Milli-Q	Millipore
Wasserbad	1083 (GFL), MP, U3	Julabo

Gerät	Modell	Hersteller
Zentrifugen	5415 C mit F-45-18-11 (Festwinkelrotor)	Eppendorf
	5417 R mit FA-45-24-11 (Festwinkelrotor)	Eppendorf
	5804 R mit A-4-44 (Festwinkelrotor)	Eppendorf
	Sorvall RC5B mit Festwinkelrotoren: Super-Lite GSA	DuPont
	SLA-1500 bzw. Sorvall SS34	
	Varifuge 3	Heraeus

3.2 Sonstige Materialien

Weitere verwendete Materialien sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Sonstige verwendete Materialien.

Material	Modell	Hersteller
Cellophanfolie		BioRad
Filterpapier	3MM	Whatman
Filtersäulen	Amicon Ultra-15, Ultracel-3k	Millipore
Glasperlen	0,5 mm	Biospec Products
Hybridisierungsmembran	Hybond-N	GE Healthcare
Hybridisierungsröhren	Hybridisierungsröhren	GE Healthcare
PVDF-Membran	Millipore Immobilon-P	Roth
Röntgenfilm	Hyperfilm MP	GE Healthcare
Röntgenfilmkassetten	Suprema	Dr. Goos

3.3 Chemikalien

Die in Tab. 4 aufgelisteten Chemikalien wurden – wenn nicht anders angegeben – in p.A.-Qualität verwendet.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien.

Artikel	Hersteller
Acrylamid	Roth
Agar	Invitrogen
Agarose (elektrophorese grade)	Invitrogen
AgNO ₃	Roth
Ammoniumazetat	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin	Roche
Antifoam	Sigma
APS	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Biomalz	Roth
Biotin	Serva
Bisacrylamid	Roth
Blockingpuffer	Licor
Bromphenolblau	Serva
BSA	Sigma
CaCl ₂	Merck
Casaminoacids	Difco
Chloroform	Merck
Coomassie Blue G250	Roth

Artikel	Hersteller
CSPD	Roche
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	Merck
DAPI	Invitrogen
Dextrin	Roth
Dimethylformamid	Sigma
D(+)-Saccharose	Roth
DMPC	Sigma
dNTPs	MBI Fermentas
DTT	MBI Fermentas
EDTA	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
FeSO ₄	Merck
Fe(NH ₂)(SO ₄) ₂ x 6 H ₂ O	Roth
FeCl ₂	Merck
Formaldehyd	Sigma
Formamid	Merck
Glucanex	Novo Nordisk Ferment
Glucose	Serva
Glycerin	Roth

Artikel	Hersteller
Glycin	Merck
H ₂ O ₂ (30 %)	Roth
H ₃ Bo ₃	Roth
H ₃ PO ₄	Roth
HAc	Merck
Harnstoff	Serva
HCl	Merck
Hefeextrakt	Difco
HEPES	Sigma
Heringssperma-DNA	Serva
Hexanukleotide	Roche
Hygromycin	Calbiochem
IPTG	Biomol
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Roth
KH ₂ PO ₄	Merck
KH ₂ PO ₃	Merck
Kaliumazetat	Roth
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
KOH	Merck
Lauroylsarkosin	Sigma
Maismehl	Aurora
Maleinsäure	Merck
Methanol	Roth
MgCl ₂ -Lösung (für PCR)	Invitrogen
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck
MitoTracker CMXRos	Red Molecular Probes
MnCl	Merck

Artikel	Hersteller
MnSO ₄ x 2 H ₂ O	Merck
MOPS	Sigma
Na ₂ HPO ₄	Merck
Na-Acetat	Merck
NaCl	Merck
Na ₂ CO ₃	Roth
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	Roth
NaOH	Merck
Na-Phosphat	Merck
Na ₂ S ₂ O ₃	Roth
Natriumzitat	Roth
NBT	Sigma
PCR-Puffer (- MgCl)	Invitrogen
PEG 4000	Serva
Phenol	Roth
Riboflavin	Sigma
Roti-Nanoquant	Roth
Saccharose	Roth
SDS	Serva
Sorbit	Merck
TEMED	Sigma
Thiamin	Serva
TRIS	Gibco
Triton X-100	Serva
Trypton	Difco
Tween 20	Sigma
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Merck

3.4 Puffer und Lösungen

Blotting-Puffer

3 g Tris
14 g Glycin
200 mL Methanol
ad 1 L mit H₂O

Chloroform/Isoamylalkohol

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

Coomassie-Entfärber für Gele

20 mM CuSO₄
10 % [v/v] Essigsäure
25 % [v/v] Methanol
65 % [v/v] H₂O

Coomassie-Färber für Gele

20 mM CuSO₄
10 % [v/v] Essigsäure
45 % [v/v] Methanol
0,15 % [w/v] Coomassie
45 % [v/v] H₂O

Coomassie-Entfärber für Membranen

10 % [v/v] Essigsäure
50 % [v/v] Methanol
40 % [v/v] H₂O

Coomassie-Färber für Membranen

50 % [v/v] Methanol
0,1 % [w/v] Coomassie
50 % [v/v] H₂O

DAB-Färbelösung

2,5 mM Diaminobenzidin
0,02 mg/mL Meerrettichperoxidase
in 100 mM Tris-Puffer (pH 6,9)

Denaturierungslösung

1,5 M NaCl
0,5 M NaOH
autoklavieren

DIG-Hybridisierungspuffer („High-SDS“)

7 % (w/v) SDS
5 x SSC
0,1 % (w/v) N-Lauroylsarkosin
2 % (w/v) Blockingreagenz
50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,0)

DIG-Puffer 1

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

DIG-Puffer 2

0,5 % (w/v) Blockierungsreagenz 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
+ 99 mL 50 % Ethanol
ad 1 L H₂O

DNA-Ladepuffer (6x)

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

DTT (1 M)

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

Extraktionspuffer

50 mM HEPES
100 mM NaCl
pH 7,4 (HCl)
autoklavieren
1 mM DTT
50 mM DTT für Oxyblots

100 mM Kaliumphosphatpuffer

13,2 mM K₂HPO₄
86,8 mM KH₂PO₄

Katalaseaktivitätsgel-Färbelösung

0,003 % H₂O₂ in H₂O verdünnt

Katalaseaktivitätsgel-Inkubationslösung

2 % (w/v) FeCl₃
2 % (w/v) K₄[Fe(CN)₆]

Mitochondrien-Isolierungspuffer

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

MOPS (10x)

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

NBT-Lösung

50 mg/mL NBT
in 70 % Dimethylformamid

nativer Proteinladepuffer (6x)

7,5 mL Glycerin
9,375 mL 0,5 Tris/HCl (pH 7)
0,25 g Bromphenolblau
ad 25 mL mit H₂O

Neutralisierungslösung

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

PBS (10x)

1,4 M NaCl
0,1 M KCl
0,027 M Na₂HPO₄
0,018 M KH₂PO₄

PEG

60 % (w/v) PEG 4000
50 mM CaCl₂·2H₂O
10 mM Tris
pH 7,5 (HCl)

Riboflavin-Lösung

1 mg/mL Riboflavin
in 100 mM Kaliumphosphatpuffer
mit 0,1 % TEMED

RNase A-Lösung

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

Sammelgel (5%), denaturierend

250 µL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
500 µL 4x Sammelgel-Puffer
1,2 mL H₂O
2,5 µL TEMED
25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

Sammelgel (5%), nativ

425 µL 30 % Acrylamid
425 µL 4x Tris/HCl (pH 8,9)
1,65 mL H₂O
2,5 µL TEMED
25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

Sammelgel-Puffer (4x)

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

SDS-Laufpuffer (10x)

0,25 M Tris
1,9 M Glycin
pH 8,3 (HCl)
Gelelektrophorese: 1x Laufpuffer + 0,1 % SDS
nativer 1x Laufpuffer ohne SDS-Zugabe

5 x SDS-Ladepuffer

2 g SDS
1 µL β-Mercaptoethanol
5 mL Glycerin
Tris/HCl (pH 6,8)
1 % Bromphenolblau
ad 20 mL mit H₂O

SSC (20x)

3 M NaCl
0,3 M Na₃Citrat
pH 7,0 (HCl)

STC

1 M Sorbit
10 mM Tris
50 mM CaCl₂ x H₂O
pH 7,5 (1 N HCl)

6 x Stopperlösung (DNA-Ladepuffer)

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

TAE (50x Tris-acetat-EDTA)

2 M Tris
57,1 mL Eisessig/L
50 mM Na₂ EDTA, pH 8
autoklavieren

TENS-Puffer

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

TPS

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

Trenngel-Puffer (4x)

1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
0,4 % SDS

Trenngel (12 %), denaturierend für Oxyblots

1,5 mL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
1,25 mL 4x Trenngel-Puffer
2,25 mL H₂O
2,5 µL TEMED
25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

Trenngel (16%), denaturierend

2 mL 40 % Acrylamid/Bisacrylamid
1,25 µL 4x Trenngel-Puffer
1,75 mL H₂O
2,5 µL TEMED
25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

Trenngel (8,5 %), nativ

1,4 mL 30 % Acrylamid
1,1 mL 4x Tris/HCl (pH 8,9)
2,5 mL H₂O
8,35 µL TEMED
25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

Trenngel (10 %), nativ

1,85 mL 30 % Acrylamid
1,1 mL 4x Tris/HCl (pH 8,9)
2,25 mL H₂O
8,35 µL TEMED und 25 µL APS (0,01 g/ 100 µL)

3.5 Anzuchtsmedien

BMM (Biomalz-Mais-Medium)

250 g Maismehl/5 L Wasser
über Nacht bei 60 °C quellen lassen
über Handtuch filtrieren
8 g Biomalz/L
pH 6,5 (KOH)
ad 5 L H₂O
autoklavieren
2 % (w/v) Agar
autoklavieren

CM-Medium (*Podospora*-Anzuchtmedium)

1 g KH₂PO₄
0,5 g KCL
0,5 g MgSO₄ x 7H₂O
10 g Glucose-Monohydrat
3,7 g NH₄Cl
2 g Trypton
2 g Hefe-Extrakt
1 mL Stammlösung A
ad 1 L H₂O
pH 6,5 (KOH)
autoklavieren

M2 (Medium 2)

pro 1 Liter:
10 g Dextrin
0,25 g KH₂PO₄
0,3 g K₂HPO₄
0,5 g Harnstoff
2 % Agar
nach dem Autoklavieren:
5 µL Biotin (0,5 mg/mL)
200 µL Thiamin (250 mg/mL)
1 mL Spurenelementlösung

PASM-Medium

pro 1 Liter:
10 g Glucose
0,5 g KH₂PO₃
0,6 g K₂HPO₄
1 g Harnstoff
2 % Agar
nach dem Autoklavieren:
5 µL Biotin (0,5 mg/mL)
200 µL Thiamin (250 mg/mL)
1 mL Spurenelementlösung

Selektionsmedien

BMM oder Transformationsmedium auf pH 6,5 für Hygromycin und pH 7,5 für Phleomycin einstellen, nach dem Autoklavieren 0,1 mg/ml Hygromycin B oder 6 µg/mL Phleomycin hinzufügen

Sporeauskeimungsmedium

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

Spurenelementlösung

für 1 Liter:
500 mg CitricAcid x H₂O
500 mg ZnSO₄ x 7 H₂O
100 mg Fe(NH₂) (SO₄)₂ x 6 H₂O
25 mg CuSO₄ x 5 H₂O
5 mg MnSO₄ x H₂O
5 mg H₃Bo₃
5 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
in 100 mL H₂O sterilfiltrieren

Stammlösung A (100x, CM-Medium)

pro 1 Liter:
1 g ZnSO₄
1 g FeCl₂
1 g MnCl

Stammlösung 1 (50x, Transformationsmedium)

7,5 % (w/v) KH₂PO₄
2,5 % (w/v) KCl
2,7 % (w/v) MgSO₄ x 7 H₂O

Stammlösung 2 (50x, Transformationsmedium)

0,005 % (w/v) ZnSO₄ x 7 H₂O
0,005 % (w/v) Fe SO₄ x 7 H₂O
0,005 % (w/v) CuSO₄ x 5 H₂O
0,005 % (w/v) MnSO₄ x H₂O

Transformationsmedium

3,7 g Ammoniumchlorid
2 g Trypton
1 g Hefe-Extrakt
10 g Glucose-Monohydrat
342,3 g Saccharose
20 mL Stammlösung 1
20 mL Stammlösung 2
ad 1 L H₂O
pH 6,0 (KOH)
für Festmedium: 1,2 % (w/v) Agar,
für Überschichtungsmedium: 0,5 % (w/v) Agar

3.6 Verwendete Kits

Die folgenden verwendeten Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet und sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
„DIG-DNA labeling and detection“-Kit	Roche
„iQ SYBR Green Supermix“	BioRad
„iScript cDNA Synthesis“-Kit	BioRad
„RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase“	MBI Fermentas
„NucleoSpin-Extract II“-Kit	Macherey-Nagel
„NucleoSpin RNA Plant“-Kit	Macherey-Nagel

3.7 Verwendete Stämme

Podospora anserina-Stämme

Stamm	Referenz
Wildtyp „s“, Isolate s ⁺ F18260, s ⁻ F18261	Esser, 1974
$\Delta PaSod1$ (T4-6, T4-41, T4-51)	diese Arbeit
<i>PaSod1</i> _OEx1 (T11)	Schwitalla, 2007
<i>PaSod1</i> _OEx2 und 3 (T57, T76)	diese Arbeit
$\Delta PaSod2$ (T78)	Schwitalla, 2007
<i>PaSod2</i> _OEx1-4 (T34, T2-6, T2-15, T2-20)	diese Arbeit
$\Delta PaSod3$ (T8-28)	diese Arbeit
<i>PaSod3</i> _OEx1 (T27)	diese Arbeit
<i>PaSod3</i> _OEx2 und 3 (T71, T72)	Schwitalla, 2007
verschiedene Deletionskombinationen: $\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$, $\Delta PaSod1/2/3$	diese Arbeit

3.8 Plasmide

Die in der Arbeit verwendeten Plasmide und Cosmide sowie ihre Verwendung sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Verwendete Plasmide sowie Cosmide und ihre Verwendung.

Plasmid	Verwendung	Referenz
pAN7-1	Positivkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation	Punt et al., 1987
phph-1	Negativkontrolle für <i>P. anserina</i> -Transformation.	Roche
pKO4	Herstellung der Phleomycin-Sonde	Andrea Hamann
pSod1Ex1	<i>PaSod1</i> -Überexpressionsplasmid	Schwitalla, 2007
pSod2Ex1	<i>PaSod2</i> -Überexpressionsplasmid	Schwitalla, 2007
pSod3Ex1	<i>PaSod3</i> -Überexpressionsplasmid	Schwitalla, 2007
pHSP60Ex1	Positivkontrolle der RT-PCR	Sören Gassel
pPorin	Positivkontrolle der RT-PCR	Müller-Ohldach, 2007
pPaPrx1Ex1	Positivkontrolle der RT-PCR	Stammsammlung Osiewacz
ClpP-pEX	Positivkontrolle der RT-PCR	Karin Luce
pEX-PaLon	Positivkontrolle der RT-PCR	Karin Luce
Cosmide	Verwendung	Referenz
$\Delta SOD1$ 20B4	<i>PaSod1</i> -Deletionscosmid	Schwitalla, 2007
$\Delta SOD2$ 46D11	<i>PaSod2</i> -Deletionscosmid	Schwitalla, 2007
$\Delta SOD3$ 8F5	<i>PaSod3</i> -Deletionscosmid	Schwitalla, 2007

3.9 Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. 7 aufgelistet. Angegeben sind die Anzahl der Basenpaaren (bps), die Anlagerungstemperatur (Anlagerungstemp. in °C) sowie die Sequenzabfolge von der 5'- zur 3'-Richtung und die Verwendung.

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Oligonukleotid bps / Anlagerungstemp.	Sequenzabfolge (5' → 3') Verwendung
HSP60-1 18 bps / 60 °C	ACAAGGAGCTCAAGTTCG bindet im <i>PaHsp60</i> -Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
HSP60-2 18 bps / 60 °C	ACATTCTTGACCGTCTCG bindet im <i>PaHsp60</i> -Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
Porin-RTfor 18 bps / 60 °C	TTCCTCCGGCAGCCTTG bindet im <i>Porin</i> -Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
Porin-RTrev 18 bps / 60 °C	CGGAGGCGGACTTGTGAC bindet im <i>Porin</i> -Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
Real_Lon_for 20 bps / 56 °C	AGGCCGGTGAGTTGGTATTC bindet im <i>PaLon</i> Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
Real_Lon_rev 20 bps / 56 °C	CTCCTTGTCTCAGCCACCA bindet im <i>PaLon</i> Gen und wurde bei der RT-PCR verwendet
Real_ClpP_for 20 bps / 57 °C	TGCGAGACCAGATCAACAAG bindet im <i>PaClpP</i> -Gen, umspannt mit <i>Real_ClpP_rev</i> ein Intron und diente den RT-PCR-Analysen
Real_ClpP_rev 20 bps / 57 °C	ATCGTTCGTCGTTCTTGAC bindet im <i>PaClpP</i> -Gen, umspannt mit <i>Real_ClpP_for</i> ein Intron und diente den RT-PCR-Analysen
Real_Prx1_for 20 bps / 57 °C	GTGGTGAGCGTGAATGATGT bindet im <i>PaPrx1</i> -Gen, umspannt mit <i>Real_Prx1_rev</i> ein Intron und diente den RT-PCR-Analysen
Real_Prx1_rev 20 bps / 57 °C	TAGCCTTCCATCCCACAAC bindet im <i>PaPrx1</i> -Gen, umspannt mit <i>Real_Prx1_for</i> ein Intron und diente den RT-PCR-Analysen
SOD1-1 18 bps / 48 °C	CATCACTGGCCATGATGC bindet im <i>PaSod1</i> -Gen, umspannt mit SOD1-2 das zweite Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod1</i> -Sonde
SOD1-2 18 bps / 48 °C	GCTTGATGAGGTTGTCCG bindet im <i>PaSod1</i> -Gen, umspannt mit SOD1-1 das zweite Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod1</i> -Sonde
SOD2-1 18 bps / 48 °C	GGACGACTTCAAGAACGC bindet im <i>PaSod2</i> -Gen, umspannt mit SOD2-2 das zweite Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod2</i> -Sonde
SOD2-2 18 bps / 48 °C	TTGTAGCTTCGCTGGTGC bindet im <i>PaSod2</i> -Gen, umspannt mit SOD2-1 das zweite Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod2</i> -Sonde
SOD3-1 18 bps / 48 °C	CAGCACCAGCTTCGTTCCG bindet im <i>PaSod3</i> -Gen, umspannt mit SOD3-2 das erste Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod3</i> -Sonde
SOD3-2 18 bps / 48 °C	AGTCACCCTTCTCCTCGG bindet im <i>PaSod3</i> -Gen, umspannt mit SOD3-1 das erste Intron und diente der Herstellung einer <i>PaSod3</i> -Sonde

3.10 Enzyme

Die verwendeten Enzyme sind in Tab. 8 aufgeführt und wurden, falls nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben verwendet.

Tab. 8: Verwendete Enzyme und ihre Hersteller.

Enzym	Hersteller
Rinder-Cu/ZnSOD	Sigma
DNase	Roche
Klenow-Enzym	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas
RNase	Roche
Taq-Polymerase	Invitrogen

3.11 Größenstandards

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen wurden in Tab. 9 aufgeführten Größenstandards verwendet.

Tab. 9: Verwendete Größenstandards

Größenstandard	Verwendung	Hersteller
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III-Marker	DNA-Größenstandard	MBI Fermentas
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III, DIG-markiert	DNA-Größenstandard	Roche
PageRuler Prestained Protein Ladder #SM0671	Protein-Molekulargewichtstandard für SDS-Polyacrylamidgele	MBI Fermentas

3.12 Antikörper

Die Bezeichnung und Beschreibung sowie der Hersteller der für die Western Blot-Analysen verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind der Tab. 10 zu entnehmen.

Tab. 10: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Beschreibung	Hersteller/Quelle
α -DNP	monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen erkennt oxidative Carbonylierungen an Proteinen Verdünnung: 1:500	Oxy Blot Detection Kit, Chemicon Int.
α -PaCLPP	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaCLPP aus Kaninchen detektiertes Protein: 25 kDa (PaCLPP) mitochondriale Matrix Verdünnung: 1:400	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt
α -PaHSP60 (α -HSP60)	monoklonaler Primärantikörper aus Maus, der PaHSP60 erkennt detektiertes Protein: 61 kDa (PaHSP60) Mitochondrien und Cytoplasma Verdünnung: 1:4000	Biomol SPA-807
α -PaIDI1	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaIDI1 aus Kaninchen detektiertes Protein: 21 kDa (PaIDI1) sekretiertes Protein Verdünnung: 1:10000	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt
α -PaLON	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaLON aus Kaninchen detektiertes Protein: 118 kDa (PaLON) mitochondriale Matrix Verdünnung: 1:1500	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt

Antikörper	Beschreibung	Hersteller/Quelle
α -PaPORIN	monoklonaler Primärantikörper gegen PaPORIN aus Kaninchen detektiertes Protein: 32 kDa (PaPORIN) äußere Mitochondrienmembran Verdünnung: 1:5000	Sigma (NEP) in <i>E. coli</i> heterolog exprimiertes Protein
α -PaPRE3	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaPRE3 (β 1-Untereinheit des Proteasoms) aus Kaninchen detektiertes Protein: 22 kDa (PaPRE3) Cytoplasma und Zellkern Verdünnung: 1:2500	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt
α -PaPRX1	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaPRX1 aus Kaninchen detektiertes Protein: 16,8 kDa (PaPRX1) mitochondriale Matrix Verdünnung: 1:2000	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt
α -PaSOD1 (α -Cu/ZnSOD)	monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen, der PaSOD1 erkennt detektiertes Protein: 15,8 kDa (PaSOD1) Cytoplasma und mitochondrialer Intermembranraum Verdünnung: 1:2000	BIOMOL (Stressgen) # SOD-100
α -PaSOD2	Spezifischer Peptidantikörper (Primärantikörper) gegen PaSOD2 aus Kaninchen detektiertes Protein: 26,8 kDa (PaSOD2) Cytoplasma, ggf. sekretiert Verdünnung: 1:5000	Sigma (NEP) synthetisches Peptid affinitätsgereinigt
α -PaSOD3 (α -MnSOD)	monoklonaler Primärantikörper aus Kaninchen, der PaSOD3 erkennt detektiertes Protein: 22 kDa (PaSOD3) mitochondriale Matrix Verdünnung: 1:2000	BIOMOL (Stressgen) # SOD-111
IRDye 680 α -mouse	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Maus Verdünnung: 1:15000	Licor
IRDye 800 α -mouse	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Maus Verdünnung: 1:15000	Licor
IRDye 680 α -rabbit	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen Verdünnung: 1:15000	Licor
IRDye 800 α -rabbit	polyklonaler Sekundärantikörper, gerichtet gegen Kaninchen Verdünnung: 1:15000:15000	Licor

3.13 Verwendete Computerprogramme

Die verwendeten Computerprogramme sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Verwendete Computerprogramme.

Programm	Anwendung	Hersteller
Clone Professional Manager Suite 8	Sequenzvergleich	Scientific and Educational Software
Excel	Erstellen von Tabellen	Microsoft
MITOPROT	Identifizierung von mitochondrialen Lokalisierungssequenzen	Claros und Vincens, 1996
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
PSORTII	Vorhersage der Lokalisation	Horten und Nakai, 1997
PowerPoint	Bildbearbeitung	Microsoft
Quantity One	Bestimmung der DNA-Konzentration	BioRad
Licor Scanner Software	Dokumentation und Auswertung von PVDF- Membranen und Acrylamidgelen	Licor
Illustrator	Bildbearbeitung	Adobe

4 Methoden

4.1 Nukleinsäure-spezifische Methoden

4.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *P. anserina*

Um aus *P. anserina* die DNA zu isolieren, die für Southern Blot-Analysen verwendet wurde, erfolgte die Isolation nach der von Lecellier und Silar (1994) beschriebener Methode.

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Proben wurden in 1%igen TAE-Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE verwendet. Mit ¼ Volumen 6x DNA-Ladepuffer wurden die DNA-Proben versetzt und 90 min bei 80 V im Gel aufgetrennt. Neben den Proben wurden DNA-Längenstandards mitaufgetragen. Das Gel wurde für etwa 15 min in ein Ethidiumbromidbad (1 µg/mL in H₂O) zum Anfärben der DNA-Banden gegeben. Ethidiumbromid lagert sich in die DNA ein und macht diese unter Verwendung eines UV-Transilluminators sichtbar. Das Gel mit den Ethidiumbromid-haltigen DNA-Banden wurde dokumentiert und ausgewertet.

4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung von Oligonukleotiden, DNA-Fragmenten, RNA, Plasmiden und Cosmiden wurde ein Photometer (Nanodrop[®] ND-1000 von Peqlab) verwendet. Die Konzentrationsbestimmungen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um die Molarität von Oligonukleotide zu berechnen, wurde die Absorption gemessen und in folgende Formel eingesetzt:

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

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

A, T, G, C = Anzahl der jeweiligen Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin)

Die Bestimmung der Konzentration von genomischer DNA erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese. Hierzu wurde 1 µL der isolierten DNA-Probe und 250 ng λ-*Hind*III-Marker mit bekannter Konzentration in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurde die Konzentration mit Hilfe eines Programms („Quantity One“, BioRad) quantifiziert. Dabei wurde die Konzentration durch die Intensität der Bande mit der Intensität der bekannten λ-*Hind*III-Fragment-Konzentration verglichen.

4.1.4 Restriktion von DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA und genomischer DNA wurde mit den jeweiligen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für 1 µg DNA wurden standardmäßig 5 U des Restriktionsenzym verwendet.

4.1.5 Amplifikation von DNA

Durch die Verwendung einer PCR („Polymerase Chain Reaction“) wurden Nukleotidsequenzen schnell und selektiv in großen Mengen hergestellt. Zur Herstellung der *PaSod*-Sonden wurde die *Taq*-Polymerase mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen an Oligonukleotiden, Puffer, MgCl₂, und dNTPs verwendet. Als DNA-Matrize diente das jeweilige Cosmid, welches das gewünschte Genfragment beinhaltet. Das verwendete PCR-Programm (Denaturierung, Anlagerung, Elongation) richtete sich nach den Angaben des Polymerasen-Herstellers sowie den Eigenschaften der Oligonukleotide und der Fragmentgröße. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde mit dem „NucleoSpin-Extract II“-Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 25 bis 50 µL sterilem Wasser.

4.1.6 Digoxigenin-Markierung von DNA-Fragmenten zur Herstellung von DNA-Sonden

Um in einen Southern-Blot das gewünschte Zielgen auf der Nylonmembran detektieren zu können, müssen DNA-Sonden, die eine Markierung mit Digoxigenin (DIG) tragen, hergestellt werden. Die Fragmente (ca. 300 bp) der *PaSod*-Gensonden wurden durch die Oligonukleotide SOD1-1/2, SOD2-1/2 bzw. SOD3-1/2 aus den jeweiligen Cosmiden (20B4, 46D11 oder 8F5) amplifiziert und mit DIG markiert. Die Herstellung der Phleomycin-Sonde resultierte aus dem Verdau des Plasmid pKO4 mit *Xba*I und *Nco*I und anschließender Aufreinigung des 1,5 kbp großen Fragments aus einem Agarosegel. Das Fragment, welches das Phleomycinresistenzgen beinhaltet, wurde mit DIG markiert.

Die Markierung erfolgte mit 100 bis 500 ng DNA für 20 h mit dem „DIG-DNA Labeling“-Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Um die Konzentration der markierten DNA abschätzen zu können, wurden 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg und 0,1 pg DIG-markierte Kontroll-DNA (Roche) auf eine Nylonmembran aufpipettiert. Zum Vergleich wurde 1 µL der markierten DNA mit aufgetragen. Die Nylonmembran wurde beidseitig im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) mit 1200 µJoules x 100 behandelt (Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“). Danach erfolgte die Detektion wie bei einem Southern Blot. Statt CSPD wurde NBT/X-Phosphat als Farbsubstrat aufgebracht und 2 bis 4 h oder über Nacht im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Farbentwicklung der Kontroll-DNA wurde mit der markierten DNA verglichen und diente als ein Maß für die Markierungseffizienz.

4.1.7 Transfer von DNA auf eine Nylonmembran (Southern Blot)

Die zu untersuchende DNA wurde zuvor mit einem geeigneten Restriktionsenzym über Nacht bei 37 °C verdaut, 30 min mit einer RNase A-Lösung behandelt und in einem 1 %igen TAE-Agarosegel aufgetrennt. Die nach ihrer Größe aufgetrennten DNA-Fragmente wurden auf eine mit 2 x SSC angefeuchteten Nylonmembran unter Vakuum (50 mbar) transferiert. Zur Depurinierung der DNA wurde das Gel mit 0,25 N HCl-Lösung überschichtet. Nach 20- bis 25-minütiger Inkubation wurde die Lösung vom Gel abgenommen und durch die Denaturierungslösung zur Trennung der DNA-Stränge ersetzt. Nach 20- bis 25-minütiger Überschichtungszeit wurde die restliche Lösung wieder entfernt und das Gel wurde für weitere 20 bis 25 min mit einer Neutralisierungslösung überschichtet. Danach erfolgte der eigentliche Transfer der DNA auf die Nylonmembran durch die Inkubation von 2 h mit 20x SSC. Anschließend wurde das Gel unter Vakuum entfernt. Die Membran wurde kurz, ohne Schwenken, in 2x SSC gelegt, bevor sie getrocknet und beidseitig im „UV-Stratalinker 1800“ (Stratagene) mit 120 mJ (Einstellung am Gerät: „Auto Crosslink“) behandelt wurde. Die Membran wurde bei RT gelagert oder direkt für eine Hybridisierung verwendet.

4.1.8 Hybridisierung und Detektion von DNA-Sequenzen

Die Hybridisierung der Membran mit einer DIG-markierten Sonde erfolgte in einer Hybridisierungsröhre im Hybridisierungssofen. Zur Sättigung freier unspezifischer Bindestellen wurde die Membran mit 6x SSC, 0,5 % „Blocking“-Reagenz 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 3-stündige Prähybridisierung bei 55 °C mit einer „high-SDS“-Lösung mit 1/100 Volumen zuvor denaturierter Heringssperma-DNA (HS-DNA). Die Hybridisierung mit der Gen-Sonde erfolgte über Nacht unter den gleichen Bedingungen mit 25 ng denaturierter Sonde/mL „high-SDS“-Lösung und 1/100 Volumen HS-DNA. Nach der Hybridisierung wurde die überschüssige, nicht gebundene Sonde von der Membran zweimal 5 min mit 2x SSC, 0,1 % SDS bei RT und zweimal 15 min bei 68 °C mit 0,1x SSC, 0,1% SDS abgewaschen.

Zur Detektion der DNA-Sonden wurde die Membran 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 min in DIG-Puffer 2 bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit einer 1:10000 verdünnten Anti-DIG-AP-Antikörper-Lösung (in 10mL DIG-Puffer 2). Überschüssiger, nicht gebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen in Waschpuffer für je 10 min entfernt. Nach 5-minütiger Inkubation der Membran in DIG-Puffer 3 wurde diese auf eine Einschweißfolie gelegt. Auf die Membran wurde nun 500 µL 0,25 mM CSPD-Lösung (1:100 in DIG-Puffer 3) aufgebracht und nach kurzem Einwirken ausgestrichen. Die Membran wurde eingeschweißt und bei 37 °C für 15 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Membran in eine Filmkassette eingeklebt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Anschließend nach einer Exposition von 3 bis 5 h wurde der Röntgenfilm entwickelt.

4.1.9 Entfernen von DIG-Sonden

Sollte die Membran ein zweites Mal, aber mit einer anderen Gen-Sonde hybridisiert werden, so musste die gebundene DNA-Sonde, inklusive der Antikörper, wieder von der Membran entfernt werden. Die Membran wurde dazu aus der Einschweißfolie in eine Hybridisierungsröhre überführt und in Wasser für 5 min bei RT gewaschen. Weitere Wasch-Schritte erfolgten bei 37 °C für zweimal 10 min in 0,2 N NaOH, 0,1 % SDS und zweimal 15 min in 2x SSC. Danach konnte wie gewohnt prähybridisiert werden.

4.2 RNA-spezifische Methoden

4.2.1 Isolierung von RNA aus *Podospora anserina*

Bei der Isolation von RNA aus *P. anserina* ist darauf zu achten, möglichst RNase-frei zu arbeiten. Die benötigten Reaktionsgefäße wurden 30 bis 60 min in DMPC-H₂O inkubiert und zweimal autoklaviert. Ebenso wurden auch Pipettenspitzen zweimal autoklaviert, um anhaftende RNasen zu zerstören. Pro Isolat wurde eine PASM-Platte mit Myzelstücken auf Cellophanfolie 2 bis 3 Tage bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Das Myzel wurde von der Cellophanfolie abgeschabt und mit flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemörsert. Die Isolierung der im Myzelpulver enthaltenen RNA erfolgte durch Verwendung des „NucleoSpin® RNA Plant“-Kits (Macherey-Nagel) unter Angaben des Herstellers. Die im Protokoll beschriebene DNase-Behandlung der RNA-Proben (100 µL nach der Eluation mit RNase-freiem Wasser) wurde bei 37 °C für 30 bis 45 min in einem frischen Reaktionsgefäß durchgeführt. Danach wurde die RNA-Probe weiter nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 30 µL RNase-freiem Wasser eluiert.

4.2.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „iScript cDNA Synthesis“-Kit nach Angaben des Herstellers. Die Menge an eingesetzter RNA betrug dabei zwischen 500 ng und 1 µg. Nach der cDNA-Synthese wurden die Reaktionsansätze auf 50 µL bzw. 100 µL mit sterilem Wasser aufgefüllt.

4.2.3 Quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR) zur Analyse von Transkriptmengen

Die Analysen der Transkriptmengen wurden durch eine quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR) mit der cDNA von mittelalten Wildtypen und *PaSod*-Mutantenstämmen durchgeführt. Hierzu wurde der „iQ SYBR Green Supermix“ nach Herstellerangaben verwendet und im Thermocycler My iQ durchgeführt. Nach jedem Elongationszyklus kann die Menge des Produkts durch die gesteigerte Fluoreszenz gemessen werden. Die Produktmenge wird hierbei als ein C(t)-Wert angegeben. Der C(t)-Wert gibt dabei an, in welchen Zyklus des PCR-Programms die gemessene Polymerase-Reaktion in den Bereich des linearen Produktzuwachses gekommen ist. Je mehr Produkt in der Matrice

vorhanden ist, desto früher beginnt der lineare Zuwachs und desto kleiner ist der C(t)-Wert. In Vorversuchen wurde zunächst die optimale Konzentration der cDNA sowie die geeignete Konzentration der Oligonukleotide und deren Effizienz nach Pfaffl (2001) ermittelt (Tab. 12).

Tab. 12: Aufstellung der eingesetzten cDNA-Menge sowie die optimale Konzentration der Oligonukleotide und deren ermittelte Effizienz.

verwendetes Oligonukleotidpaar	optimale Konzentration der Oligonukleotide	optimale cDNA-Menge	ermittelte Effizienz
HSP60-1/2	900 nM	1 µL = 10 ng	1,84
Porin-RTfor/rev	900 nM	1 µL = 10 ng	2,03
Real_Lon_for/rev	500 nM	2 µL = 20 ng	2,02
Real_ClpP_for/rev	700 nM	2 µL = 20 ng	1,56
Real_Prx1_for/rev	700 nM	1 µL = 10 ng	1,95

Um die Transkriptmenge in einer Probe mit der Transkriptmenge einer anderen Probe vergleichen zu können, muss die cDNA-Gesamtmenge in beiden Proben normalisiert werden. Zur Normalisierung der cDNA-Gesamtmenge wurde *PaPorin* ausgewählt, da davon auszugehen ist, dass dieses Gen bei den untersuchten Bedingungen nicht reguliert wird. Um den Fehler innerhalb einer experimentellen Probe zu verringern, wurde pro Probe ein 3,5-facher Mix für 3 Ansätze á 25µl hergestellt. Die C(t)-Werte des Zielgens (*PaHsp60*, *PaClpP*, *PaLon* und *PaPrx1*) bzw. des Referenzgens (*PaPorin*) sowie deren Effizienz wurden zur Berechnung des Expressionsverhältnis (Ratio) in folgende Formel von Pfaffl (2001) eingesetzt:

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CP}_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

E=Effizienz; $\Delta\text{CP}=\text{C(t)Kontrolle}-\text{C(t)Behandlung}$

4.3 Protein-spezifische Methoden

4.3.1 Isolierung von Gesamtproteinextrakten aus *P. anserina*

Zur Isolierung von Gesamtprotein wurde pro Probe je eine mit Cellophanfolie-bedeckten BMM-haltige Platten (bei Isolat eines bestimmten Alters auf 30 mL PASM-haltigen Platten) mit Myzelstücken bei Dauerlicht und 27 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 2- bis 3-tägiger Inkubation wurde das Myzel vorsichtig von der Cellophanfolie abgenommen und in 200 mL flüssigem CM-Medium in einen Weithalskolben überführt. Das Myzel wurde nach einer erneuten 2- bis 3-tägiger Inkubation bei 27 °C (schüttelnd und im Dauerlicht) über zwei Lagen Mull abfiltriert. Nach gutem Auspressen der restlichen Flüssigkeit wurde das Myzel in flüssigem Stickstoff pulverisiert und in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach anschließender Zugabe des Extraktionspuffers (50 µL/100 mg Myzel) und gründlichen Durchmischen, solange bis das Myzel-Puffer-Gemisch aufgetaut war, folgte zur Sedimentation der Zellreste eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 rpm

(Festwinkelrotor FA-45-24-11). Der Überstand mit dem Gesamtprotein wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

4.3.2 Isolierung von mitochondrialen Proteinextrakten aus *P. anserina*

Von dem zu isolierten Stamm wurden Myzelstücke auf 6 bis 8 BMM-Platten (bei Isolat eines bestimmten Alters auf 30 mL PASM-haltigen Platten) mit Cellophanfolie 2 bis 3 Tagen bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Pro Platte wurde das Myzel von der Cellophanfolie in 200 mL flüssiges CM-Medium in einen Weithalskolben überführt und für weitere 2 bis 4 Tage bei 27 °C und Dauerlicht schüttelnd inkubiert. Die Isolation erfolgte bei 4 °C im Kühlraum. Das Myzel wurde über 4-lagigem Mull abfiltriert, ausgepresst und auf Eis in Mitochondrien-Isolierungspuffer gestellt. In maximal 5 g Portionen wurde das Myzel im „Bead-Beater™“ homogenisiert. Hierzu wurde der Behälter 1/3 mit sterilen Glasperlen, Myzel und Mitochondrien-Isolierungspuffer mit 0,2 % BSA aufgefüllt. Um kleine Luftblasen auf der Oberfläche zu entfernen, wurden 3 bis 4 Tropfen Antifoam-Verdünnung (1:5 Verdünnung) zugegeben. Es dürfen sich keine Luftblasen im geschlossenen Behälter befinden. In zweimal 20-sekundenlangen Homogenisationsschritten, mit 1 min Pause dazwischen, wurde das Myzel durch die Glasperlen zerschlagen. Das Homogenisat wurde durch ein Nesseltuch filtriert und auf 2 GSA-Becher verteilt. Die groben Zelltrümmer wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 2.000 rpm (Festwinkelrotor Super-Lite GSA SLA-1500) sedimentiert. Der Überstand wurde über Glaswolle filtriert und auf 2 GSA-Becher verteilt. Das Filtrat wurde 20 min bei 4 °C und 10.500 rpm (Festwinkelrotor Super-Lite GSA SLA-1500) zentrifugiert. Vom Überstand, die postmitochondriale Fraktion, wurde ein Aliquot bei -80 °C eingefroren. Im Pellet befinden sich die Mitochondrien und Vakuolen, die in 1 mL Mitochondrien-Isolierungspuffer (ohne BSA) vorsichtig ohne Luftblasen resuspendiert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt wurden. Nach 2 bis 3 min hatten sich noch vorhandene Zellwandreste am Boden abgesetzt. Der Überstand wurde in ein SS34-Zentrifugenröhrchen überführt, mit Mitochondrien-Isolierungspuffer (ohne BSA) zu 2/3 aufgefüllt und bei 11.500 rpm (Festwinkelrotor Sorvall SS34) für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der zentrale dunkelbraune Teil des Pellets (Vakuolen) wurde vorsichtig mit einer Pipettenspitze entfernt. Der hellere außenliegende Teil des Pellets (Mitochondrien) wurde vorsichtig und luftblasenfrei mit max. 300 bis 400 µL Mitochondrien-Isolierungspuffer resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

4.3.3 Isolierung von nativen sekretierten Proteinen aus *P. anserina*

Zur Isolierung von sekretierten Proteinen wurde von dem zu isolierten mittelalten Stamm Myzelstücke auf 2 BMM-Platten mit Cellophanfolie 3 Tagen bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Das Myzel wurde von der Cellophanfolie in 150 mL flüssiges CM-Medium in einen Fernbachkolben überführt und für weitere 4 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Da unter schüttelnder Bedingung eine Sekretion verhindert wird und zudem auch durch die Scherkräfte eine Beschädigung

der Hyphen dazu führen kann, dass das Medium mit Gesamtprotein kontaminiert wird, erfolgte die Inkubation ohne Schütteln. Das Myzel wurde vorsichtig über 4 Lagen Mull abfiltriert ohne es auszupressen, um Kontaminationen mit Gesamtprotein zu vermeiden. Das Filtrat (150 mL CM-Medium) mit den darin befindlichen sekretierten Proteinen wurde durch die Verwendung einer Filtersäule (filter tubes Amicon Ultra-15, Ultracel-3k, Millipore) in 15 mL-Schritten bei 4 ° und 4.000 g (Festwinkelrotor A-4-44) für 40 min eingeengt. Die Überstände wurden gesammelt, mit einem Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC, 1:100) versetzt und auf Eis gehalten. Zur Fällung der Proteine wurde je 300 µL der eingeengten Überstände in 2 mL Reaktionsgefäß vorgelegt, mit 2 Vol Ethanol (-20 °C) und 2 Vol Aceton (-20 °C) gemischt und für 2 Tage bei -20 °C inkubiert. Nach gutem Durchmischen der Proben wurden diese bei 4 °C und 15.000 rpm (Festwinkelrotor FA-45-24-11) für 30 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet mit 1 mL Entsalzerlösung (2:1:1 Wasser:Ethanol:Aceton) überschichtet, gut durchmischt und für 24 h bei -20 °C inkubiert. Dieser Entsalzungsprozess wurde noch zweimal wiederholt bevor das Proteinpellet getrocknet und in 30 bis 50 µL Extraktionspuffer bei RT rückgelöst wurde. Die sekretierten Proteinproben wurden bei -80 °C gelagert.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinproben

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen basiert auf der Methode von Bradford (1976). Hierzu wurde eine Eichgerade mit verschiedenen Verdünnungen einer BSA-Stammlösung (1 µg/µL) erstellt. Zu jeder Probe wurden 10 µL des verwendeten Puffers zugegeben und mit Wasser auf 1,6 mL aufgefüllt. Nach Zugabe von 400 µL Roti-Nanoquant wurde der Ansatz gut gemischt und die Absorption bei 450 nm und 590 nm in einem Photometer gemessen. Die lineare Regression durch den Quotienten beider Messwerte ergibt die Eichgerade. Um nun den Proteingehalt einer Probe zu messen, wurden statt der BSA-Stammlösung 2 µL der Probe mit 8 µL des verwendeten Puffers gemischt und ebenfalls die Absorption photometrisch bei 450 nm und 590 nm gemessen. Anhand des Quotienten wurde die Proteinkonzentration aus der zuvor erstellten Eichgerade abgelesen.

4.3.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot-Analyse

Zur Auftrennung von Proteinproben wurden denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Dabei wurde das Elektrophorese-System „Mini-Protean II“ (BioRad) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die aufzutrennenden Proben wurden in 1x SDS-Probenpuffer 10 min bei 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben mind. 10 min auf Eis gehalten, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Neben den Proben wurde als Größenstandard 1,5 µL des Proteinmarkers auf das Gel mit aufgetragen. Als Laufpuffer diente der 1x SDS-Laufpuffer. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde 2 bis 3 h bei 100 V, bis die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Gels austrat, durchgeführt.

Die in den SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert, um die Detektion bestimmter Proteine mittels Immunodetektion zu ermöglichen. Dabei wurde die Western-Blot-Apparatur „Mini-Protean II“ mit Tank-Blot-Zubehör nach Herstellerangaben verwendet. Die aufgetrennten Proteine wurden im Blotting-Puffer 1 h bei 100 V und 4 °C auf eine PVDF-Membran, die zuvor 30 sec in Methanol aktiviert wurde, transferiert. Danach wurde die Membran für 30 sec in Methanol fixiert und in H₂O 1 min rehydriert.

Die anschließende Blockierung der Membran sowie die Inkubation der Primär- und Sekundärantikörper wurde nach dem Odyssey Western Blot-Analyse Handbuch durchgeführt. Die Detektion wurde mit dem „Odyssey Infrared Imager“ (LICOR) durchgeführt und ausgewertet.

4.3.6 Nachweis von carbonylierten Proteinen („OxyBlot“-Analyse)

Um mögliche oxidativen Schäden während der Aufarbeitung der Gesamtproteinisolierung zu minimieren, wurde für den Nachweis von carbonylierten Proteinen das Gesamtprotein unter der Verwendung des Extraktionspuffers mit 50 mM DTT isoliert. Die Aufarbeitung der Gesamtproteinextrakte wurde nach Herstellerangaben des „OxyBlot Protein Oxidation Detection“-Kit (Millipore) durchgeführt. Die behandelten Proteinproben wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Sowohl der Transfer der Proteine auf eine Membran als auch die anschließende Detektion der carbonylierten Proteinen wurde standardmäßig durchgeführt.

4.3.7 SOD-Aktivitätsanalysen

Die Proteinproben der zu untersuchenden Stämme wurden in 1x nativem Proteinladepuffer auf ein natives 8,5 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und 2 bis 3 h bei 100 V im nativen 1x Laufpuffer aufgetrennt bis die Bromphenolblau-Front am unteren Ende des Gels austrat. Nach dem Beenden der Elektrophorese wurde das Gel kurz mit Kaliumphosphatpuffer gewaschen und 20 min schüttelnd in frisch angesetzter NBT-Lösung dunkel inkubiert. Danach wurde die Lösung abgenommen und durch frisch angesetzte Riboflavin-Lösung ersetzt. Das Gel wurde darin ebenfalls dunkel und schüttelnd 20 min inkubiert, bevor es in der Lösung über einen Leuchttisch leicht geschwenkt wurde. Nach dem Erscheinen von hellen Banden im dunkelvioletten Gel wurde das Gel dokumentiert und ausgewertet.

4.3.8 Katalaseaktivitätsfärbungen

Die Proteinproben der zu untersuchenden Stämme wurden mit einem 1x nativen Proteinladepuffer auf ein natives 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen und über Nacht bei 70 V bei 4 °C aufgetrennt. Um störende Salze nach der Elektrophorese im Gel zu entfernen, wurde das Gel dreimal 15 min in Wasser gewaschen. Darauf folgte die Inkubation des Gels in der Katalaseaktivitätsgel-

Inkubationslösung für 10 min schüttelnd und dunkel. Anschließend wurde die Lösung abgenommen und durch frisch angesetzte Katalaseaktivitätsgel-Färbelösung ausgetauscht. Das Gel wurde schwenkend in der Lösung über einen Leuchttisch gestellt bis zum Erscheinen von helleren Banden im grünlich-gefärbten Gel. Danach wurde das Gel dokumentiert und ausgewertet.

4.3.9 Coomassie-Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen oder auf Membranen

Zur Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen wurde entweder ein gleich beladenes Gel oder das Gel nach dem Proteintransfer auf eine Membran 1 h in der Coomassie-Färberlösung (für Gele) inkubiert und über Nacht in Wasser oder in der Coomassie-Entfärberlösung (für Gele) entfärbt.

Zur Coomassie-Färbung von Membranen wurde die Membran nach der Detektion von spezifischen Proteinen 1 h in der Coomassie-Färberlösung (für Membranen) inkubiert und über Nacht in Wasser oder in der Coomassie-Entfärberlösung (für Membranen) entfärbt

Die mit Coomassie angefärbten Proteine wurden entweder mit dem Computerprogramm von „Quantity One“ (BioRad) oder des „Odyssey Infrared Imager“ (LICOR) ausgewertet.

4.4 *Podospira anserina*-spezifische Methoden

4.4.1 Kultivierung und Anzucht von *P. anserina*

Standardmäßig erfolgte, falls nicht anders angegeben, die Anzucht von *P. anserina* auf BMM bei 27 °C unter konstantem Licht nach Esser et al. (1974). Bis zum nächsten Gebrauch wurde das Myzel bei 4 °C gelagert und alle 3 bis 6 Monate auf eine neue BMM-Platte überimpft, um den Stamm zu erhalten. Für eine längere Lagerung wurden die Stämme in eine Stammsammlung überführt. Flüssigkulturen wurden je nach Versuch schütteln oder nicht schüttelnd (140 bis 180 rpm) bei Dauerlicht und 27 °C in CM-gefüllte Weithalskolben bzw. Fernbachkolben angezogen. Die genauen Anzuchtsbedingungen sind in der jeweiligen Methode genauer beschrieben.

Zur Erzielung von *P. anserina*-Kulturen eines bestimmten Alters wurde das Myzel von 2 Tage alten ausgekeimten Sporen auf eine Seite einer mit 30 mL gefüllten PASM-Platte angeimpft, bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert und die Wuchsfront alle 2 bis 3 Tage markiert. Die Kulturplatten wurden bis zum Gebrauch bei Raumtemperatur gelagert.

4.4.2 Protoplastierung und Transformation von *P. anserina*

Die Protoplastierung und Transformation, sowie die Regeneration der Sphäroplasten wurde nach der Methode von Osiewacz et al. (1991) und Stumpferl et al. (2004) durchgeführt.

4.4.3 Kreuzung von zwei Stämmen, sowie die Isolation und Auskeimung von Sporen

Alle Kulturen, die für die genetischen Analysen verwendet wurden, stammen von monokaryotischen Sporen. Zur Kreuzung wurden zwei Isolate entgegengesetzten Kreuzungstyps gegenüber auf eine M2-Platte angeimpft und für etwa 1 bis 2 Wochen bei Dauerlicht und 27 °C inkubiert. Aus den bei der Befruchtung entstandenen Perithezien, die die Asci mit den Ascosporen beinhalten, wurden unter dem Binokular Sporen isoliert. In der Regel enthält ein Ascus vier zweikernige Sporen. Die Mehrheit dieser Sporen sind heterokaryotisch und besitzen den Paarungstyp +/- . Nur in seltenen Fällen ist der Paarungstyp -/- oder +/+. Gelegentlich, resultierend aus einer abnormalen Spindelanlage während der postmeiotischen Mitose, werden zwei einkernige homokaryotische Ascosporen anstelle einer zweikernigen heterokaryotischen Ascospore ausgebildet. Die einkernigen Ascosporen sind kleiner als die zweikernigen Sporen. Diese homokaryotischen Ascosporen führen zu selbststerilen (+ oder -) Kulturen, die für die genetischen Analysen verwendet wurden. Zum Auskeimen wurden die isolierten Sporen auf BMM-Platten mit Ammoniumacetat bzw. bei den *PaSod1*-Deletionsstämmen auf CM-Festmedium mit Ammoniumacetat für 2 Tage im Dunkeln bei 27 °C inkubiert.

4.4.4 Bestimmung der Wuchsraten

Zur Ermittlung der Wachsrates des Wildtyps und der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme auf Stress-induzierenden Medien (Paraquat oder Wasserstoffperoxid) wurden 2 Tage alte Stämme von den Ammoniumacetat-beinhaltenen Auskeimungsplatten auf 30 mL PASM-Platten mit verschiedenen Konzentrationen der Stressoren (0-40 µM Paraquat oder 0-12 mM H₂O₂) angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C unter konstantem Licht. Der Versuchsansatz mit H₂O₂ wurde in Dunkelheit bei 27 °C durchgeführt, um einen schnellen Abbau des Wasserstoffperoxids zu verhindern, da dieses bei Lichteinwirkung leicht zerfällt. Die Wuchsfrente wurde täglich auf den Platten markiert und nach maximal 5 Tagen ausgewertet.

4.4.5 Bestimmung der Lebensspannen

Die Lebensspanne des Wildtyps sowie der verschiedenen *PaSod*-modulierten Stämme wurde mit juvenilem 2 Tage altem Myzel von den Ammoniumacetat-beinhaltenen Auskeimungsplatten ermittelt. Hierzu wurde ein kleines Myzelstück an einem Ende eines mit 50 mL PASM gefüllten Rennrohrs gesetzt. Die angeimpften Rennrohre wurden in der Klimakammer bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Alle 2 bis 3 Tage wurde die Wuchsfrente auf dem Rennrohren markiert. Die Lebensspanne wird als Zeitraum in Tagen definiert, an dem die Hyphen ein lineares Wachstum aufweisen. Nach dieser Zeit stoppt das lineare Hyphenwachstum wobei die Bildung von Lufthyphen reduziert und die Pigmentierung stark erhöht ist. Die mittlere Lebensspanne ist der Durchschnitt an Tagen der Isolate eines Stammes und wurde prozentual zum Wert der mittleren Lebensspanne des mitgetesteten Wildtyps angegeben.

4.4.6 Messung der H₂O₂-Freisetzung von Myzel

Die Messung der Freisetzung von Wasserstoffperoxid beruht auf der Methode von Munkres (1990) und wurde modifiziert nach Kowald et. al (2012) durchgeführt. Es wurden kleine Myzelstücke auf PASM-Platten (ohne und mit 0,625, 1,25, 1,875 und 2,5 µM Paraquat) angeimpft und die Platten für 4 Tage bei 27 °C und Dauerlicht inkubiert. Nach ausreichender Bewachsung der angeimpften Platten wurden mit einem 200 µL Reaktionsgefäß kleine kreisrunde Myzelstücke mit Medium aus den Platten entnommen und in eine 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Die Myzelstücke wurden für 3 h mit je 200 µL einer DAB-Färbelösung bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µL der DAB-Färbelösung in eine frische 96-Well-Mikrotiterplatte überführt und die Absorption bei 471 nm im Photometer (Tecan, Safire 2) gemessen. Um die Werte auf das Myzelgewicht und auf die H₂O₂-Menge beziehen zu können, wurde eine Eichgerade mit verschiedenen H₂O₂-Konzentrationen ohne Myzel erstellt und das Trockengewicht der gemessenen Myzelmasse (ohne Medium und Agar) bestimmt. Um das Trockengewicht zu ermitteln wurden gleich große Myzelstücke wie für die Messung mit DAB aus der Platte ausgestanzt und mit Wasser zum Entfernen des Agars aufgeköcht. Das Myzel wurde abfiltriert und 2 bis 3 Tage luftgetrocknet bevor es gewogen wurde. Die Parameter (H₂O₂-Konzentration (nmol) und Myzelmenge (mg)) wurden miteinander verrechnet und statistisch ausgewertet.

4.4.7 Mikroskopische Untersuchungen

Zu untersuchende *PaSod::gfp*-Stämme wurden wie folgt zu mikroskopischen Analysen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM, engl.: confocal laser scanning microscope) vorbereitet: Ein mit PASM-Medium beschichteter Muldenobjektträger wurde mit einem kleinem Myzelstück angeimpft und in eine feuchte Box bei 27 °C und Dauerlicht für 1 bis 2 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für die Mikroskopie am CLSM vorbereitet. Zum Anfärben der Mitochondrien und der Zellkerne wurden die Hyphen mit einer MitoTracker Red-Lösung (1:2000 verdünnt) und einer DAPI-Lösung (1:10000 verdünnt) behandelt. Nach einer kurzen Inkubation wurde ein Deckglas auf den Muldenobjektträger gesetzt, überschüssige Färbelösung entfernt und die Proben mikroskopiert. Die Mikroskopbilder wurden mit „Photoshop CS3“ (Adobe) bearbeitet.

5 Ergebnisse

5.1 Die Superoxid-Dismutasen (PaSODs) in *Podospira anserina*

Ende der 1990er Jahre, bevor die komplette Genomsequenz von *P. anserina* bekannt war, wurden die Superoxid-Dismutasen (PaSODs) in diesem Organismus untersucht: Zum einen die PaSOD1, eine Cu/ZnSOD und zum anderen die PaSOD2, eine MnSOD (Borghouts et al., 2001 und 2002). Eine genaue Lokalisationsstudie wurde jedoch nicht durchgeführt und somit wurde davon ausgegangen, dass PaSOD1 im Cytoplasma und zu geringen Teilen im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert sei, wie bereits auch für *S. cerevisiae* publiziert wurde (Sturtz et al., 2001). Hingegen wurde für die PaSOD2, da es sich aufgrund einer vorhergesagten Mn-Bindedomäne um eine MnSOD handelt, eine Lokalisation in der Mitochondrien-Matrix angenommen. Erst später durch die Veröffentlichung des vollständig sequenzierten und annotierten Genoms von *P. anserina* und durch Untersuchungen von isolierten Mitochondrien ergaben sich Hinweise auf eine weitere MnSOD, benannt PaSOD3 (persönliche Mitteilung von Herrn Grief und Frau Luce, AK Osiewacz). Eine schematische Darstellung der Domänenanordnung, sowie die Proteingröße der jeweiligen Superoxid-Dismutasen sind in Abb. 8 dargestellt.

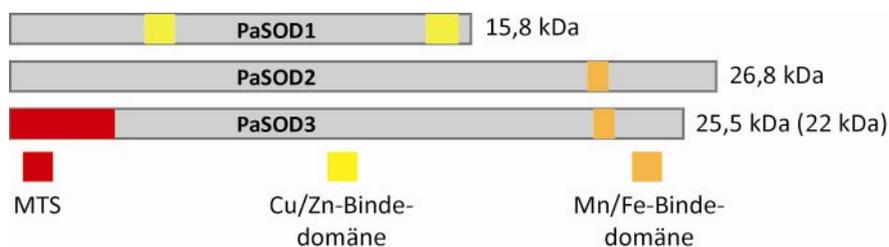


Abb. 8: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der drei Superoxid-Dismutasen in *P. anserina*. PaSOD1 ist charakterisiert durch ihre zwei Cu/Zn-Bindedomänen (gelb). Bei den beiden anderen PaSODs, PaSOD2 und PaSOD3, handelt es sich um MnSODs aufgrund ihrer Mn/Fe-Bindedomäne. Zusätzlich besitzt PaSOD3 eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz (MTS), welche durch die algorithmische Sequenzanalyse (MITOPROT, <http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>) ermittelt wurde. Das Molekulargewicht ist rechts außen angegeben. In Klammern ist das Molekulargewicht nach Abspaltung der MTS aufgeführt. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010).

Bei PaSOD1 handelt es sich um eine putative Cu/ZnSOD mit einem Molekulargewicht von 15,8 kDa. Die zwei anderen PaSODs, PaSOD2 und PaSOD3, hingegen sind Mn-abhängige Superoxid-Dismutasen, wobei PaSOD3 eine putative mitochondriale Signalsequenz (MTS), die beim Eintransport in die Mitochondrien abgespalten wird, aufweist. Das Molekulargewicht von PaSOD2 und PaSOD3 beträgt 26,8 und 25,5 kDa, wobei PaSOD3 nach

Abspaltung der MTS ein Molekulargewicht von 22 kDa besitzt. Um anhand der Aminosäuresequenz einen Hinweis zu erlangen, welche der beiden MnSODs in den Mitochondrien lokalisiert ist, wurden die Aminosäuresequenzen mit einer algorithmischen Sequenzanalyse (PSORTII, <http://psort.hgc.jp/form2.html>, Horton und Nakai 1997) untersucht.

Bei PSORT.org handelt es sich um ein Internetportal, das Programme anbietet, mit welchen die subzelluläre Lokalisation anhand der Aminosäuresequenz eines Proteins vorhergesagt werden kann. Die Aminosäuresequenz für PaSOD2 und PaSOD3 wurden algorithmisch auf sogenannte Signalsequenzen untersucht. Eine Signalsequenz ist eine Abfolge von Aminosäuren, die über den Transportweg und Bestimmungsort des synthetisierten Proteins innerhalb der Zelle festlegt.

Danach liegt die Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisation für PaSOD2 bei 13 % und für PaSOD3 bei 82,6 %.

5.2 Die Lokalisation der Superoxid-Dismutasen

Die oben durchgeführten algorithmischen Sequenzanalysen liefern nur einen Hinweis auf einen möglichen Aufenthalt der drei PaSODs. Die tatsächliche Lokalisation muss daher biochemisch über fraktionierte Proteinextrakte bzw. fluoreszenzmikroskopisch bestimmt werden. Daher wurden zunächst Gesamtproteinextrakte und mitochondriale Proteinextrakte des Wildtyps und der *PaSod*-Deletionsstämmen durch Western Blot- und „in Gel“-SOD-Aktivitätsanalysen untersucht (Abb. 9).

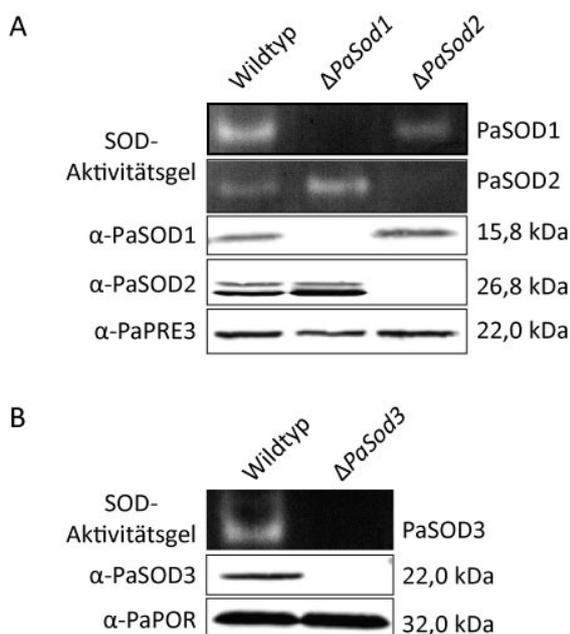


Abb. 9: SOD-Aktivitäts- und Western Blot-Analysen vom Wildstamm und *PaSod*-Deletionsstämmen. **A** 100 µg Gesamtproteinextrakt des Wildtyps sowie des *PaSod1*- und *PaSod2*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod1$ und $\Delta PaSod2$) und **B** 100 µg mitochondrialen Proteinextrakt des Wildtyps und des *PaSod3*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod3$) wurden durch ein SOD-Aktivitätsgel und eine Western Blot-Analyse untersucht. Die verwendeten Antikörper sind links aufgeführt. α -PaPRE3 und α -PaPORIN dienen als Ladekontrolle. Rechts sind die Aktivität der jeweiligen PaSOD sowie das molekulare Gewicht aufgeführt. Die SOD-Aktivität und Proteinmenge von PaSOD1 und PaSOD2 sind ausschließlich im Gesamtproteinextrakt nachzuweisen, während die Aktivität und Proteinmenge von PaSOD3 nur im mitochondrialen Proteinextrakt zu erkennen ist. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010).

Aus den Analysen geht hervor, dass ausschließlich für PaSOD3 eine mitochondriale Lokalisation und Aktivität nachzuweisen ist, während Protein und Aktivität von PaSOD1 und PaSOD2 nur im Gesamtproteinextrakt zu erkennen sind.

Um die *in-silico*-Analysen, sowie die biochemischen Untersuchungen verschiedener Proteinfractionen zu bestätigen und die Lokalisation von PaSOD1-3 zytologisch zu bestimmen, wurden mikroskopische Lokalisationsstudien mit SOD::GFP-Fusionsproteinen in *P. anserina* durchgeführt. Hierbei wurde der Leserahmen und der ca. 1 kbp anschließende 5'-Bereich (Promotor) jedes *PaSod*-Gens in das Plasmid pSM4 vor dem *eGfp*-Gen hineinkloniert. Die hergestellten Plasmide (pPaSod1-3::gfp) wurden in Protoplasten von *P. anserina* transformiert (Schwitalla, 2007). Die gewonnenen *PaSod*::gfp-Stämme (*PaSod1*::gfp, *PaSod2*::gfp und *PaSod3*::gfp) wurden mikroskopisch untersucht (Abb. 10).

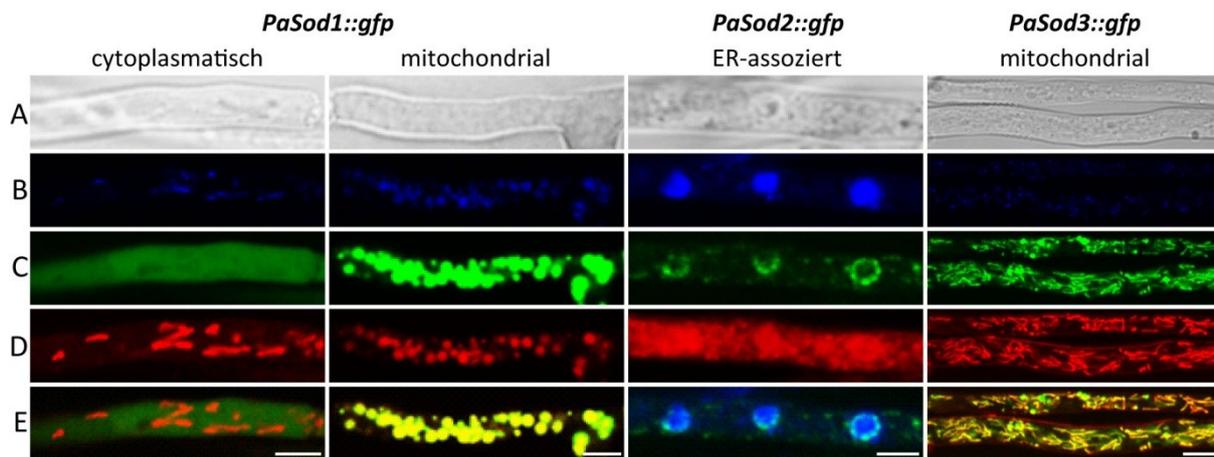


Abb. 10: Mikroskopische Lokalisationsanalysen der PaSOD::GFP-Fusionsproteine. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Hyphenabschnitten der drei *PaSod*::gfp-Stämme (*PaSod1*::gfp, *PaSod2*::gfp und *PaSod3*::gfp). **A** Aufnahme des Hyphenabschnitts im Durchlicht. **B** Die Zellkern- und mitochondriale DNA wurde mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) angefärbt. **C** Fluoreszenzaufnahme des jeweiligen PaSOD::GFP-Fusionsproteins. **D** Fluoreszenzaufnahme der Mitochondrien, die mit dem Fluorochrom MitoTracker Red CMXRos gefärbt wurden. **E** Überlagerung der GFP-Fluoreszenz und der Fluoreszenz der gefärbten Mitochondrien des *PaSod1*::gfp- und *PaSod3*::gfp-Stammes oder DNA des *PaSod2*::gfp-Stammes. Balkenskala: 2 µm. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010).

Diese Lokalisationsstudie zeigt, dass die Fluoreszenz des PaSOD1::GFP-Fusionsproteins hauptsächlich diffus in den Hyphen, jedoch auch zu einem geringen Anteil an fragmentierten Mitochondrien lokalisiert ist. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass sich PaSOD1 überwiegend im Cytoplasma befindet und ähnlich zu der Cu/ZnSOD in *S. cerevisiae* zu einem geringen Teil auch mitochondrial lokalisiert ist. Die Fluoreszenz des PaSOD3::GFP-Fusionsproteins co-lokalisiert mit den filamentösen Strukturen der Mitochondrien. Demzufolge ist PaSOD3 die mitochondriale MnSOD-Isoform. Die Fluoreszenzaufnahmen des

PaSod2::gfp-Stammes hingegen zeigten, dass das PaSOD2::GFP-Fusionsprotein besonders um den Zellkern lokalisiert, was darauf hindeutet, dass diese PaSOD-Isoform im endoplasmatischen Retikulum (ER) vorliegt. Dies könnte dafür sprechen, dass es sich bei PaSOD2 um eine extrazelluläre SOD (EC-SOD) handelt, welche sekretiert wird. Um dies genauer zu prüfen, wurden Untersuchungen einer möglicher Sekretion der PaSOD2 durch Western Blot- und SOD-Aktivitätsanalysen mit sekretierten Wildtypproben von verschiedenen Altersstufen sowie Gesamtproteinextrakte von einem Wildtyp-, *PaSod2*-Deletions- und Überexpressionsstamm zur Kontrolle durchgeführt (Abb. 11).

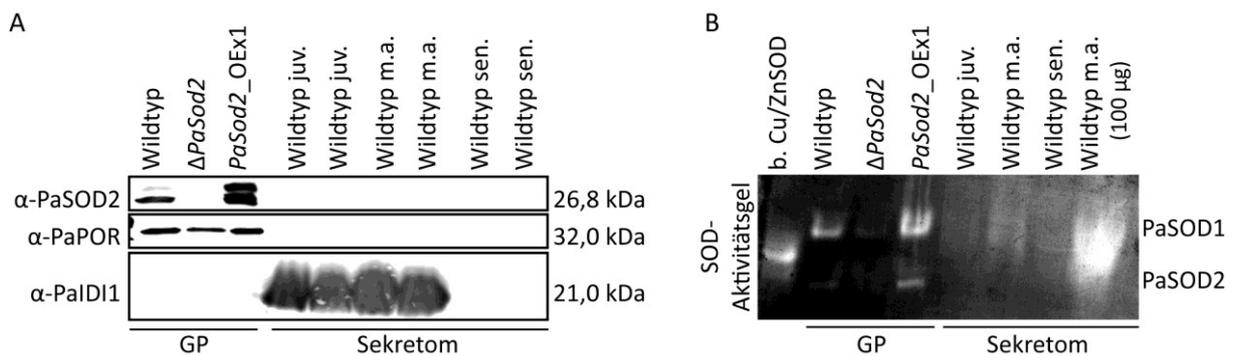


Abb. 11: Sekretomanalysen zur Untersuchung einer möglichen extrazellulären Lokalisation von PaSOD2. 50 μ g Gesamtproteinextrakt (GP) vom Wildtyp, $\Delta PaSod2$ und *PaSod2_OEx1*, sowie 50 μ g sekretierte Proteine (Sekretom) vom Wildtyp verschiedener Altersstufen (juv. = juvenil, m.a. = mittelalt und sen. = seneszent) wurden durch eine Western Blot-Analyse (A) und in einem SOD-Aktivitätsgel (B) untersucht. Verwendete Antikörper sind auf der linken Seite und die Größen, sowie die Aktivitätsbande der jeweiligen PaSOD auf der rechten Seite angegeben. Als Ladekontrolle diente α -PaPORIN (α -PaPOR) für die Gesamtproteinextrakte und α -PaIDI1 für die Sekretomproben (PaIDI1 ist ein sekretiertes Protein, welches in Sekretomproben von seneszenten Stämmen nicht nachweisbar ist, da es altersreguliert ist (Kant, 2009)). Als Positivkontrolle im Aktivitätsgel wurden 3 μ g aus Rind isolierte Cu/ZnSOD (b. Cu/ZnSOD) aufgetragen.

Durch die Western Blot-Analyse konnte das PaSOD2-Protein in Gesamtproteinextrakten des Wildtyps und des *PaSod2*-Überexpressionsstammes nachgewiesen werden. In den Sekretomproben lässt sich keine PaSOD2 durch den PaSOD2-Antikörper nachweisen (Abb. 11 A). Eine Sekretion des PaSOD2-Proteins konnte demnach nicht belegt werden. Eine Erklärung, warum der Antikörper das PaSOD2 nicht erkennt, kann mit den Eigenschaften des PaSOD2-spezifisch generierten Antikörpers verbunden sein, da dieser gegen die letzten 12 C-terminal gelegenen Aminosäuren des PaSOD2-Proteins gerichtet ist. Eventuell wird dieser Bereich stark glykosyliert oder sogar beim Sekretionsprozess abgespalten, was dazu führt, dass der generierte PaSOD2-Peptidantikörper nicht an das Protein binden kann und somit eine Detektion von PaSOD2 in Sekretomproben nicht möglich ist. Jedoch lässt sich durch das SOD-Aktivitätsgel in Sekretomproben eine SOD-Aktivitätsbande, dessen Laufhöhe zwischen

den PaSOD1- und PaSOD2-Aktivitätsbanden liegt, nachweisen (Abb. 11 B). Ein Unterschied in der Laufhöhe kann durch mögliche Prozessierungsschritte (bspw. Abspaltung eines Signalpeptides, Glykosylierungen oder Phosphorylierungen) der PaSOD2 erklärt werden. Die Analysen der PaSOD-Aktivität deuten darauf hin, dass es sich bei PaSOD2 um eine extrazelluläre MnSOD handelt, die zur Abwehr von exogenem Superoxid sekretiert wird.

Zusammenfassend geht aus den Untersuchungen der Lokalisation der PaSODs hervor, dass PaSOD1 die klassische Cu/ZnSOD des Cytosols und des mitochondrialen Intermembranraums ist, PaSOD2 wird vermutlich sekretiert und PaSOD3 ist in den Mitochondrien lokalisiert.

5.3 Manipulation der PaSOD-Menge

Um experimentell die Rolle der einzelnen Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* in Bezug auf ihre Resistenzeigenschaften gegenüber oxidativen Stress sowie ihren Einfluss auf Proteinschäden und die Lebensspanne zu untersuchen, wurden Stämme generiert, in denen die *PaSods* einzeln überexprimiert oder deletiert wurden.

5.3.1 Herstellung der *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämme

Die Generierung der *PaSod*-Deletionsstämme erfolgte nach einem Zweistufen-Verfahren (Hamann et al., 2005). Hierbei wurde durch die Verwendung der hergestellten Deletionscosmids Δ SOD1 20B4, Δ SOD2 46D11 und Δ SOD3 8F5 (Schwitalla, 2007) das jeweilige endogene *PaSod*-Gen im *P. anserina*-Genom durch eine homologe Rekombination gegen eine Phleomycin-Resistenzkassette ausgetauscht. Nach der Transformation des jeweiligen Deletionscosmids in *P. anserina* Wildtyp-Protoplasten wurden die erhaltenen Phleomycin-resistenten und Hygromycin-sensitiven Transformanten zur Identifizierung einer möglichen *PaSod*-Deletion durch eine Southern Blot-Analyse untersucht (siehe Anhang Abb. S1 A und S3 B). Zusätzlich zum bereits vorhandenen *PaSod2*-Deletionsstamm Δ *PaSod2* T78 (Schwitalla, 2007) wurden drei *PaSod1*-Deletionsstämme (T4-6, T4-41 und T5-51), die im Folgenden als Δ *PaSod1* bezeichnet werden und ein *PaSod3*-Deletionsstamm (Δ *PaSod3* T8-28) erhalten.

Zur Herstellung der *PaSod*-Überexpressionstämme lagen bereits die drei Plasmidkonstrukte (pSod1Ex1, pSod2Ex1 und pSod3Ex1) aus einer Diplomarbeit (Schwitalla, 2007) vor. In diesen Überexpressionsplasmiden liegt das jeweilige *PaSod*-Gen unter der Kontrolle eines

Metallothioneinpromotors, der zu einer konstitutiv stark erhöhten Expression des Gens führt (Averbeck et al., 2001). Ebenso besitzt das Plasmid zur Selektion von putativen Transformanten eine Hygromycin-Resistenzkassette. Die nach einer Transformation Hygromycin-resistenten Transformanten wurden durch eine Southern Blot-Analyse auf die Integration der Überexpressionskassette untersucht.

Bei dem Einbringen von DNA in das *P. anserina*-Genom handelt es sich um eine integrative Transformation. Dies bedeutet, dass ein gewünschter DNA-Abschnitt (bspw. Promoter und Terminator, Leserahmen eines Gens sowie zur Selektion von Transformanten einen geeigneten Selektionsmarker) in das Genom an einer beliebigen Stelle integriert wird. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein essentielles Gen zerstört wird. Es kann daher zu einem Positionseffekt - eventueller negativer Effekt, der nicht hervorgerufen wird durch die Genkopie *per se* - kommen. Um dies auszuschließen, werden mehrere Transformanten mit unterschiedlicher Integrationsposition analysiert. Dabei ist auch wichtig, dass nur solche Transformanten ausgewählt werden, die eine Einzelintegration aufweisen, da es sonst durch Rekombinationen zwischen den Sequenzen zu Umstrukturierungen im Genom kommen kann. Des Weiteren neigen Mehrfachintegrationen während des replikativen Wachstums dazu, verloren zu gehen (Osiewacz et al., 1991).

Aus vorhergegangenen Studien konnten ein Überexpressionsstamm des *PaSod1*-Gens (*PaSod1_OEx1* T11) und zwei Überexpressionsstämme des *PaSod3*-Gens (*PaSod3_OEx2* T71 und *PaSod3_OEx3* T72) identifizieren werden (Schwitalla, 2007). In dieser vorliegenden Doktorarbeit konnten zwei weitere *PaSod1*-Überexpressionsstämme (*PaSod1_OEx2* T57 und *PaSod1_OEx3* T76) sowie vier *PaSod2*-Überexpressionsstämme (*PaSod2_OEx1* T34, *PaSod2_OEx2* T2-6, *PaSod2_OEx3* T2-15 und *PaSod2_OEx4* T2-20) und ein weiterer *PaSod3*-Überexpressionsstamm (*PaSod3_OEx1* T27) mit einer Einzelintegration der jeweiligen Überexpressionskassette durch Southern Blot-Analysen identifiziert werden (siehe Anhang Abb. S1 B, S2 und S3 A).

Um zu überprüfen, ob möglicherweise das Fehlen einer PaSOD durch die zwei verbleibenden PaSODs kompensiert wird, wurden ebenfalls auch Doppeldeletionstämme ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$ und $\Delta PaSod2/3$) sowie eine Tripledeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$), in der alle drei *PaSods* deletiert sind, hergestellt.

Zur Herstellung dieser Mutanten wurden die Sekundärtransformanten der Einzeldeletionstämme ($\Delta PaSod1$, $\Delta PaSod2$ und $\Delta PaSod3$) gegeneinander gekreuzt ($\Delta PaSod1 \times \Delta PaSod2$, $\Delta PaSod1 \times \Delta PaSod3$ und $\Delta PaSod2 \times \Delta PaSod3$). Der $\Delta PaSod1/2/3$ -Deletionsstamm ($\Delta PaSod1/2/3$) resultierte aus einer Kreuzung des $\Delta PaSod2/3$ -Deletionsstammes mit dem $\Delta PaSod1$ -Stamm. Von den jeweiligen Kreuzungen wurden viersporige Asci isoliert und die Phleomycinresistenz des auskeimenden Myzels getestet. Kommt es durch eine Rekombination zu einer Neuverteilung der Genomabschnitte, in denen die *PaSod*-Deletion vorliegt, werden zwei Phleomycin-resistente und zwei Phleomycin-sensitive Sporen erhalten, wobei die zwei resistenten Sporen die Deletion der *PaSods* tragen.

Nach einer erfolgreichen Verifizierung der putativen Deletionsstämme durch Southern Blot-Analysen (siehe Anhang Abb. S4 bis S7) wurden monokaryotische Sporen isoliert und das Myzel für die folgenden Analysen verwendet.

5.3.2 Nachweis der Proteinmengen und SOD-Aktivität der Überexpressions- und Deletionsstämme

Um zu überprüfen, ob die Überexpressionsstämme auch tatsächlich mehr aktives PaSOD-Protein besitzen, da beispielsweise das eingebrachte Gen nicht transkribiert, die Transkripte nicht translatiert werden oder der Co-Faktor eine limitierende Rolle bei der Aktivität des Enzyms spielt, wurde die Proteinmengen und die SOD-Aktivität untersucht. Des Weiteren musste untersucht werden, ob die Überexpression des jeweiligen *PaSod*-Gens stabil ist und nicht in den Sekundärtransformanten verloren geht.

Als Sekundärtransformanten werden die Nachkommen aus einer Kreuzung mit transformierten Stämmen bezeichnet. Hierbei werden die Primärtransformanten, das sind Stämme mit einem undefinierten Alter, die direkt aus einer Transformation gewonnen wurden, mit dem Wildtyp gekreuzt. Diese Primärtransformanten können genetisch heterogen sein, da der transformierte Protoplast mehr als nur ein Kern beinhalten kann. Die Überprüfung der Sekundärtransformanten in Bezug auf eine stabile Überexpression des Gens ist sehr wichtig, da beispielsweise Genaktivierungsmechanismen (u. a. Methylierungen), die einen negativen Einfluss einer Überexpression kompensieren soll, auftreten können.

Ebenfalls soll überprüft werden, ob in den hergestellten Deletionsstämmen tatsächlich kein Protein und keine SOD-Aktivität der jeweiligen deletierten *PaSod* mehr vorhanden ist. Daher wurden Western Blot-Analysen und SOD-Aktivitätsgele mit Proteinextrakten der jeweiligen *PaSod*-Mutantenstämme durchgeführt (Abb. 12).

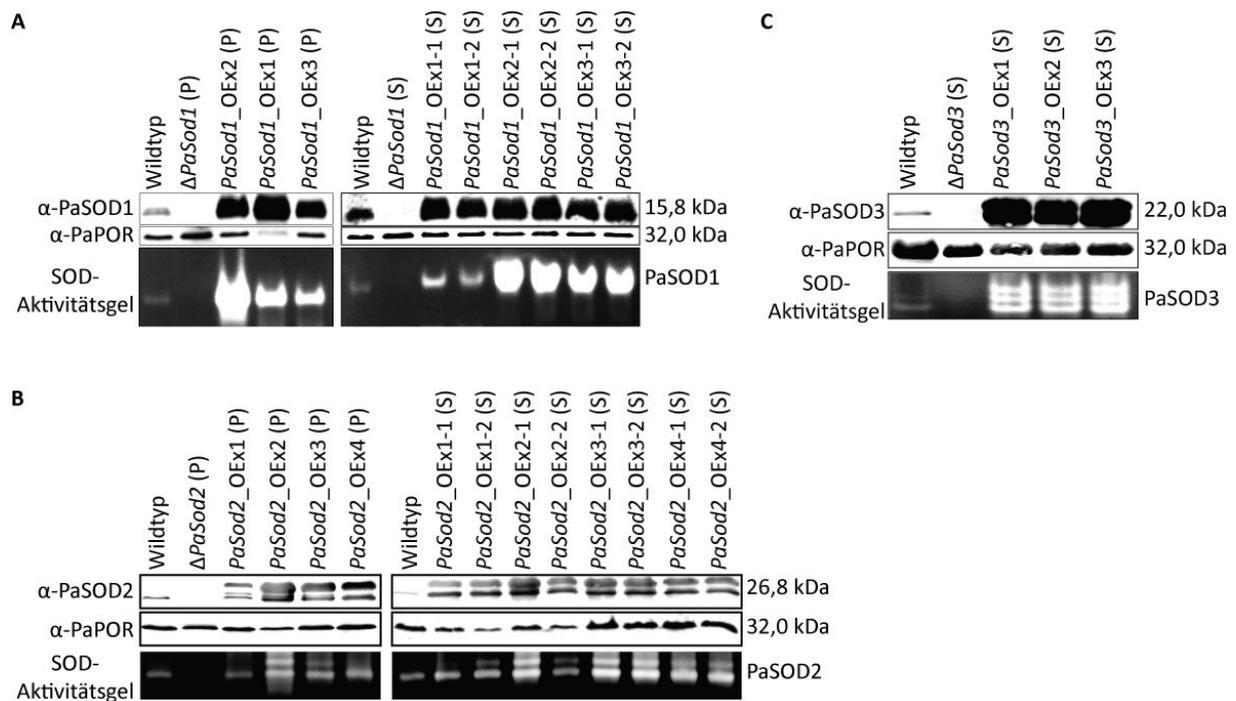


Abb. 12: Nachweis der Proteinmengen und PaSOD-Aktivitäten der *PaSod*-Deletions- und Überexpressionsstämmen. Je 100 µg Gesamtproteinextrakt der *PaSod1*- und *PaSod2*-Mutantenstämmen, bzw. je 75 µg mitochondrialer Proteinextrakt der *PaSod3*-Mutantenstämmen wurden durch Western Blot- und SOD-Aktivitäts-Analysen untersucht. **A** In dem Gesamtproteinextrakt des *PaSod1*-Deletionsstammes lässt sich weder das PaSOD1-Protein nachweisen noch ist eine PaSOD1-Aktivität zu erkennen. Hingegen zeigen die *PaSod1*-Überexpressionstransformanten, sowohl die Primär- als auch die Sekundärtransformanten, eine erhöhte PaSOD1-Proteinmenge und Aktivität im Vergleich zum Wildtyp auf. **B** Die Gesamtproteinprobe des *PaSod2*-Deletionsstammes weist kein Protein und Aktivität der PaSOD2 auf, während die *PaSod2*-Überexpressionsstämmen eine gesteigerte Menge und Aktivität der PaSOD2 in den Primär- und Sekundärtransformanten aufweisen. **C** In den mitochondrialen Proteinextrakten *PaSod3*-Überexpressionsstämmen lässt sich sowohl mehr Protein als auch eine gesteigerte PaSOD3-Aktivität erkennen. Der Deletionsstamm weist weder das PaSOD3-Protein, noch dessen Aktivität auf. Verwendete Antikörper sind auf der linken Seite und die Größen sowie die Aktivitätsbande von PaSOD1 und PaSOD2 sind auf der rechten Seite angegeben. PaPORIN diente als Ladekontrolle. P = Primärtransformanten; S = Sekundärtransformanten.

Durch die Western Blot- und Aktivitäts-Analysen konnte gezeigt werden, dass in den Stämmen, in denen eine *PaSod* deletiert wurde, kein Protein und keine Aktivität der jeweiligen PaSOD nachgewiesen werden konnte (Abb. 12 A bis C). Hingegen zeigen sowohl die Primär- als auch die Sekundärtransformanten der *PaSod*-Überexpressionsstämmen mehr Protein des jeweiligen überexprimierten *PaSod*-Gens. Dies führt auch zu einer Erhöhung der jeweiligen Proteinaktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *PaSod1* und *PaSod2* in den Überexpressionstransformanten stabil ist.

Bei den Untersuchungen der *PaSod3*-Überexpressionsstämmen ist zu bemerken, dass die Fähigkeit zur Überexpression teilweise in den Sekundärtransformanten verloren gegangen ist (Daten nicht gezeigt). Daher musste bei jeder Analyse zuvor überprüft werden, ob die

verwendeten *PaSod3*-Überexpressionsstämme tatsächlich noch eine gesteigerte Aktivität der PaSOD3 besitzen.

Zur Überprüfung der *PaSod3*-Überexpression wurden die Sekundärtransformanten zusätzlich zu ihrer Hygromycinresistenz auf 10 μ M Paraquat-haltigem PASM-Medium getestet, da nur diese, die tatsächlich noch das *PaSod3*-Gen überexprimieren eine erhöhte Paraquat-Sensitivität aufweisen. Stämme, deren *PaSod3*-Überexpression verloren gegangen ist, weisen trotz ihrer Hygromycinresistenz eine Wildtyp-ähnliche Toleranz gegenüber Paraquat auf.

Hinsichtlich der Überexpression der *PaSod1* fiel auf, dass laut Western Blot-Analysen die *PaSod1*-Überexpressionsstämme gleich viel Protein, aber laut Aktivitätsgel eine unterschiedlich stark gesteigerte PaSOD1-Aktivität aufweisen (Abb. 12 A). Möglicherweise könnte es sich hierbei um eine Limitierung der Cofaktoren (Kupfer und Zink) handeln, was dazu führt, dass nicht das komplette Protein in aktiver Form vorliegt.

Ebenfalls wurden auch die generierten *PaSod*-Doppeldelentionsstämme ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$ und $\Delta PaSod2/3$), sowie die Tripelmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) biochemisch auf Proteinebene durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 13).

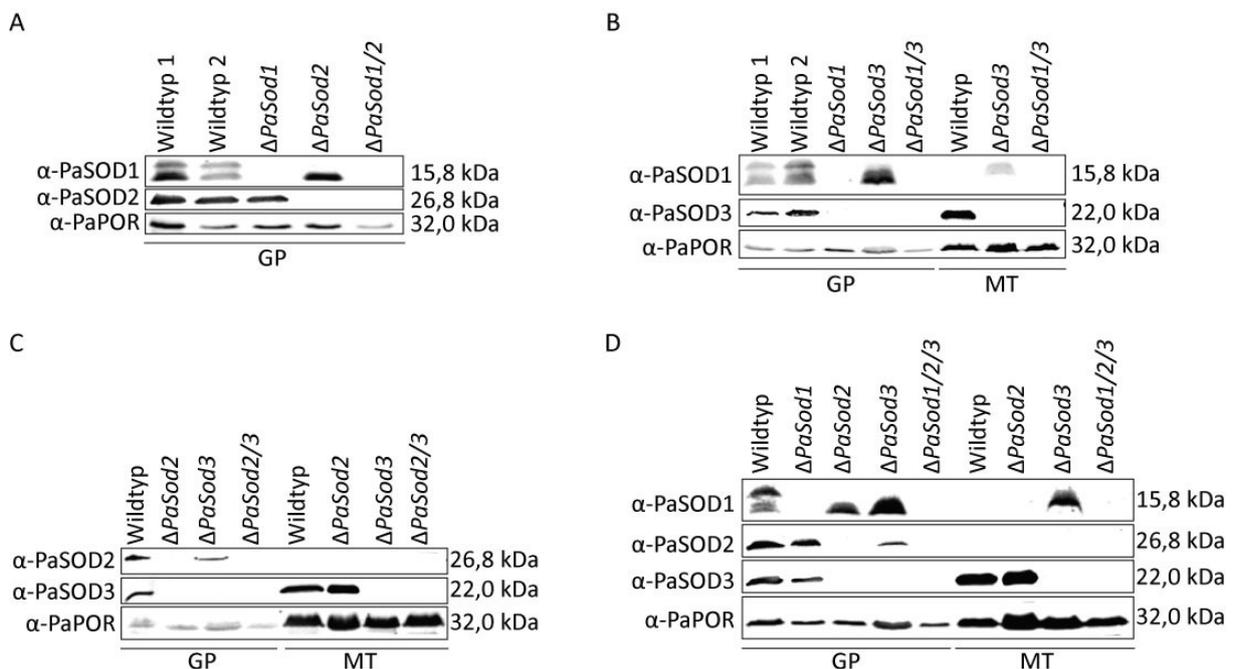


Abb. 13: Identifizierung der Mehrfach-Deletionsstämme ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$) durch Western Blot-Analysen. Je 100 μ g Gesamtproteinextrakt (GP) oder/und 100 μ g mitochondrialer Proteinextrakt (MT) wurden in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Als Ladekontrolle diente PaPORIN. Die verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite, die Größe der jeweiligen detektierten PaSODs ist auf der rechten Seite aufgeführt. **A** Western Blot-Analyse zum Nachweis der $\Delta PaSod1/2$ -Doppeldelentionsmutante, **B** Western Blot-Analyse zum Nachweis der $\Delta PaSod1/3$ -Doppeldelentionsmutante, **C** Western Blot-Analyse zum Nachweis der $\Delta PaSod2/3$ -Doppeldelentionsmutante und **D** Western Blot-Analyse zum Nachweis der $\Delta PaSod1/2/3$ -Tripeldelentionsmutante.

In dem Gesamtproteinextrakt des *PaSod1/2*-Deletionsstammes lassen sich durch Western Blot-Analysen weder PaSOD1 noch PaSOD2 nachweisen (Abb. 13 A). Die Untersuchungen der Deletionsmutante $\Delta PaSod1/3$ weisen in Gesamtproteinextrakten kein PaSOD1-Produkt und in den Mitochondrien keine mitochondriale PaSOD3 auf (Abb. 13 B). Ebenfalls konnte klar die *PaSod2/3*-Deletionsmutante, bei der beide *MnSods* deletiert vorliegen, aufgrund des Fehlens der PaSOD2 im Gesamtproteinextrakt und der PaSOD3 in den Mitochondrien, identifiziert werden (Abb. 13 C). Die Proteinproben des *PaSod1/2/3*-Deletionsstammes zeigen, dass weder in den Extrakten von isolierten Mitochondrien noch in den Gesamtproteinextrakten eine der drei PaSODs nachzuweisen ist (Abb. 13 D).

Interessanterweise lässt sich in den Proteinextrakten isolierter Mitochondrien des $\Delta PaSod3$ -Stammes das PaSOD1-Protein nachweisen (Abb. 13 B und D). Aufgrund zu geringer Mengen an PaSOD1 im Innermembranraum der Mitochondrien des Wildtyps lässt sich dies nicht im Proteinextrakt isolierter Mitochondrien detektieren. Möglicherweise tritt durch den Verlust der mitochondrialen MnSOD (PaSOD3) ein Kompensationsmechanismus in Kraft, wobei es zu einer mitochondrialen Translokation der Cu/ZnSOD (PaSOD1) in dem *PaSod3*-deletierten Stamm ($\Delta PaSod3$) kommt und die Entgiftung des Superoxids im Intermembranraum von der PaSOD1 übernommen wird.

Durch die Verifizierung der verschiedenen Deletions- und Überexpressionsstämme auf Protein- bzw. auch auf Aktivitätsebene konnten die Stämme nun detaillierter analysiert werden.

5.4 Einfluss der PaSODs auf die ROS-Toleranz

Aus der Literatur ist bekannt, dass es beispielsweise durch den Verlust der mitochondrialen MnSOD in Mäusen zu einem gesteigerten mitochondrialen oxidativen Stress kommt (Wenzel et al., 2008). Des Weiteren ist die Rate von DNA-Schäden und Krebsbildung erhöht (Van Remmen et al., 2003). Deletionsstämme der Superoxid-Dismutasen bei *C. elegans* weisen eine erhöhte Paraquat-Sensitivität und mehr oxidativ geschädigte Proteine auf (Doonan et al., 2008; Van Raamsdonk und Hekimi, 2009; Yang et al., 2007). Einen negativen Einfluss besitzt aber auch die Überexpression der *Cu/ZnSod* in Zellkulturen, da diese aufgrund der hohen Superoxid-Abbaurates und dem damit verbundenen Anstieg an H_2O_2 zu oxidativen Stress führt (Amstad et al., 1991 und 1994). Hingegen führt eine gleichzeitige Überexpression der *Cu/ZnSod* und *MnSod* in *S. cerevisiae* zu einer verbesserten Superoxid-Resistenz (Fabrizio et

al., 2004). Um zu überprüfen, ob eine Erhöhung bzw. durch das Fehlen der SOD-Aktivität in *P. anserina* einen Einfluss auf das Resistenzverhalten gegenüber Paraquat, eine intrazellulär Superoxid-generierende Substanz, besitzt, wurden die Wachsraten des Wildtyps und der verschiedenen *PaSod*-modulierten Stämmen auf Paraquat-haltigem PASM-Medium untersucht (Abb. 14).

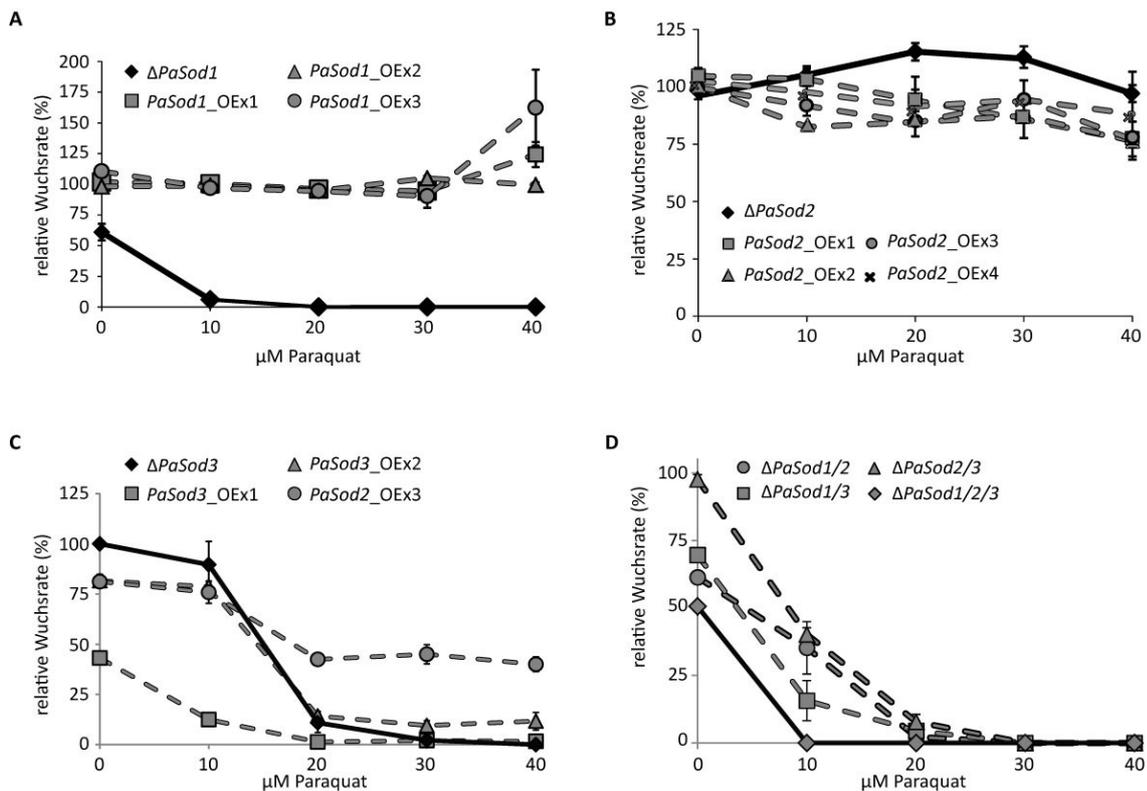


Abb. 14: Analysen der Paraquat-Toleranz der verschiedenen *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämmen. Die Wachsraten des Wildstammes (nicht gezeigt) wurden auf 100 % bei jeder verwendeten Konzentration von Paraquat gesetzt und mit den verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämmen verglichen. Für die Analysen der Paraquat-Toleranz wurden dem PASM-Medium eine Endkonzentration von 0, 10, 20, 30 und 40 µM Paraquat zugesetzt. Die Wachsraten der einzelnen *PaSod*-Mutantenstämmen sowie die Wachsraten des Wildtyps wurden gemessen. Jeweils eingezeichnet ist der Standardfehler. Signifikant unterschiedliche Wachsraten der *PaSod*-Mutantenstämmen im Vergleich zum Wildtyp wurden mit dem Mann-Whitney U Test ermittelt. **A** Die Wachsraten des *PaSod1*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod1$) ist signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 bis 40 µM Paraquat ($p \leq 0.001$). Die Wachsraten der Überexpressionsstämmen sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 µM Paraquat (*PaSod1_OEx3*: $p \leq 0.05$). $\Delta PaSod1$: $n = 9$; *PaSod1_OEx1*: $n = 12$; *PaSod1_OEx2*: $n = 18$; *PaSod1_OEx3*: $n = 12$. **B** Die Wachsraten der *PaSod2*-Mutantenstämmen sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 10 µM (*PaSod2_OEx2*: $p \leq 0.001$; *PaSod2_OEx3*: $p \leq 0.01$), 20 µM ($\Delta PaSod2$: $p \leq 0.01$; *PaSod2_OEx2* und 3: $p \leq 0.001$), 30 µM (*PaSod2_OEx2*: $p \leq 0.01$) und 40 µM Paraquat (*PaSod2_OEx2* und 3: $p \leq 0.001$). $\Delta PaSod2$: $n = 14$; *PaSod2_OEx1*: $n = 12$ und *PaSod2_OEx2-4*: $n = 14$. **C** Die Wachsraten der *PaSod3*-Mutantenstämmen sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0, 10 und 20 µM (*PaSod3_OEx1-3*: $p \leq 0.001$), 30 und 40 µM Paraquat ($\Delta PaSod3$: $p \leq 0.01$; *PaSod3_OEx1-3*: $p \leq 0.001$). $\Delta PaSod3$: $n = 5$; *PaSod3_OEx1-3*: je $n = 10$. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010). **D** Die Wachsraten der Doppeldeletionsstämmen sowie der Tripeldeletionsmutante sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 µM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$), 10 µM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$), 20 µM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$) und 30 und 40 µM Paraquat ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$). $\Delta PaSod1/2$: $n = 16$; $\Delta PaSod1/3$: $n = 16$; $\Delta PaSod2/3$: $n = 20$; $\Delta PaSod1/2/3$: $n = 20$.

Eine verminderte Wachstumsrate und somit eine Sensitivität gegenüber Paraquat, ist in den Deletionsstämmen der *PaSod1* ($\Delta PaSod1$) und *PaSod3* ($\Delta PaSod3$) zu erkennen (Abb. 14 A und C). Diese Sensitivität kann durch eine verminderte Abbaurate des durch Paraquat-generierten Superoxids erklärt werden. Die nicht vorhandene Paraquat-Sensitivität des *PaSod2*-Deletionsstammes kann damit begründet sein, dass PaSOD2 möglicherweise sekretiert wird und extrazelluläres Superoxid statt intrazelluläres Paraquat-generiertes Superoxid abbaut. Entgegengesetzt der Erwartungen führt eine erhöhte Menge PaSOD in den Überexpressionsstämmen nicht zu einer verbesserten ROS-Abwehr und somit zu einer verbesserten Wachstumsrate auf Paraquat (Abb. 14 A bis C). Die *PaSod3*-Überexpressionsstämme weisen sogar bereits ohne Zugabe von Paraquat eine geminderte Wachstumsrate auf, die durch die Zugabe von Paraquat noch gesteigert wird (Abb. 14 C). Eine ebenfalls verminderte Wachstumsrate auf Medium ohne Stressor lässt sich auch bei dem *PaSod1*-Deletionsstamm ($\Delta PaSod1$) sowie bei den Mehrfachdeletionsstämmen ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$), in denen das *PaSod1*-Gen deletiert vorliegt, erkennen (Abb. 14 A und D). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Doppeldeletionsstämme ähnlich zu den Einzeldelusionsstämmen eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Paraquat aufweisen (Abb. 14 D). Vielmehr noch weist die Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) eine hochgradige Intoleranz gegenüber Paraquat auf. Dabei kommt es schon bei geringen Paraquat-Mengen (2,5 μ M Paraquat im PASM-Medium) zu einem Erliegen des Wachstums (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die Deletionsstämme eine spezifische Sensitivität für Superoxid-vermittelten oxidativen Stress aufweisen, der im Einklang mit der Funktion von SODs bei der Entgiftung von Superoxid steht.

Des Weiteren sollte auch überprüft werden, ob die Modulation der *PaSods* zu einer veränderten Toleranz gegenüber Wasserstoffperoxid aufweisen. Hierzu wurden die Wachstumsraten des Wildtyp mit den Wachstumsraten der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämmen auf unterschiedlich konzentrierten H₂O₂-haltigem PASM-Medium analysiert (Abb. 15).

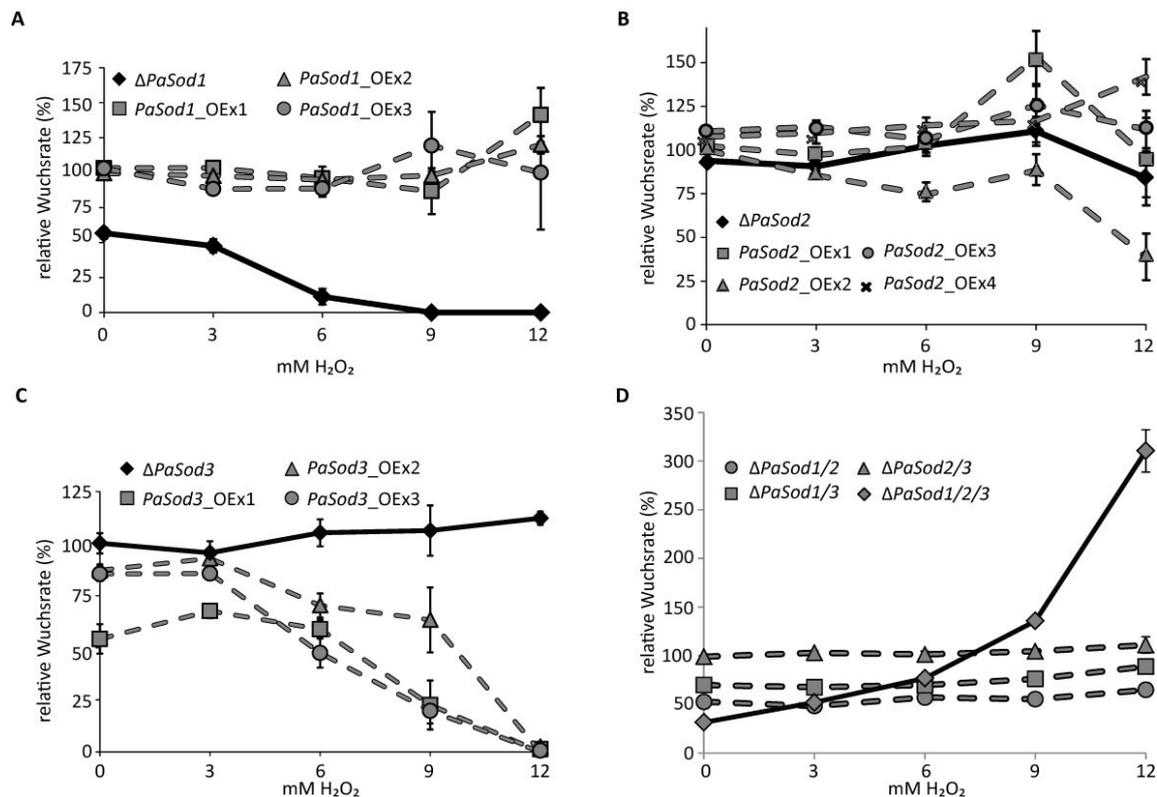


Abb. 15: Analysen der Wasserstoffperoxid-Toleranz der verschiedenen *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämme. Die Wachsraten des Wildstammes (nicht gezeigt) wurden auf 100 % bei jeder verwendeten Konzentration von H₂O₂ gesetzt und mit den verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämmen verglichen. Zur Ermittlung der H₂O₂-Toleranz wurden dem PASM-Medium eine Endkonzentration von 0, 3, 6, 9 und 12 mM H₂O₂ zugegeben. Die Wachsraten der einzelnen *PaSod*-Mutantenstämmen sowie die Wachsraten des Wildtyps wurden gemessen. Jeweils eingezeichnet ist der Standardfehler. Signifikant unterschiedliche Wachsraten der *PaSod*-Mutantenstämmen im Vergleich zum Wildtyp wurden mit dem Mann-Whitney U Test ermittelt. **A** Die Wachsraten des *PaSod1*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod1$) ist signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 bis 12 mM H₂O₂ ($p \leq 0.001$). Die Wachsraten der Überexpressionsstämme sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 3 mM H₂O₂ (*PaSod1_OEx3*: $p \leq 0.001$) und bei 12 mM H₂O₂ (*PaSod1_OEx2*: $p \leq 0.05$). $\Delta PaSod1$: n = 9; *PaSod1_OEx1*: n = 12; *PaSod1_OEx2*: n = 18; *PaSod1_OEx3*: n = 12. **B** Die Wachsraten der *PaSod2*-Mutantenstämmen sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 mM ($\Delta PaSod2$: $p \leq 0.01$; *PaSod2_OEx3*: $p \leq 0.001$; *PaSod2_OEx4*: $p \leq 0.01$), 3 mM ($\Delta PaSod2$: $p \leq 0.05$; *PaSod2_OEx2* und 3: $p \leq 0.01$), 6 mM (*PaSod2_OEx2*: $p \leq 0.01$; *PaSod2_OEx4*: $p \leq 0.05$), 9 mM (*PaSod2_OEx3*: $p \leq 0.05$) und 12 mM H₂O₂ (*PaSod2_OEx2*: $p \leq 0.001$; *PaSod2_OEx4*: $p \leq 0.05$). $\Delta PaSod2$: n = 14; *PaSod2_OEx1*: n = 12 und *PaSod2_OEx2-4*: je n = 14. **C** Die Wachsraten der *PaSod3*-Mutantenstämmen sind signifikant unterschiedlich zu der Wachsraten des Wildtyps bei 0 mM (*PaSod3_OEx1-3*: $p \leq 0.001$), 3 mM (*PaSod3_OEx1*: $p \leq 0.001$; *PaSod3_OEx3*: $p \leq 0.001$), 6 mM (*PaSod3_OEx1-3*: $p \leq 0.001$), 9 mM (*PaSod3_OEx1*: $p \leq 0.001$; *PaSod3_OEx3*: $p \leq 0.001$) und 12 mM H₂O₂ (*PaSod3_OEx1*: $p \leq 0.001$; *PaSod3_OEx2-3*: $p \leq 0.01$). $\Delta PaSod3$: n = 5; *PaSod3_OEx1-3*: je n = 10. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010). **D** Die Wachsraten der Doppeldeletionsstämme sowie der Tripeldelentionsmutante sind signifikant unterschiedlich zu den Wachsraten des Wildtyps bei 0 mM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$), 3 mM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$), 6 mM ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$), 9 mM ($\Delta PaSod1/2$ und $\Delta PaSod1/3$: $p \leq 0.001$) und 12 mM H₂O₂ ($\Delta PaSod1/3$: $p \leq 0.01$; $\Delta PaSod1$, $\Delta PaSod1/2$ und $\Delta PaSod1/2/3$: $p \leq 0.001$). $\Delta PaSod1/2$: n = 16; $\Delta PaSod1/3$: n = 16; $\Delta PaSod2/3$: n = 20; $\Delta PaSod1/2/3$: n = 20.

Die Analysen der Wachsraten auf H₂O₂-haltigem Medium zeigen, dass sowohl der *PaSod1*-Deletionsstamm ($\Delta PaSod1$) als auch die *PaSod3*-Überexpressionsstämme (*PaSod3_OEx1-3*)

zusätzlich zur Sensitivität gegenüber Paraquat eine erhöhte Sensitivität gegenüber Wasserstoffperoxid aufweisen (Abb. 15 A und C). Dagegen zeigen die Überexpressionsstämme der *PaSod1* und *PaSod2* (*PaSod1_OEx1-3* und *PaSod2_OEx1-4*), sowie der *PaSod2*- und *PaSod3*-Deletionstamm ($\Delta PaSod2$ und $\Delta PaSod3$) keine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Wachsrates auf H_2O_2 -haltigem Medium auf (Abb. 15 A bis C). Auch weisen die Mehrfachdeletionsmutanten ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$), in denen *PaSod1* deletiert wurde, keine Sensitivität gegenüber H_2O_2 auf wie der *PaSod1*-Deletionstamm (Abb. 15 C). Das überraschendste Ergebnis zeigt der *PaSod1/2/3*-Deletionstamm: Mit steigender H_2O_2 -Konzentration weist dieser Stamm eine stetig bessere Wachsrates im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 15 D). Dies deutet darauf hin, dass die Gesamtaktivität der PaSODs zu einer Grundbelastung an H_2O_2 führt, die in der Tripeldeletionsmutante fehlt, und ihr daher ein Wachstum auf höheren H_2O_2 -Konzentrationen ermöglicht.

Nachweis der H_2O_2 -Freisetzung bei der *PaSod1/2/3*-Tripeldeletionsmutante

Um zu überprüfen, ob tatsächlich weniger H_2O_2 in diesem Tripeldeletionsstamm generiert und somit auch freigesetzt wird, wurde die H_2O_2 -Freisetzung des *PaSod1/2/3*-Stammes im Vergleich zum Wildtyp analysiert. Dabei wurden kleine Myzelstücke von Platten mit PASM (ohne und mit 0,625, 1,25, 1,875 und 2,5 μM Paraquat) 3 Stunden mit einer DAB-Lösung bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Absorption der DAB-Lösung bei 471 nm bestimmt. Um die Werte auf das Myzelgewicht und auf die H_2O_2 -Menge beziehen zu können, wurde eine Eichgerade mit verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen erstellt und das Trockengewicht der gemessenen Myzelmasse bestimmt. Die Parameter (H_2O_2 -Konzentration (nmol) und Myzelmenge (mg)) wurden miteinander verrechnet und statistisch ausgewertet (Abb. 16).

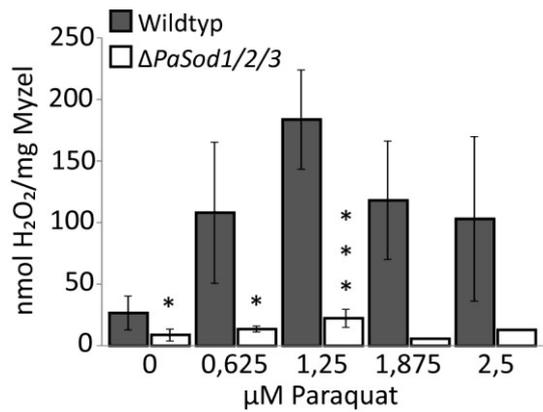


Abb. 16: Nachweis der H₂O₂-Freisetzung bei der *PaSod*-Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) im Vergleich zum Wildtyp. Die Mengen der H₂O₂-Freisetzung (nmol/mg Myzel) des Wildtyps und der *PaSod1/2/3*-Deletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) wurden gemessen und statistisch ausgewertet für 0 μM (Wildtyp: 26,59 nmol/mg, n= 3 und $\Delta PaSod1/2/3$: 8,72 nmol/mg, n= 3), 0,625 μM (Wildtyp: 108,04 nmol/mg, n= 3 und $\Delta PaSod1/2/3$: 13,52 nmol/mg, n=4), 1,25 μM (Wildtyp: 183,64 nmol/mg, n= 2 und $\Delta PaSod1/2/3$: 22,23 nmol/mg, n= 4), 1,875 μM (Wildtyp: 118,12 nmol/mg, n= 4 und $\Delta PaSod1/2/3$: 5,74 nmol/mg, n= 1) und 2,5 μM Paraquat im PASM-Medium (Wildtyp: 102,98 nmol/mg,

n= 4 und $\Delta PaSod1/2/3$: 12,81 nmol/mg, n= 1). Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Student's T-Test (<http://studentsttest.com>) ermittelt und sind mit * gekennzeichnet (* p≤0.05 und *** p≤0.001). Jeweils eingezeichnet ist der Standardfehler.

Bereits ohne Zugabe von Paraquat besitzt die *PaSod*-Triplemutante eine signifikant geringere H₂O₂-Freisetzung (um Faktor 3) im Vergleich zum Wildtyp. Durch die Zugabe von Paraquat steigt die H₂O₂-Freisetzung sowohl beim Wildtyp als auch bei der *PaSod*-Triplemutante ($\Delta PaSod1/2/3$). Im Vergleich zum Wildtyp werden jedoch viel geringere Mengen (um Faktor 8 bis 20) an H₂O₂ von der Tripeldeletionsmutante freigesetzt. Diese geringere H₂O₂-Freisetzung, aufgrund eines niedrigeren H₂O₂-Levels in der Zelle, könnte die gesteigerte H₂O₂-Resistenz der *PaSod1/2/3*-Deletionsmutante erklären.

5.5 Einfluss auf Proteinschäden

Die Analysen zu den Resistenzen gegenüber oxidativen Stress haben gezeigt, dass es durch den Verlust der PaSODs zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Paraquat aufgrund einer verminderten Abbaurrate des generierten Superoxids kommt. Um zu überprüfen, ob eine verminderte Abbaurrate in den Deletionsstämmen oder eine gesteigerte PaSOD-Aktivität in den Überexpressionsstämmen dazu führt, dass mehr bzw. weniger Proteine durch ROS geschädigt werden, wurde die Mengen oxidiertes bzw. carbonylierter Proteine der verschiedenen *PaSod*-Deletions- und Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Hierzu wurden „OxyBlot“-Analysen mit Gesamtproteinextrakten von mittelalten Stämmen durchgeführt (siehe Anhang Abb. S8 bis S11).

Bei der „OxyBlot“-Analyse handelt es sich um eine durchgeführte Western Blot-Analyse zur Quantifizierung von carbonylierten Proteinen. Die carbonylierte Gruppe eines oxidierten Proteins reagiert bei der Behandlung (Derivatisierung) mit einem Reagenz (2,4-Dinitrophenylhydrazin) zu 2,4-Dinitrophenylhydrazon, welches durch einem spezifischen Antikörper (Anti-DNP) nachgewiesen werden kann.

Die Menge an carbonylierten Proteinen wurden durch die Odyssey-Scannersoftware von LICOR® densitometrisch unter Berücksichtigung der Ladekontrolle (Coomassie-gefärbtes Gel oder PaPORIN) ermittelt und graphisch dargestellt (Abb. 17).

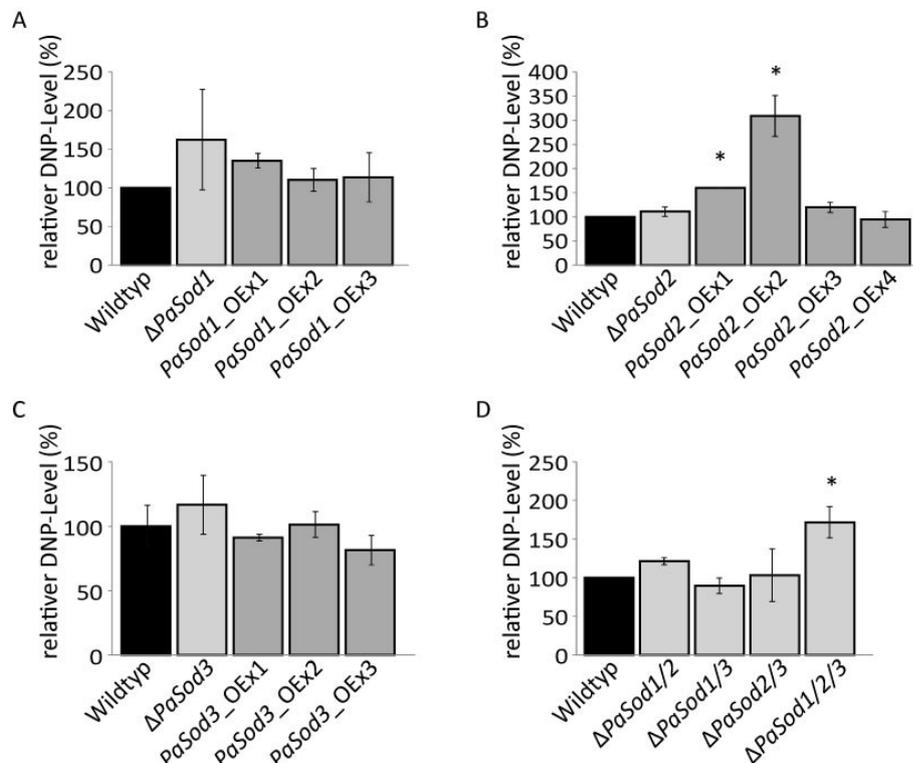


Abb. 17: Analysen zum Nachweis von oxidativ-geschädigter Proteinen der *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämmen. Graphische Darstellung der relativen DNP-Level, die mittels Oxyblot-Analysen ermittelt und statistisch ausgewertet wurden. Die relativen DNP-Level für den Wildtyp wurden auf 100 % gesetzt und mit denen der *PaSod*-Mutantenstämmen verglichen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student's T-Test (<http://studentstttest.com>) ermittelt und sind mit * gekennzeichnet ($p \leq 0.05$). Jeweils angegeben ist der Standardfehler. **A** Vergleich der relativen DNP-Level des Wildtyps (100 %) mit denen der *PaSod1*-Deletionsmutante ($\Delta PaSod1$: 162,56 %; $n = 3$) und der drei unabhängigen *PaSod1*-Überexpressionsstämmen ($PaSod1_OEx1$: 135,16 %, $PaSod1_OEx2$: 110,46 %, $PaSod1_OEx3$: 113,06 %; je $n = 2$). **B** Vergleich der relativen DNP-Level des Wildtyps (100 %) mit denen der *PaSod2*-Deletionsmutante ($\Delta PaSod2$: 111 %; $n = 3$) und der vier unabhängigen *PaSod2*-Überexpressionsstämmen ($PaSod2_OEx1$: 160,2 %, $PaSod2_OEx2$: 308,85 %, $PaSod2_OEx3$: 119,92 %, $PaSod2_OEx4$: 94,7 %; je $n = 2$). **C** Vergleich der relativen DNP-Level des Wildtyps (100 %) mit denen der *PaSod3*-Deletionsmutante ($\Delta PaSod3$: 116,62 %; $n = 2$) und der drei unabhängigen *PaSod3*-Überexpressionsstämme ($PaSod3_OEx1$: 91,23 %, $PaSod3_OEx2$: 101,35 % und $PaSod3_OEx3$: 81,45 %; je $n = 2$). **D** Vergleich der relativen DNP-Level des Wildtyps (100 %) mit denen der Mehrfachdeletionsstämme ($\Delta PaSod1/2$: 121,52 %, $n = 3$; $\Delta PaSod1/3$: 89,68 %, $n = 3$; $\Delta PaSod2/3$: 103,15 %, $n = 3$ und $\Delta PaSod1/2/3$: 171,71 %, $n = 4$).

Die Analysen der carbonylierten Proteinmengen (DNP-Level) ließen zwar sowohl für die Gesamtproteinextrakte der *PaSod1*-modulierten Stämme ($\Delta PaSod1$ und $PaSod1_OEx1-3$) als auch für die Gesamtproteinextrakte des *PaSod2*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod2$) eine gesteigerte Menge an oxidativ-geschädigten Proteinen erkennen, jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant unterschiedlich zum Wildtyp (Abb. 17 A und B). Ein starker

Anstieg des DNP-Levels (+ 60 % und + 208 %) kann in den Proteinextrakten von zwei der vier getesteten *PaSod2*-Überexpressionsstämme (*PaSod2_OEx1* und 2) nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Obwohl die Überexpression der *PaSod3* zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber oxidativen Stress führt und eine erhöhte Menge an carbonylierten Proteinen zu erwarten wäre, sind in den Gesamtproteinextrakten dieser Stämme im Vergleich zum Wildtyp keine gesteigerten Mengen an carbonylierten Proteinen zu detektieren. Der DNP-Level liegt sogar tendenziell um 9 bis 19 % niedriger als beim Wildtyp (Abb. 17 C). Gegensätzlich werden in den Gesamtproteinproben des *PaSod3*-Deletionsstammes mehr oxidativ-geschädigte Proteine (+ 16,6 %) nachgewiesen, jedoch lässt sich ein signifikanter Unterschied zum Wildtyp nicht ermitteln (Abb. 17 C).

Obwohl in den analysierten Gesamtproteinextrakten der *PaSod1/2*-Deletionsmutante mehr (+ 21 %) und in der *PaSod1/3*-Deletionsmutante weniger (- 10 %) Proteine oxidativ-geschädigt vorliegen, ist dieser Unterschied nicht signifikant zum Wildtyp (Abb. 17 D). In den Gesamtproteinextrakten der Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) konnten erhöhte Mengen an oxidativ-geschädigten Proteinen ermittelt werden, deren Menge um 72 % signifikant gesteigert sind (Abb. 17 D).

Entgegen der Erwartungen führt eine Deletion einer oder zweier *PaSods* zu keinem signifikanten Anstieg von oxidativ-geschädigten Proteinen. Mit Ausnahme der Tripeldeletionsmutante kann ein Zusammenhang zwischen einer Sensitivität gegenüber oxidativen Stress und einer gesteigerten Menge an oxidativ-geschädigten Proteinen ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *PaSods* und die damit gesteigerte Abbaurate des Superoxids nicht zu einer geringeren Menge an carbonylierten Proteinen führt.

5.6 Einfluss auf die Lebensspanne

Zur Beurteilung, welche Rolle nun die drei PaSODs im Alterungsprozess von *P. anserina* spielen, wurde die Lebensspanne des Wildtyps und der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme untersucht. Zur Analyse der Lebensspanne wurde Myzel von frisch isolierten, zwei Tage alten Sekundärtransformanten in mit 50 mL PASM gefüllte Rennrohre überführt. Alle zwei bis drei Tage wurde die Wuchsfront markiert bis das Myzel das

senescente Stadium, der Zeitpunkt an dem die Hyphen ihr lineares Wachstum einstellen, erreicht hatte. Die mittlere Lebensspanne des Wildtyps diente als Referenzwert und wurde auf 100 % gesetzt. Die erzielten Daten der Lebensspannenanalyse wurden graphisch dargestellt und statistisch ausgewertet (Abb. 18).

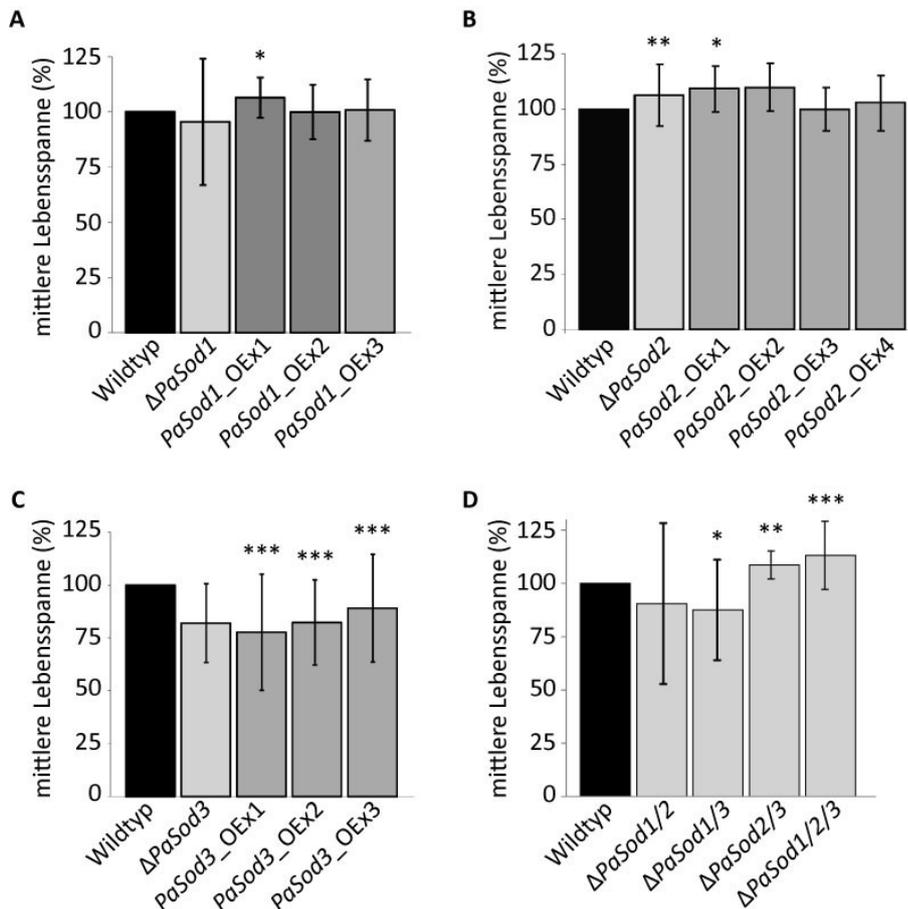


Abb. 18: Untersuchungen der mittleren Lebensspanne der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämmen. Die mittlere Lebensspanne vom Wildtyp wurde auf 100 % gesetzt und diente als Bezugswert für die Lebensspannen der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämmen. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Mann-Whitney U Test ermittelt und mit * gekennzeichnet (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$). Jeweils eingezeichnet ist die Standardabweichung. **A** Lebensspannenanalyse des *PaSod1*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod1$: 95,43 %, $n = 46$) und der drei *PaSod1*-Überexpressionsstämmen ($PaSod1_OEx1$: 106,36 %, $n = 24$; $PaSod1_OEx2$: 99,88 %, $n = 27$ und $PaSod1_OEx3$: 100,77 %, $n = 28$). **B** Lebensspannenanalyse des *PaSod2*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod2$: 106,26 %, $n = 23$) und der vier *PaSod2*-Überexpressionsstämmen ($PaSod2_OEx1$: 109,1 %, $n = 17$; $PaSod2_OEx2$: 109,77 %, $n = 22$; $PaSod2_OEx3$: 99,92 %, $n = 21$ und $PaSod2_OEx4$: 102,76 %, $n = 17$). **C** Lebensspannenanalyse des *PaSod3*-Deletionsstammes ($\Delta PaSod3$: 82 %, $n = 20$) und der drei *PaSod3*-Überexpressionsstämmen ($PaSod3_OEx1$: 77,68 %, $n = 27$; $PaSod3_OEx2$: 82,3 %, $n = 30$ und $PaSod3_OEx3$: 89,08 %, $n = 34$). **D** Lebensspannenanalyse der *PaSod*-Mehrfachdeletionsstämmen ($\Delta PaSod1/2$: 90,52 %, $n = 49$; $\Delta PaSod1/3$: 87,56 %, $n = 58$; $\Delta PaSod2/3$: 108,66 %, $n = 35$ und $\Delta PaSod1/2/3$: 113,14 %, $n = 44$).

Aus den Untersuchungen der Lebensspannenanalysen geht hervor, dass die Deletion einer *PaSod* ($\Delta PaSod1-3$) unter den analysierten Anzuchtsbedingungen keinen negativen Einfluss ausübt (Abb. 18 A bis C). Vielmehr zeigt der *PaSod2*-Deletionsstamm eine leichte

Lebensverlängerung im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18 B). Des Weiteren ist eine Verlängerung der Lebensspanne bei jeweils einem Überexpressionstransformant der *PaSod1* und *PaSod2* (*PaSod1_OEx1* und *PaSod2_OEx1*) zu vermerken (Abb. 18 A und B). Diese geringen Effekte auf die Lebensspanne deuten darauf hin, dass die Manipulation der PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität einen untergeordneten Einfluss auf die Lebensspanne bei *P. anserina* hat. Unerwartet führt die Überexpression der mitochondrialen PaSOD nicht zu einer erhöhten Lebensspanne. Im Gegenteil, die Lebensspanne ist im Vergleich zum Wildtyp um etwa 11 bis 22 % signifikant verkürzt (Abb. 18 C). Die Untersuchungen der Lebensspanne der Mehrfach-Deletionsstämme zeigen, dass durch die gleichzeitige Deletion der *PaSod1* und *PaSod3* es zu einer leicht signifikanten Lebensverkürzung um etwa 12 % kommt (Abb. 18 D). Dies scheint doppelt reguliert zu sein, da sich die reduzierten Lebensspannen der Einzel-Deletionsstämme ($\Delta PaSod1$: - 5 % und $\Delta PaSod3$: - 8 %) aufsummieren. Hingegen zeigen die Untersuchungen der Deletionsmutante, in der beide *MnSod* ($\Delta PaSod2/3$) oder alle drei *PaSods* ($\Delta PaSod1/2/3$) deletiert vorliegen, eine im Vergleich zum Wildtyp um 8 bis 12 % signifikant verlängerte Lebensspanne (Abb. 18 D). Die Analysen der Lebensspanne der *PaSod*-modulierten Stämme zeigen, dass eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Paraquat der Deletionsstämme oder gesteigerte Mengen an oxidativ-geschädigten Proteinen nicht unweigerlich zu einer Minderung der Lebensspanne führen.

5.7 Einfluss der *PaSod*-Modulation auf andere Komponenten des ROS-Abbausystems

Die aus den bisherigen Analysen erhaltenen Ergebnisse wie ROS-Resistenzen, Menge der carbonylierten Proteine sowie die Lebensspanne korrelieren nicht direkt mit der jeweiligen SOD-Manipulation. Ein hervorstechendes Beispiel ist die ROS-Sensitivität und Kurzlebigkeit der *PaSod3*-Überexpressionsstämme. Um diese Folgen besser einordnen und erklären zu können, muss eventuell auch berücksichtigt werden, dass die Manipulation eines grundlegenden Abbauweges für ROS in der Zelle zu Veränderungen anderer Komponenten des ROS-Abbausystems führen kann. Tatsächlich wurde dazu eine Reihe von Beobachtungen gemacht, die im Folgenden dargelegt werden.

Co-Regulation der PaSODs

Während der Analysen zur Bestimmung der Protein- und Aktivitätsmengen der verschiedenen *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämme (Abb. 12) fiel auf, dass durch die Überexpression einer bestimmten *PaSods* die Aktivität der anderen PaSODs beeinflusst wird (Abb. 19).

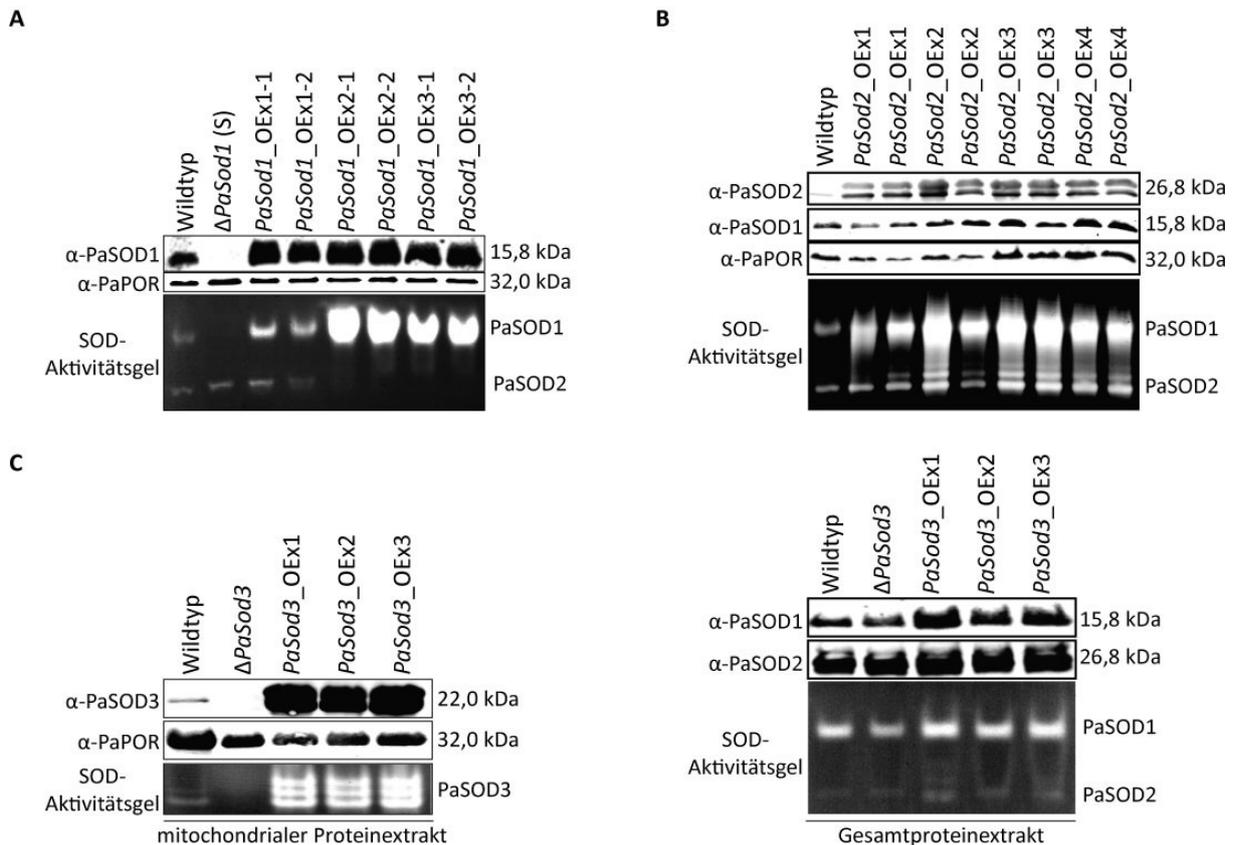


Abb. 19: Co-Regulation der PaSODs. Je 100 μ g Gesamtproteinextrakt von Sekundärtransformanten der *PaSod1*- und *PaSod2*-Mutantenstämme, bzw. je 75 μ g mitochondrialer Proteinextrakt und je 100 μ g Gesamtproteinextrakt der *PaSod3*-Mutantenstämme wurden durch Western Blot- und SOD-Aktivitäts-Analysen untersucht. **A** Western Blot- und Aktivitätsanalysen der *PaSod1*-modulierten Stämme. In den Gesamtproteinextrakten der *PaSod1*-Überexpressionsstämmen (*PaSod1_OEx1-3*) ist festzustellen, dass die PaSOD2-Aktivität verringert bzw. nicht mehr zu erkennen ist bei gesteigerter PaSOD1-Aktivität. **B** Western Blot- und Aktivitätsanalysen der *PaSod2*-modulierten Stämme. Durch die Überexpression der *PaSod2* in den Überexpressionsstämmen (*PaSod2_OEx1-4*) wird die Aktivität der PaSOD1 zusätzlich zur PaSOD2-Aktivität gesteigert. **C** Western Blot- und Aktivitätsanalysen der *PaSod3*-modulierten Stämme. Parallel zu den gesteigerten Proteinmengen und Aktivität der PaSOD3 in den mitochondrialen Proteinextrakten der *PaSod3*-Überexpressionstransformanten (*PaSod3_OEx1-3*) sind die Proteinmengen und Aktivität von PaSOD1 und PaSOD2 in den Gesamtproteinextrakten leicht erhöht. Verwendete Antikörper sind auf der linken Seite und die Größen sowie die Aktivitätsbande von PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3 sind auf der rechten Seite angegeben. PaPORIN diene als Ladekontrolle.

In den Gesamtproteinextrakten der drei unabhängigen *PaSod1*-Überexpressionsstämme (*PaSod1_OEx1-3*) ist zu erkennen, dass in den Stämmen mit erhöhter PaSOD1-Aktivität die Aktivität der PaSOD2 vermindert ist, bzw. in den Überexpressionsstämmen *PaSod1_OEx2*

und *PaSod1_OEx3* nicht mehr zu erkennen ist (Abb. 19 A). Anders verhält sich diese Co-Regulation in den *PaSod2*-Überexpressionsstämmen. Hier ist in den Gesamtproteinextrakten der *PaSod2*-Überexpressionsstämmen (*PaSod2_OEx1-4*) zusätzlich zu der gesteigerten PaSOD2-Menge und Aktivität die PaSOD1-Aktivität erhöht. Diese Steigerung der PaSOD1-Aktivität beruht interessanterweise nicht auf einer gesteigerten PaSOD1-Proteinmenge (Abb. 19 B). Ebenfalls kommt es zu einer Co-Regulation der PaSODs in den *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen (*PaSod3_OEx1-3*). Parallel zu den gesteigerten Proteinmengen und Aktivität der PaSOD3 in den mitochondrialen Proteinextrakten der *PaSod3*-Überexpressionstransformanten ist die Proteinmenge von PaSOD1 und PaSOD2 sowie deren Aktivität in den Gesamtproteinextrakten leicht erhöht (Abb. 19 C). Unklar ist, wodurch es zu dieser Co-Regulation der *PaSod*-überexprimierenden kommt. Durch diese Befunde stellt sich des Weiteren die Frage, ob sich nicht nur die PaSODs untereinander beeinflussen, sondern möglicherweise auch andere Komponenten der ROS-Abwehr beeinflusst werden.

Einfluss auf die Katalase B-Aktivität

Eine weitere Komponente der ROS-Abwehr sind die Katalasen. Diese Enzyme katalysieren den Abbau von Wasserstoffperoxid in molekularem Sauerstoff und Wasser. *P. anserina* besitzt fünf putative Katalasen mit unterschiedlichen vorhergesagten Lokalisationen. Eine dieser Katalasen, Katalase B (PaCATB), wurde in der Vergangenheit detaillierter auf ihren Einfluss auf den Alterungsprozess in *P. anserina* untersucht. Es handelt sich bei PaCATB um eine sekretierte Katalase, deren Transkriptmenge und Aktivität durch Zugabe von H₂O₂ gesteigert wird (Kimpel, 1999; Zintel et al., 2011). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass es im Alter zu einer Abnahme der PaCATB-Aktivität kommt (Bernhardt, 2010).

Um zu überprüfen, ob die Modulation der *PaSods* eine Auswirkung auf die Katalase B besitzt, oder ob möglicherweise die Sensitivität einiger *PaSod*-modulierter Stämme gegenüber Wasserstoffperoxid mit einer verminderten Katalase B-Aktivität in Verbindung gebracht werden kann, wurden Katalase B-Aktivitätsanalysen mit den Gesamtproteinextrakten der verschiedenen mittelalten *PaSod*-Mutantenstämme durchgeführt (Abb. 20).

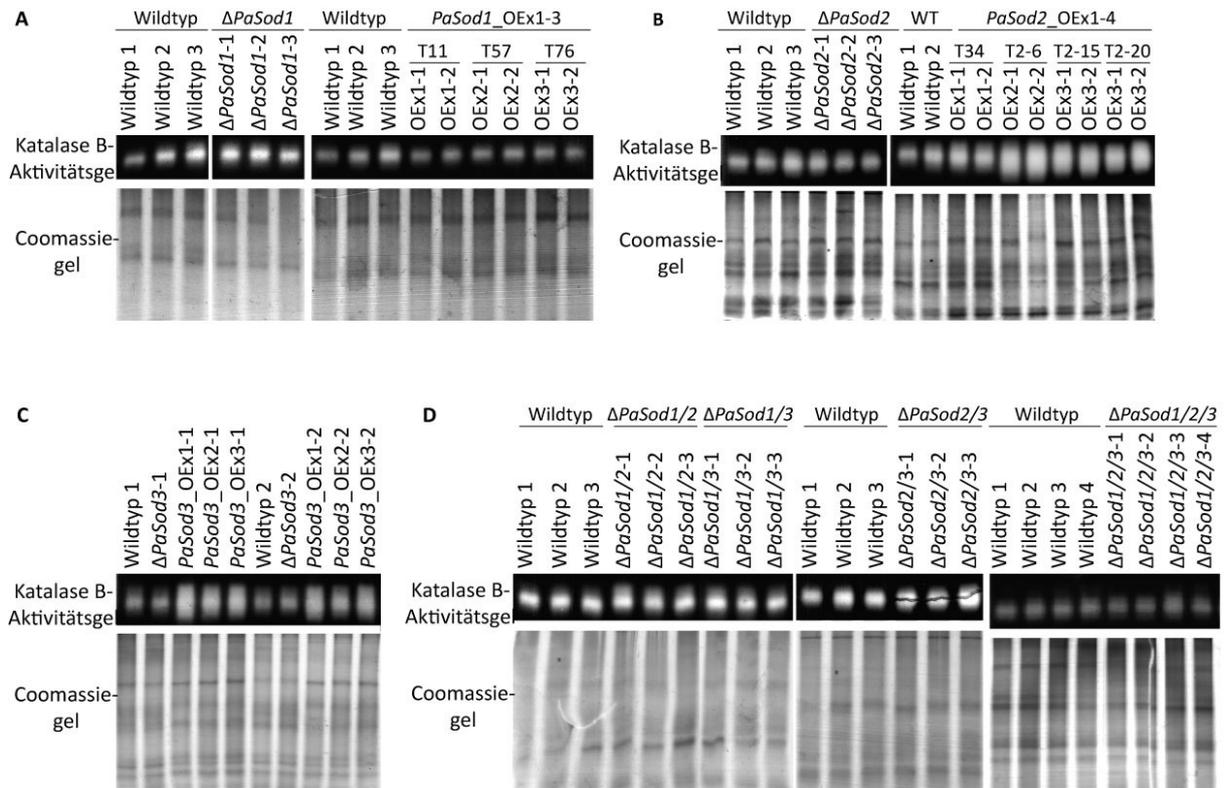


Abb. 20: Qualitative Katalase B-Aktivitätsanalysen der verschiedenen *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämmen. Die Aktivität der Katalase B (PaCATB) in je 30 μ g isoliertem Gesamtproteinextrakt von mittelalten Wildtypen wurde mit der von den verschiedenen mittelalten Überexpressionsstämmen (*PaSod1-3_OEx*) bzw. von den verschiedenen mittelalten Deletionsstämmen ($\Delta PaSod1-3$, $\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$) verglichen. Die „in Gel“-Katalase-Aktivitätsfärbung wurde in einem 10 %igen Polyacrylamidgel durchgeführt (siehe auch Methode „Katalaseaktivitätsfärbung“). Als Ladekontrolle diente ein gleich behandeltes Polyacrylamidgel, das mit Coomassie zum Anfärben der Proteine gefärbt wurde. **A** Katalase-Aktivitätsanalyse der *PaSod1*-modulierten Stämme. Die Katalase B-Aktivität (PaCATB) ist im Vergleich zum Wildtyp in den Gesamtproteinproben des *PaSod1*-Deletionsstammes erhöht und in denen der *PaSod1*-Überexpressionsstämme reduziert. **B** Katalase-Aktivitätsanalyse der *PaSod2*-modulierten Stämme. Die Katalase B-Aktivität (PaCATB) ist im Vergleich zum Wildtyp in den Gesamtproteinproben des *PaSod2*-Deletionsstammes geringer und in denen der *PaSod2*-Überexpressionsstämme unterschiedlich stark erhöht. **C** Katalase-Aktivitätsanalyse der *PaSod3*-modulierten Stämme. Bei einer Überexpression der *PaSod3* kommt es zu einer gesteigerten Katalase B-Aktivität. Die Katalase B-Aktivität ist beim *PaSod3*-Deletionsstamm unverändert im Vergleich zum Wildtyp. **D** Katalase-Aktivitätsanalyse der *PaSod*-Doppeldeletionsmutanten bzw. der *PaSod*-Tripeldeletionsmutante. Die Katalase B-Aktivität ist im Vergleich zum Wildtyp in den Gesamtproteinextrakten der *PaSod*-Doppeldeletionsstämmen und der *PaSod*-Tripelmutante unverändert.

Die Katalase B-Aktivität erscheint in den Gelen als eine helle Bande, ähnlich zu den Aktivitätsgelen der Superoxid-Dismutasen. Die Analysen der Katalase B-Aktivität zeigen, dass nicht nur die Aktivität der PaSODs, sondern auch die PaCATB-Aktivität in den *PaSod*-modulierten Stämmen verändert ist. Demnach lassen sich verminderte Aktivitäten der PaCATB in den Gesamtproteinextrakten der *PaSod1*-Überexpressionsstämmen und des *PaSod2*-Deletionsstammes nachweisen (Abb. 20 A und B). Hingegen ist die Katalase B-Aktivität in den Gesamtproteinextrakten der *PaSod1*-Deletionsstammes sowie in den Gesamtproteinextrakten der *PaSod2*- und *PaSod3*-Überexpressionsstämmen stark erhöht

(Abb. 20 A bis C). Bei den Analysen der verschiedenen *PaSod*-Doppeldeletionsmutanten bzw. der *PaSod*-Tripeldeletionsmutante können keine Unterschiede der Katalase B-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 20 D).

Die H₂O₂-Sensitivität (bspw. in den Stämmen $\Delta PaSod1$ und *PaSod3*_OEx1-3) bzw. die Toleranz gegenüber H₂O₂ ($\Delta PaSod1/2/3$) kann nicht mit einer verminderten bzw. erhöhten PaCATB-Aktivität erklärt werden. Denn obwohl der *PaSod1*-Deletionsstamm sowie auch die *PaSod3*-Überexpressionsstämme eine erhöhte PaCATB-Aktivität aufweisen, sind diese Stämme sensitiv gegenüber H₂O₂. Auch die gesteigerte H₂O₂-Toleranz in den *PaSod1/2/3*-Stämmen steht nicht im Zusammenhang mit der Katalase B-Aktivität, da diese im Vergleich zum Wildtyp unverändert ist.

Wodurch es zu dieser veränderten Katalase B-Aktivität kommt, ist unklar. Eine mögliche Erklärung für eine gesteigerte Aktivität könnte in einem gesteigerten H₂O₂-Level der *PaSod*-modulierten Stämme liegen. Beispielsweise könnte die Überexpression der *PaSod2* und *PaSod3* durch ihre gesteigerte Abbaurate des Superoxids zu Wasserstoffperoxid zu einem zellulären Anstieg des H₂O₂-Spiegels führen. Dieser erhöhte H₂O₂-Spiegel könnte zur Folge haben, dass die PaCATB-Aktivität induziert wird. In *P. anserina* kommt es bei oxidativem Stress, ausgelöst durch die Zugabe von 0,75 mM H₂O₂, zu einer gesteigerten Aktivität der Katalase B (Zintel et al., 2011). Diese Signalfunktion von H₂O₂ könnte auch hier eine bedeutende Rolle für die Regulation der Katalase B-Aktivität spielen.

Interessanterweise lässt sich ein Zusammenhang zwischen den beiden sekretierten Enzymen PaCATB und PaSOD2 erkennen. Die *PaSod1*-Überexpressionsstämme besitzen sowohl geringere Mengen PaSOD2- als auch PaCATB-Aktivität. Hingegen weisen die Überexpressionsstämme der *PaSod2* und *PaSod3* eine gesteigerte Aktivität der PaSOD2 und PaCATB auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass diese zwei Schutzsysteme gegen ROS, nämlich zur Abwehr von Superoxid und Wasserstoffperoxid, co-reguliert werden. Ist mehr PaSOD2-Aktivität vorhanden, wird auch mehr PaCATB-Aktivität benötigt, welches das durch die PaSOD2 generierte H₂O₂ zu vollständigen Detoxifizierung abbaut.

Diese Analysen zeigen, dass die Modulation der *PaSods* zu weiteren Auswirkungen auf andere ROS-Systeme führt und diese damit eng miteinander verbunden sind.

Protein- und Transkriptanalysen der Protein-Qualitätskontrolle und des ROS-Schutzsystems der *PaSod3*-modulierten Stämme

Im Gegensatz zur ursprünglichen Annahme besitzt der *PaSod3*-Deletionsstamm, trotz einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Paraquat, keine signifikant veränderte mittlere Lebensspanne, während die Überexpression durch eine verkürzte Lebensspanne und oxidativen Stress gekennzeichnet ist. Eine mögliche Erklärung für diesen negativen Einfluss der *PaSod3*-Überexpression könnte ein erhöhter Wasserstoffperoxidspiegel sein, welcher durch die gesteigerte PaSOD3-Aktivität hervorgerufen wird. Eine vollständige Entgiftung des Wasserstoffperoxids scheint trotz erhöhter Katalase B-Aktivität unzureichend zu sein. In der *P. anserina*-Datenbank (<http://podospora.igmors.u-psud.fr/more.html>) sind vier weitere putative Katalasen bekannt, jedoch wurde von keiner durch eine algorithmischen Sequenzanalyse eine mitochondriale Lokalisation vorhergesagt (Wolf und PSORT II Prediction; Horton und Nakai, 1997). Allerdings besitzt *P. anserina* zum enzymatischen Abbau von Wasserstoffperoxid eine mitochondriale Peroxidase, das Peroxiredoxin (PaPRX1), dessen Proteinmenge in seneszenten Stämmen vermindert ist (Groebe et al., 2007). Um die Ursache des „kranken“ Phänotyps der *PaSod3*-Überexpressionsmutante zu finden, wurden Proteinextrakte aus isolierten Mitochondrien der *PaSod3*-Mutantenstämme durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 21). Im Focus dieser Analyse standen Komponenten des ROS-Schutzsystems (PaPRX1) sowie der Protein-Qualitätskontrolle, wie die Proteasen PaLON und PaCLPP, die geschädigte mitochondriale Proteine abbauen und von denen spezifische Peptidantikörper zu Verfügung standen.

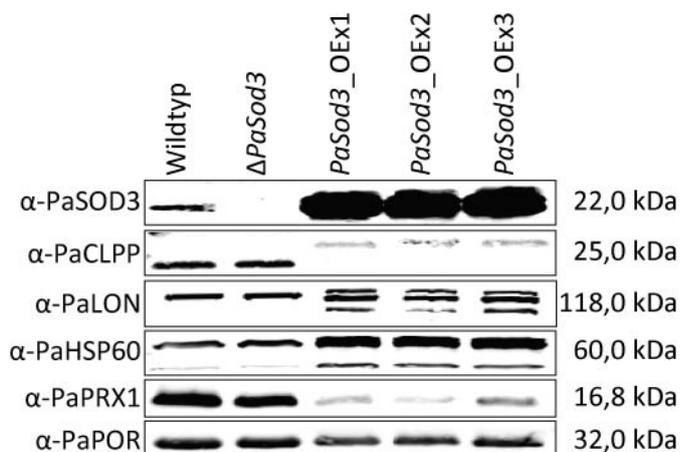


Abb. 21: Western Blot-Analyse des *PaSod3*-Deletionsstammes und der *PaSod3*-Überexpressionsstämme. 50 μ g mitochondrialer Proteinextrakt wurden in einem 16 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die verwendeten Antikörper sind links und die Proteingrößen rechts dargestellt. PaPORIN diente als Ladekontrolle. Die *PaSod3*-Überexpression führt zu veränderten Proteinmengen der Protein-Qualitätskontrolle und des ROS-Schutzsystems. Abbildung modifiziert nach Zintel et al. (2010).

Aus diesen Western Blot-Analysen geht hervor, dass die Überexpression der *PaSod3* zu veränderten Proteinlevel von Komponenten der Protein-Qualitätskontrolle und des ROS-Schutzsystems führt (Abb. 21). So zeigt sich eine unerwartete und dramatische Reduzierung der Proteinmengen des Peroxiredoxins (PaPRX1) und der mitochondrialen Protease (PaCLPP), deren Aufgabe es ist, zusammen mit der PaLON-Protease, geschädigte Proteine abzubauen. Im Gegensatz zu den reduzierten Proteinmengen der PaCLPP, erscheint die Menge an PaLON leicht erhöht zu sein. Zusätzlich sind weitere PaLON-Banden zu erkennen, die möglicherweise auf einer veränderten Prozessierung (bspw. unvollständige Prozessierung und partieller Abbau) dieses Proteins beruhen. Ebenfalls ändert sich in den *PaSod3*-Überexpressionsstämmen die Proteinmenge des Hitzeschockproteins PaHSP60. Es ist bekannt, dass dieses Protein sowohl bei Hitzestress als auch durch verschiedene Stressoren hochreguliert wird (Feder und Hofmann, 1999; Lindquist, 1986; Ritossa, 1996). In den Überexpressionsstämmen scheint PaHSP60 hochreguliert zu sein, wobei die untere Bande auf einen Degradationsprozess hinweisen könnte. Zusammenfassend zeigt diese Analyse, dass es bei der Überexpression der *PaSod3* zu massiven Veränderungen von Proteinmengen von Komponenten der Protein-Qualitätskontrolle sowie des ROS-Schutzsystems kommt und dies eine mögliche Erklärung für den negativen Phänotyp dieses Stammes liefert.

Um zu untersuchen, ob die veränderten Proteinmengen in den *PaSod3*-Überexpressionstransformanten auf eine mögliche Regulation auf Transkriptebeine hervorgerufen werden, wurden Transkriptanalysen mittels einer quantitativen „Real-Time“-PCR (qRT-PCR) mit der cDNA von mittelalten Wildtypen und *PaSod3*-Mutantenstämmen durchgeführt (Abb. 22).

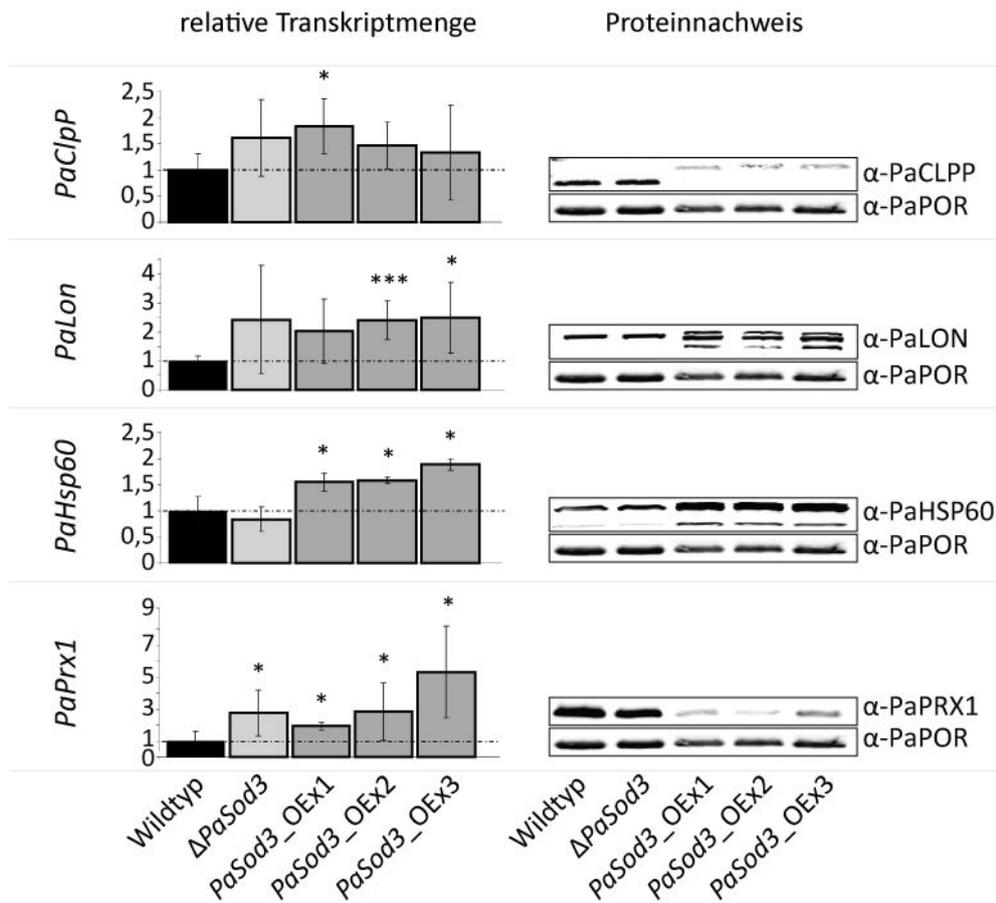


Abb. 22: Transkriptmengen des *PaSod3*-Deletionsstammes und der *PaSod3*-Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtyp. Die Transkriptmengen von *PaClpP*, *PaLon*, *PaHsp60* und *PaPrx1* des Wildtyps wurde als Basis gewählt und erhielt den Wert 1. Dieser Wert wurde mit dem der *PaSod3*-Deletionsstämme und Überexpressionsstämme verglichen. Auf der rechten Seite ist die Western Blot-Analyse zum Vergleich der Transkriptmengen aufgeführt. Anzahl der getesteten Stämme und die relative *PaClpP*-Transkriptmenge für Wildtyp: 1, n= 5; $\Delta PaSod3$: 1,61, n= 4; *PaSod3*_OEx1: 1,84, n= 4; *PaSod3*_OEx2: 1,47, n= 5; *PaSod3*_OEx3: 1,33, n=4. Anzahl der getesteten Stämme und die relative *PaLon*-Transkriptmenge für Wildtyp: 1, n= 6; $\Delta PaSod3$: 2,24, n= 4; *PaSod3*_OEx1: 2,03, n= 4; *PaSod3*_OEx2: 2,4, n= 5; *PaSod3*_OEx3: 2,48, n=5. Anzahl der getesteten Stämme und die relative *PaHsp60*-Transkriptmenge für Wildtyp: 1, n= 3; $\Delta PaSod3$: 0,84, n= 4; *PaSod3*_OEx1: 1,55, n= 4; *PaSod3*_OEx2: 1,58, n= 3; *PaSod3*_OEx3: 1,89, n=2. Anzahl der getesteten Stämme und die relative *PaPrx1*-Transkriptmenge für Wildtyp: 1, n= 5; $\Delta PaSod3$: 2,77, n= 4; *PaSod3*_OEx1: 1,94, n= 3; *PaSod3*_OEx2: 2,84, n= 6; *PaSod3*_OEx3: 5,32, n=5. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Signifikante Unterschiede zum Wildtyp wurden mit dem Student's T-Test (<http://studentsttest.com>) ermittelt und sind mit * gekennzeichnet (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ und *** $p \leq 0.001$).

Die Transkriptmengen von *PaClpP* und *PaPrx1* werden in den Überexpressionsstämmen sowie in der Deletionsmutante hochreguliert (Abb. 22). Demnach können die verminderten Proteinmengen von PaCLPP und PaPRX1 in den *PaSod3*-Überexpressionsstämmen nicht durch eine Herabsenkung der Transkription zurückgeführt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten erhöhte Abbauraten von oxidativ-geschädigtem PaPRX1 und PaCLPP sein. Die gesteigerten Proteinmengen von PaLON und PaHSP60 in den mitochondrialen Proteinextrakten der *PaSod3*-Überexpressionsstämmen lassen sich durch eine erhöhte

Transkription von *PaLon* und *PaHsp60* erklären (Abb. 22). Durch die Western Blot- und Transkriptanalysen geht hervor, dass die Überexpression der *PaSod3* nicht nur einen Einfluss auf die Aktivitäten der PaSODs und PaCATB, sondern auch Auswirkungen auf die mitochondriale Protein-Qualitätskontrolle (PaLON, PaCLPP und PaHSP60) und des mitochondrialen ROS-Schutzsystems (PaPRX1) besitzt.

Insgesamt zeigten die bisherigen Analysen der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme, dass die Superoxid-Dismutasen in *P. anserina* ein wichtiges Enzym zur ROS-Abwehr (Superoxidentgiftung) darstellen. Mit Ausnahme der *PaSod*-Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) kann ein Zusammenhang zwischen einer Sensitivität gegenüber oxidativen Stress und einer gesteigerten Menge an oxidativ-geschädigten bzw. carbonylierten Proteinen ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Überexpression einer *PaSod* und die damit gesteigerte Abbaurate des Superoxids nicht zu einer Abnahme von carbonylierten Proteinen führt. Auch führt eine gesteigerte Paraquat-Sensitivität der *PaSod*-Deletionsstämme oder gesteigerte Mengen an oxidativ-geschädigter Proteinen nicht unweigerlich zu einer Minderung der Lebensspanne. Eine enorme Steigerung der carbonylierten Proteinmengen lässt sich an Hand der durchgeführten „OxyBlot“-Analysen nicht feststellen. Möglicherweise werden einzelnen, spezifische Proteine (bspw. die Aconitase) oxidativ-geschädigt und ROS selbst spielt nur eine untergeordnete Rolle und ist viel wichtiger als Signalmolekül.

Interessanterweise konnte ein Einfluss der *PaSod*-Modulation auf die PaSOD-Aktivität und auf weitere Komponenten des ROS-Abwehrsystems (PaCATB und PaPRX1) festgestellt werden. So zeigt sich eine Co-Regulation der PaSODs in den Überexpressionsstämmen sowie ein Zusammenhang der Aktivitäten der beiden sekretierten Enzyme PaSOD2 und PaCATB. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Modulation eines Enzyms es zu weiterführenden Veränderungen anderer Proteine kommt, die in einem hoch komplexen Netzwerk miteinander verbunden sind.

6 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurde die Bedeutung der Superoxid-Dismutasen im Alterungsprozess und in der ROS-Resistenz analysiert. Die Ausgangspunkte für diese Untersuchungen waren dabei die postulierten Hauptthesen der FRTA: (i) ROS verursacht Schäden, die den Alterungsprozess vorantreiben und (ii) das Fehlen von Superoxid-Dismutasen führt zu einem beschleunigten Voranschreiten des Alterungsprozesses. Ausgehend von der FRTA und zur Klärung des Einflusses der SODs auf den Alterungsprozess wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Untersuchungen an verschiedensten Modellorganismen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente waren teils widersprüchlich. Zielsetzung dieser vorliegenden Arbeit war es, die SODs in einem weit weniger komplexen Modellorganismus zu analysieren. Dabei sollte geklärt werden, ob die Superoxid-Dismutasen bei *P. anserina* einen Einfluss auf das Resistenzverhalten gegenüber oxidativen Stress besitzen und welche Rolle sie im Alterungsprozess spielen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung dienten sowohl Überexpressions- als auch verschiedene Deletionsstämme der *PaSods*.

6.1 Die Superoxid-Dismutasen (PaSODs) von *P. anserina*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die bis dahin bekannten drei PaSODs (PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3) untersucht. Erst vor kurzem, nach Abschluss der praktischen Arbeit im Labor, wurde eine mögliche vierte PaSOD, genannt PaSOD4, durch Analysen des Transkriptoms von *P. anserina* entdeckt. Ähnlich zu PaSOD3 besitzt diese vierte PaSOD (PaSOD4) eine mitochondriale Signalsequenz (MTS) und lässt sich in die Gruppe der MnSODs einordnen. Ob es sich hierbei tatsächlich um eine funktionale und aktive PaSOD handelt, ist unklar, da sich während der hier durchgeführten Analysen eine vierte PaSOD, die der PaSOD4 zugeordnet werden könnte, nicht nachweisen ließ. Möglicherweise liegt PaSOD4 nur in sehr geringen Mengen vor oder wird gar nicht erst translatiert und es handelt sich um keine funktional aktive PaSOD. Des Weiteren besteht aber auch die Möglichkeit, dass das Protein nur entwicklungspezifisch exprimiert wird. Beispielsweise zeigen Untersuchungen bei *A. nidulans*, der vier SODs besitzt, dass die Expression vom Entwicklungsstadium (Myzelwachstum, ruhende oder auskeimende Kondienspore) abhängig ist (Lambou et al., 2010). Daher ist nicht auszuschließen, dass das PaSOD4-Protein entwicklungspezifisch oder

unter bestimmten Bedingungen, wie zum Beispiel bei der sexuellen Fortpflanzung, Fruchtkörperbildung, Sporenkeimung oder unter Stress, nachweisbar aktiv ist. Demzufolge ist es notwendig, dass zukünftige Untersuchungen diesen Aspekt berücksichtigen.

Die Lokalisation von PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3

Das Genom von *P. anserina* kodiert, wie bereits oben dargestellt, mehrere Superoxid-Dismutasen (PaSODs). Je nach ihrer Lokalisation haben sie vermutlich eine andere Bedeutung für die Entgiftung von Superoxid. Früher, bevor die komplette Genomsequenz von *P. anserina* bekannt war, wurde zunächst angenommen, dass nur zwei PaSODs existieren: PaSOD1, eine Cu/ZnSOD und PaSOD2, eine MnSOD (Borghouts et al., 2001 und 2002). Bezüglich des Co-Faktors wurde angenommen, dass PaSOD2 die in den Mitochondrien lokalisierte MnSOD sei und PaSOD1 als eine Cu/ZnSOD hauptsächlich im Cytoplasma und auch, wie bereits für Hefe- und Säugerzellen schon publiziert wurde (Okado-Matsumoto und Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001), im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist. Erst 6 Jahre später durch Analysen von Proteinextrakten aus isolierten Mitochondrien und durch die Veröffentlichung des vollständig sequenzierten und annotierten Genoms von *P. anserina*, ergaben sich Hinweise auf eine weitere MnSOD, benannt PaSOD3 (Grief, 2007; persönliche Mitteilung Luce, AK Osiewacz). Durch erste Befunde und die Informationen der *in-silico*-Analysen, welche den Aufenthaltsort nicht eindeutig vorhersagen können, sollte die Lokalisation der PaSODs biochemisch durch die Analysen verschiedener Proteinfractionen und zytologisch mittels GFP-fusionierten SOD-Proteinen durch Mikroskopie ermittelt werden.

Untersuchungen zur Lokalisation von PaSOD1

Die mikroskopischen Analysen zu PaSOD1 ergaben, dass das PaSOD1::GFP-fusionierte Protein hauptsächlich cytoplasmatisch in der Hyphe vorliegt, jedoch auch in einigen Hyphenabschnitten mit der Fluoreszenz der MitoTracker Red-gefärbten Mitochondrien colokalisiert (siehe Abb. 10). Demnach ist davon auszugehen, dass PaSOD1, wie auch bei Hefe und Säugerzellen, die Cu/ZnSOD auch im Intermembranraum der Mitochondrien aufweisen, bei *Podospira* in den Mitochondrien lokalisiert ist (Okado-Matsumoto und Fridovich, 2001; Sturtz et al., 2001). Auffallend ist, dass das PaSOD1::GFP-Fusionsprotein an kugelförmige

fragmentierte Mitochondrien co-lokalisiert. Frühere Studien zeigen, dass die Morphologie der Mitochondrien während des Alterns von fadenförmigen filamentösen Netzwerken sich zu kleinen kugeligen Mitochondrien ändert (Scheckhuber et al., 2007). Wodurch tatsächlich diese Translokation von PaSOD1 verursacht wird, ist noch unklar. Möglicherweise handelt es sich um einen Kompensationsmechanismus, wodurch die PaSOD1 die Funktion des Superoxidabbaus in den Mitochondrien, speziell im Intermembranraum, übernimmt. Einen möglichen Hinweis hierzu ergaben Untersuchungen der Deletionsmutante, in der das Gen für die mitochondriale PaSOD3 deletiert wurde. Die Western Blot-Analysen zeigen, dass PaSOD1 in der Proteinfraction isolierter Mitochondrien dieser Mutante angehäuft ist (siehe Abb. 13 B und D). Es ist wahrscheinlich, dass auch unter Normalbedingungen im Wildtyp PaSOD1 im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist, jedoch auf Grund viel geringerer Mengen biochemisch nicht nachweisbar ist. Um den genauen Mechanismus der Translokation von PaSOD1 in den Intermembranraum der Mitochondrien zu klären, sind allerdings noch weitere Untersuchungen nötig.

Untersuchungen zur Lokalisation von PaSOD2

Entgegen früherer Annahmen, dass PaSOD2 die mitochondriale MnSOD ist, ergaben mikroskopische Untersuchungen, dass das PaSOD2::GFP-Fusionsprotein im Zellkern lokalisiert ist (siehe Abb. 10). Eine solche Lokalisation lässt vermuten, dass sich PaSOD2 im ER befindet und es ist naheliegend, dass es sich hierbei um eine extrazelluläre SOD (EC-SOD) handeln könnte, die sekretiert wird. Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine SOD-Aktivität in Sekretproben nachzuweisen ist, jedoch lässt sich das PaSOD2-Protein nicht im Sekretom durch Western Blot-Analysen belegen (siehe Abb. 11). Dies kann durch die Eigenschaften des Antikörpers begründet sein, da dieser PaSOD2-spezifische Peptidantikörper gegen die letzten 12 C-terminal gelegenen Aminosäuren des PaSOD2-Proteins gerichtet ist. Vermutlich beinhaltet dieser Bereich eine Signalsequenz, die bei der Sekretion abgespalten wird. Weitere Untersuchungen konnten dies bestätigen: Western Blot-Analysen mit sekretierten Proteinen des *PaSod2::gfp*-Stamms haben gezeigt, dass durch die Verwendung eines GFP-Antikörpers nur freies GFP zu detektieren ist (persönliche Mitteilung Frau Grimm). Die Befunde sprechen dafür, dass PaSOD2 im C-terminalen Bereich bei der Sekretion gespalten wird.

Auffallend ist, dass in dem nativen SOD-Aktivitätsgel die Lauffront der Aktivitätsbande in den aufgetrennten Sekretomproben höher liegt, als die PaSOD2-Aktivitätsbande in den Gesamtproteinextrakten. Eine Erklärung für das veränderte Laufverhalten von PaSOD2 könnten verschiedene Prozessierungsschritte sein. Sekretierte Proteine werden häufig phosphoryliert und/oder glycosyliert, um die Löslichkeit im umgebenden Medium zu steigern und die Stabilität gegenüber dem Abbau durch Proteasen zu erhöhen (Archer und Peberdy, 1997; Crocker und Feizi, 1996). Interessanterweise werden in der Literatur beim Mensch, Säuger, dem Fadenwurm *C. elegans* und bei der Hefe *Candida albicans* nur Cu/ZnSODs als sekretierte Superoxid-Dismutasen beschrieben (Fattman et al., 2001; Fujii et al., 1998; Gallagher et al., 1992; Hwang et al., 2002; Marklund, 1984; Martchenko et al., 2004; Oury et al., 1996). Da es sich bei PaSOD2 um eine MnSOD handelt, wäre dieser Befund der erste Hinweis auf eine sekretierte Mn-haltige SOD.

Weitere Hinweise auf eine mögliche Sekretion von PaSOD2 ergaben Analysen zur Bestimmung der Katalase B-Aktivität (siehe Abb. 20). Die Katalase B wird bei *P. anserina* als Schutz vor extrazellulärem Wasserstoffperoxid sekretiert (Zintel et al., 2011). Auffallend ist, dass die Katalase B-Aktivität mit der Aktivität der PaSOD2 co-reguliert zu sein scheint. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese zwei sekretierten ROS-Schutzsysteme, zum Abbau von Superoxid und H₂O₂, zusammen reguliert werden. Wird vermehrt Superoxid durch PaSOD2 abgebaut, so wird auch mehr Katalase B-Aktivität benötigt, um das durch die PaSOD2 generierte H₂O₂ vollständig zu detoxifizieren.

Im Gegensatz zu den anderen Deletionsmutanten weist der *PaSod2*-Deletionsstamm keine verminderte Wachsrates auf Paraquat-haltigem Medium auf (siehe Abb. 14). Paraquat ist eine Substanz, die verwendet wird, um intrazellulär Superoxid zu generieren. Die fehlende Sensitivität des *PaSod2*-Deletionsstammes gegenüber intrazellulärem Stress durch Superoxid kann dadurch begründet sein, dass PaSOD2 sekretiert wird und nur extrazelluläres Superoxid abzubauen vermag. Um vermehrt extrazelluläres Superoxid im Medium entstehen zu lassen und um zu überprüfen, ob der *PaSod2*-Deletionsstamm bzw. die Überexpressionsstämme eine verminderte oder erhöhte Toleranz gegenüber extrazellulär gebildetes Superoxid aufweisen, könnte die Wachsrates auf Riboflavin-haltigen Medium untersucht werden. Unter Lichteinwirkung generiert Riboflavin Superoxid, welches dann extrazellulär im Medium vorliegt (Bilinski et al., 1985). Anhand der bisher vorliegenden Befunde kann mit hoher

Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass PaSOD2 bei *P. anserina* sekretiert wird, doch sollte dieser Punkt noch durch weitere Experimente bestätigt werden.

Untersuchungen zur Lokalisation von PaSOD3

Zunächst wurde angenommen, dass PaSOD2 in den Mitochondrien lokalisiert ist (Borghouts et al., 2001 und 2002). Erst später durch biochemische Analysen von Proteinextrakten isolierter Mitochondrien und einer *in-silico*-Analyse wurde eine zweite MnSOD, PaSOD3, entdeckt (Grief, 2007). Um die mitochondriale Lokalisation zu überprüfen, wurden zum einen mitochondriale Proteinextrakte untersucht und zum anderen durch die Verwendung eines Stammes, der ein PaSOD3::GFP-Fusionsprotein bildet, mikroskopisch analysiert. Das PaSOD3::GFP-Fusionsprotein co-lokalisiert mit der Fluoreszenz der mit MitoTracker Red-gefärbten Mitochondrien (siehe Abb. 10). Ebenfalls ist das PaSOD3-Protein und seine Aktivität ausschließlich in den Proteinextrakten der Mitochondrien nachzuweisen (siehe Abb. 9). Damit ist klar, dass es sich bei PaSOD3 um eine mitochondrial lokalisierte MnSOD handelt. Ob noch eine zweite MnSOD in den Mitochondrien lokalisiert ist, ist unklar. Zwar werden laut einer *in-silico*-Analyse für PaSOD4 eine mitochondriale Signalsequenz und eine Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation von 47,8 % vorhergesagt, jedoch ließ sich zu keiner Zeit bei den durchgeführten Analysen eine weitere mitochondriale PaSOD erkennen. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich PaSOD3 in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist.

6.2 Die Modulation der *PaSods* in *P. anserina*

Um die Rolle der PaSODs im Alterungsprozess und als Schutzenzym vor oxidativen Stress zu analysieren, wurde die Expression der drei *PaSods* (*PaSod1*, *PaSod2* und *PaSod3*) moduliert. Zum einen wurde das jeweilige *PaSod*-Gen durch eine homologe Rekombination gegen eine Resistenzkassette ausgetauscht und dadurch deletiert und zum anderen durch die Integration einer zusätzlichen *PaSod*-Genkopie unter der Kontrolle eines starken Promotors überexprimiert. Die Generierung der Mehrfach-Deletionsmutanten erfolgte durch die Kreuzungen der *PaSod*-Deletionsstämme gegeneinander. Zur Überprüfung der gesteigerten Proteinmenge und Aktivität des jeweils überexprimierenden PaSOD bzw. der fehlenden PaSOD und ihrer Aktivität, wurden die verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme durch

Western Blot- und Aktivitätsanalysen untersucht (siehe Abb. 12 und 13). Es konnte gezeigt werden, dass die erzeugten *PaSod*-Deletionsstämme, das jeweilige *PaSod*-Gen nicht mehr exprimieren und die *PaSod*-Überexpressionsstämme eine erhöhte Menge und Aktivität der gewünschten PaSOD aufweisen. Durch diese Voraussetzungen konnten nun anhand der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme die Rolle und der Einfluss der SODs von *P. anserina* im Alterungsprozess und Resistenzverhalten detaillierter untersucht werden.

Die Deletion der *PaSods* und ihre Effekte auf das Resistenzverhalten und die Lebensspanne

Die Bestimmung der Wachsraten auf Stress-induzierenden Medien, wie Paraquat und Wasserstoffperoxid, sollte Aufschluss geben, welchen Einfluss die Superoxid-Dismutasen auf das Resistenzverhalten bei *P. anserina* besitzen.

Die Analysen haben gezeigt, dass sowohl durch den Verlust der cytoplasmatischen Cu/ZnSOD (PaSOD1) und der mitochondrialen MnSOD (PaSOD3) als auch der Verlust von zwei PaSODs die Stämme eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Paraquat aufweisen (siehe Abb. 14). Wie zu erwarten, ist die Sensitivität gegenüber dieser Superoxid-generierenden Substanz bei der *PaSod*-Tripelmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) am stärksten ausgeprägt. Diese erhöhte Sensitivität gegenüber Paraquat steht im Einklang mit einer Reihe von grundlegenden Studien bei *C. elegans*, *D. melanogaster* und *A. nidulans*, die gezeigt haben, dass die Deletion von *Sods* zu einer Sensitivität gegenüber Superoxid-generierenden Substanzen führt (Lambou et al., 2010; Phillips et al., 1989; Van Raamsdonk und Hekimi, 2009 und 2012).

Interessanterweise zeigte die *PaSod2*-Deletionsmutante keine Abnahme der Wachsrates auf Paraquat-haltigem Medium. Auch der Verlust der extrazellulären SOD in *C. elegans* führt nicht zu einer Sensitivität gegenüber Paraquat (Doonan et al., 2008; Raamsdonk et al., 2009), was die Vermutung unterstützt, dass es sich auch bei PaSOD2 um eine sekretierte SOD handelt.

Ebenfalls wurde untersucht, welchen Einfluss die *PaSod*-Deletion auf die Wasserstoffperoxid-Resistenz hat. Die durchgeführten Analysen haben gezeigt, dass die Wachsrates auf H₂O₂-haltigem Medium lediglich beim *PaSod1*- und beim *PaSod1/2/3*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp verändert ist. Da Wasserstoffperoxid *per se* kein

Substrat der SODs ist und damit sein Abbau nicht von der SOD-Menge abhängig ist, ist dieser Befund erst einmal nicht verwunderlich. Interessant ist vielmehr aber, dass der *PaSod1/2/3*-Deletionsstamm mit steigender H_2O_2 -Konzentration eine im Vergleich zum Wildtyp verbesserte Wachsrates besitzt (siehe Abb. 15 D). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass diese *PaSod*-Tripelmutante im Vergleich zum Wildtyp weniger H_2O_2 freisetzt (siehe Abb. 16). Dies könnte darauf hindeuten, dass, aufgrund der Deletion aller aktiven PaSODs, die durch die SOD generierte Menge an H_2O_2 viel niedriger ist und somit auch die erhöhte H_2O_2 -Toleranz erklären könnte. Das deutet darauf hin, dass im Wildstamm die Aktivität der PaSODs zur H_2O_2 -Belastung führt.

Auffallend bei den Untersuchungen der Wachsrates war, dass die Stämme, in denen die *PaSod1* deletiert vorliegt, eine verminderte Wachsrates aufweisen. Zudem besitzt der *PaSod1*-Deletionsstamm eine erhöhte Sensitivität gegenüber H_2O_2 . Unklar ist wodurch dies begründet ist. Eine erhöhte Menge an H_2O_2 in den Hyphenzellen kann ausgeschlossen werden, da Messungen der H_2O_2 -Freisetzung ergaben, dass der *PaSod1*-Deletionsstamm weniger H_2O_2 im Vergleich zum Wildtyp freisetzt (persönliche Mitteilung von Frau Hamann). Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass es durch die Deletion der *PaSod1* zu einer verzögerten Auskeimung der Sporen kommt. Möglicherweise steht dies mit einem nicht ausgeglichenen ROS-Niveau im Zusammenhang. Studien bei *N. crassa* und *P. anserina* belegen, dass die gezielte Produktion und Freisetzung von ROS (hier Superoxid, generiert durch NADPH-Oxidasen) eine wichtige Rolle bei der sexuellen Entwicklung, der Sporenkeimung und beim Hyphenwachstum spielt (Cano-Dominguez et al., 2008; Malagnac et al., 2004). In Bezug auf die Deletion von *PaSod1* könnte dies bedeuten, dass durch eine verminderte Abbaurates des Superoxids weniger H_2O_2 durch die Dismutationsreaktion von Superoxid entsteht und dazu führt, dass das ROS-Gleichgewicht („steady-state“-Konzentrationen) gestört ist. Dieses gestörte Gleichgewicht könnte dazu führen, dass die Sporenkeimung und das Hyphenwachstum negativ beeinflusst werden.

Die bisherigen Analysen haben gezeigt, dass der Verlust von PaSODs zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Paraquat führt und die Rolle dieses Enzyms für die Entgiftung von Superoxid belegt. Vielmehr noch sollte überprüft werden, welchen Einfluss der Verlust von PaSODs auf die Lebensspanne von *P. anserina* ausübt. Aus der Literatur gehen widersprüchliche Befunde hervor. Bei der Hefe *S. cerevisiae* führt der Verlust der Cu/ZnSOD

oder MnSOD zu einer verminderten replikativen und chronologischen Lebensspanne (Longo et al., 1996 und 1999; Unlu und Koc, 2007; Wawryn et al., 2007). Bei *D. melanogaster* und Mäusen ist ebenfalls die Lebensspanne durch das Fehlen der cytoplasmatischen oder mitochondrialen SOD vermindert (Duttaroy et al, 2003; Elchuri et al., 2005; Kirby et al., 2002; Phillips et al., 1989). Insbesondere bei Mäusen hat der Verlust der mitochondrialen MnSOD dramatische Auswirkungen und führt zu einer hohen postnatalen Sterberate (Lebovitz et al. 1996; Li et al., 1995). Hingegen übt der Verlust der extrazellulären SOD (SOD3, EC-SOD) keinen Einfluss auf die Lebensspanne aus. Unter Stressbedingungen allerdings starben die Mäuse frühzeitig, sodass vermutet wird, dass die EC-SOD der Mäuse essentiell zum Erreichen des normalen Lebensalters ist (Carlsson et al., 1995). Im Gegensatz zu den Analysen bei Maus, Hefe und Fliege bleibt die Lebensspanne der verschiedenen *Sod*-Deletionsstämme bei *C. elegans* trotz einer erhöhten Paraquat-Sensitivität relativ unbeeinflusst (Doonan et al., 2008; Raamsdonk und Hekimi, 2012; Raamsdonk et al., 2009). Die Analysen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Deletion einer einzelnen *PaSod* sich nicht negativ auf die Lebensspanne von *P. anserina* auswirkt (siehe Abb. 18 A bis C). Vielmehr weist der *PaSod2*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp eine leichte Lebensverlängerung auf. Hingegen führt der gleichzeitige Verlust der cytoplasmatischen und mitochondrialen PaSOD ($\Delta PaSod1/3$) zu einer leicht verkürzten Lebensspanne um etwa - 12 % (siehe Abb. 18 D). Dies beruht möglicherweise auf einer Aufsummierung der Lebensspannenverkürzung der Einzel-Deletionsstämme ($\Delta PaSod1$: - 5 % und $\Delta PaSod3$: - 8 %). Allerdings weist die Mutante, in der beide MnSODs ($\Delta PaSod2/3$) fehlen, eine im Vergleich zum Wildtyp leicht verlängerte Lebensspanne (+ 8,7 %) auf. Erstaunlicherweise führt der Verlust von drei PaSODs in der Tripeldeletion ($\Delta PaSod1/2/3$) trotz gesteigerter Sensitivität gegenüber Paraquat und erhöhten Mengen an carbonylierten Proteinen zu keiner verminderten Lebensspanne. Vielmehr lebt dieser Stamm im Vergleich zum Wildtyp etwa + 13 % länger.

Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass die Aktivität der PaSODs alleine eine eher untergeordnete Rolle für den Alterungsprozess spielt und durch die Deletion einer oder mehreren *PaSods* die Lebensspanne unter den durchgeführten Standardbedingungen nicht nennenswert negativ beeinflusst wird. Diese Daten stehen im Einklang mit den Studien von Raamsdonk und Hekimi (2012) an *C. elegans*: Die Deletion von *Sods* führt zwar zu einer Sensitivität gegenüber Paraquat, jedoch beeinflusst diese Sensitivität durch den verminderten Abbau von Superoxid die Lebensspanne nicht negativ, wie dies bei anderen

Modellorganismen publiziert wurde. Allerdings wurden die Analysen der Lebensspanne in dieser vorliegenden Dissertation unter normalen Laborstandardbedingungen durchgeführt und spiegeln somit nicht die gegebenen Bedingungen in der Natur wider. In der Natur ist *P. anserina* sehr wohl verschiedenen Stressfaktoren, wie Temperatur, Strahlung und oxidativem Stress (bspw. bei der Abwehr von Wuchs- und Nährstoffkonkurrenten) ausgesetzt. Für *P. anserina* ist die Auswirkung der natürlichen Gegebenheiten und die Wechselwirkungen mit vielen anderen Mikroorganismen kaum untersucht. Diese naturbedingten Einflüsse können aber für das Altern von *P. anserina* von besonderer Bedeutung sein. Beispielsweise ist bei *C. elegans* bekannt, dass durch die Deletion von *Sods* die Lebensspanne unter Standardbedingungen nicht negativ beeinflusst wird, jedoch die Überlebensrate unter akuten Stressbedingungen (Temperatur-, Salz- und Superoxidstress) stark vermindert wird (Raamsdonk und Hekimi, 2012). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Lebensspanne der *PaSod*-Deletionsstämme unter oxidativem Stress stärker verringert ist.

Der Einfluss von *PaSod*-Überexpressionen auf das Resistenzverhalten und die Lebensspanne

Um zu überprüfen, ob durch eine gesteigerte Aktivität der PaSODs und die damit verbundene erhöhte Abbaurrate des Superoxids der Alterungsprozess von *P. anserina* verlangsamt sowie die Resistenz gegenüber oxidativen Stress verbessert wird, wurden parallel zu den *PaSod*-Deletionsmutanten Überexpressionsstämme der *PaSod1*, *PaSod2* und *PaSod3* generiert und untersucht.

Zahlreiche Untersuchungen von *Sod*-überexprimierenden Stämmen verschiedener Modellorganismen wurden zur Überprüfung der FRTA bereits durchgeführt. Bei der Fruchtfliege *D. melanogaster* z. B. konnte gezeigt werden, dass die Überexpression der *Cu/ZnSod* oder *MnSod* zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Phillips et al., 2000; Sun et al., 2002; Sun und Tower, 1999). Allerdings zeigten andere Studien in diesem Organismus, dass die Überexpression der *Cu/ZnSod* nicht lebensverlängernd wirkt (Orr et al., 2003; Orr und Sohal, 1993; Seto et al., 1990). Es gibt sogar Befunde, die darlegen, dass die Überexpression toxische Effekte während der Entwicklung bei *Drosophila* ausübt (Reveillaud et al., 1991). Ebenfalls keinen lebensverlängernden Effekt hat sowohl die Überexpression der

cytoplasmatischen Cu/ZnSOD als auch die Überexpression der mitochondrial lokalisierten MnSOD im Mausmodell, obwohl die Mäuse einen erhöhten Schutz vor oxidativem Stress und eine verminderte Anhäufung von oxidativen Schäden aufweisen (Huang et al., 2000; Muller et al., 2007; Perez et al., 2009). Mehr oxidativ geschädigte Proteine sind zu beobachten bei *C. elegans* durch die Überexpression der *Cu/ZnSod* oder *MnSod*, jedoch kann hier durch Erhöhung der SOD-Aktivität die Lebensspanne verlängert werden (Cabreiro et al., 2011). Ebenfalls eine verlängerte chronologische und replikative Lebensspanne, jedoch mit einer Anhäufung von oxidierten Proteinen, konnte bei einem *Cu/ZnSod*-überexprimierenden Hefe-Stamm, der zusätzlich *Ccs1* überexprimiert, gezeigt werden (Harris et al., 2005).

Bei der Bäckerhefe *S. cerevisiae* kodiert *Ccs1* für ein cytosolisches Chaperon, das für das Beladen des Cu/ZnSOD-Apoproteins mit Cu^{2+} -Ionen verantwortlich ist. Dieses Chaperon ist hoch konserviert von der Hefe bis zum Mensch (Culotta et al., 1997; Rae et al., 2001). Die gleichzeitige Überexpression von *Ccs1* in *Cu/ZnSod*-überexprimierenden Hefezellen bewirkt eine Steigerung der Cu/ZnSOD-Aktivität. Ohne diese zusätzliche *Ccs1*-Überexpression bleibt die Lebensspanne unverändert Wildtyp-ähnlich (Harris et al., 2005).

Des Weiteren haben Studien bei Hefe gezeigt, dass sowohl die *MnSod*-Überexpression als auch die gleichzeitige Überexpression der *Cu/ZnSod* und *MnSod* die replikative Lebensspanne negativ beeinflusst, wobei die chronologische Lebensspanne jedoch erhöht ist (Fabrizio et al., 2004; Harris et al., 2005). Diese hier aufgeführten publizierten Studien über die Auswirkungen der Überexpression von *Sods* in verschiedenen Alterungsmodellen verdeutlichen, dass nicht nur die Befunde von *Sod*-Deletionsmutanten sehr widersprüchlich sind, sondern auch die Überexpression von *Sods* unterschiedliche Auswirkungen besitzt. Auch spielt dabei die Komplexität dieser untersuchten Organismen eine entscheidene Rolle, da es viele unterschiedliche Faktoren gibt, die es erschweren, die Rolle der SODs im Alterungsprozess zu ermitteln. *P. anserina* hingegen ist ein einfacher Modellorganismus von geringerer Komplexität, in dem schon zahlreiche Studien in Bezug auf den Alterungsprozess, wie z. B. das ROS-Schutzsystem, die Mitochondriendynamik, die Protein-Qualitätskontrolle und DNA-Reparatur, sowie Apoptose, durchgeführt wurden (Hamann et al., 2007 und 2008; Luce et al., 2010; Müller-Ohldach et al., 2011; Scheckhuber and Osiewacz, 2008; Scheckhuber et al., 2007; Zintel et al., 2011). Im Rahmen dieser vorliegenden Dissertation sollte nun in diesem weitaus weniger komplexen Modellorganismus geklärt werden, welche Auswirkung die Überexpression von *PaSods* auf die Lebensspanne und das Resistenzverhalten besitzt.

Zu Beginn der hier durchgeführten Untersuchungen war auffallend, dass durch die Überexpression einer bestimmten *PaSod* die Aktivität der anderen PaSODs beeinflusst wird (siehe Abb. 19). So ließ sich weniger PaSOD2-Aktivität in *PaSod1*-überexprimierenden Stämmen sowie mehr PaSOD1-Aktivität in *PaSod2*-überexprimierenden Stämmen feststellen. Ebenfalls zu beobachten ist eine erhöhte PaSOD1- und PaSOD2-Aktivität in *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen. Ob diese Co-Regulation auf Transkript- oder Proteinebene erfolgt, ist unklar und bedarf weiterführender Untersuchungen. Beispielsweise zeigen Studien an *C. elegans*, dass durch den Verlust einer SOD die Transkriptmengen, nicht jedoch die Proteinmengen, anderer *Sods* ansteigen und eine Art Kompensationsmechanismus darstellen (Raamsdonk und Hekimi, 2009). Interessanterweise zeigten weitere hier durchgeführte Untersuchungen an den *PaSod*-modulierten *P. anserina*-Stämmen, dass eine gesteigerte PaSOD2-Aktivität die Aktivität der sekretierten Katalase B erhöht und diese Aktivitäten miteinander korrelieren (siehe Abb. 20). Diese Korrelation der beiden Aktivitäten, PaSOD2- und PaCATB-Aktivität, könnte ein weiterer Indiz dafür sein, dass PaSOD2 tatsächlich sekretiert wird und eng in Verbindung mit der sekretierten Katalase B steht.

In *P. anserina* erhöht eine gesteigerte PaSOD1- oder PaSOD2-Aktivität weder die Resistenz gegenüber Paraquat und H₂O₂, noch wird die Lebensspanne positiv beeinflusst (siehe Abb. 14, 15 und 18). Lediglich jeweils einer von drei bzw. vier getesteten Überexpressionstämmen (*PaSod1_OEx1*, *PaSod2_OEx1*) weist eine leichte Lebensverlängerung auf. Diese Befunde sprechen gegen die Hypothese der FRTA, dass eine erhöhte SOD-Aktivität zu einer verbesserten Resistenz gegenüber Superoxid führt und letztlich die Lebensspanne verlängert. Diese Ergebnisse widersprechen damit auch den Befunden aus Hefe, Fliege und dem Fadenwurm, bei denen eine verlängerte Lebensspanne festgestellt werden konnte (Cabreiro et al., 2011; Harris et al., 2005; Phillips et al., 2000; Sun et al., 2002; Sun und Tower, 1999), stehen aber im Einklang mit anderen Studien an Fliegen und Mäusen, bei denen die Lebensspanne durch die Überexpression unbeeinflusst ist (Huang et al., 2000; Orr et al., 2003; Orr und Sohal, 1993; Perez et al., 2009; Seto et al., 1990). Bei den Untersuchungen der Paraquat-Resistenz der *PaSod2*-Überexpressionen ist zudem zu berücksichtigen, dass PaSOD2 möglicherweise sekretiert wird und daher eine gesteigerte Resistenz gegenüber intrazellulär gebildetes Superoxid nicht zwangsläufig zu erwarten ist. So

führt auch das Fehlen der extrazellulären SOD in *C. elegans* nicht zu einer gesteigerten Paraquat-Sensitivität (Doonan et al., 2008; Raamsdonk et al., 2009).

Obwohl zwei der vier untersuchten *PaSod2*-Überexpressionsstämme eine größere Menge an carbonylierten Proteinen besitzen, ist die Lebensspanne dieser Stämme nicht verkürzt (siehe Abb. 17 B und 18 B). Damit scheint die Menge an carbonylierten Proteinen nicht relevant für die Lebensspanne zu sein. Vergleichbares wurde bei der Hefe gezeigt: Hier führt die Überexpression der *Sods* zu einem Anstieg an carbonylierten Proteinen. Dies wirkt sich jedoch nicht negativ auf die Lebensspanne aus, da diese Hefe-Stämme sogar eine verlängerte Lebensspanne aufweisen (Harris et al., 2005).

Während die Hochregulation von PaSOD1 und PaSOD2 keinen nennenswerten Einfluss auf die Paraquat-Resistenz und die Lebensspanne hat, sind die Befunde der *PaSod3*-Überexpressionsstämme wesentlich dramatischer. Entgegensetzt der Erwartungen, dass die Überexpression der in den Mitochondrien lokalisierten MnSOD die Mitochondrien vor den reaktiven Eigenschaften des Superoxids schützen und somit die Lebensspanne verlängert, weisen die *PaSod3*-Überexpressionsstämme eine reduzierte Wachstumsrate sowie eine verminderte Resistenz gegenüber Paraquat und H_2O_2 auf (siehe Abb. 14 C und 15 C). Diese verminderte Resistenz führt zu einer Verkürzung der Lebensspanne um bis zu - 23 %, obwohl die Menge an carbonylierten Proteinen nicht erhöht ist (siehe Abb. 17 C und Abb. 18 C). Eine naheliegende Erklärung für den Phänotyp dieser Mutante ist die erhöhte H_2O_2 -Produktion in den Mitochondrien durch die gesteigerte Aktivität der mitochondrialen MnSOD. Diese erhöhte H_2O_2 -Produktion wurde bereits für *E. coli*, Mensch und Maus gezeigt (Amstadt et al., 1991; Buettner et al., 2006; Elroy-Stein et al., 1986; Kim et al., 2001; Li et al., 2000; Rodriguez et al., 2000; Scott et al., 1987; Venkataraman et al., 2004 und 2005; Zhang et al., 2002). Laut Buettner et al. (2006) ist davon auszugehen, dass die stationäre „steady-state“-Konzentration von Superoxid, H_2O_2 , SODs und Katalasen durch die Überexpression der *Sods* ins Schwanken kommt und der ansteigende Pegel an H_2O_2 nicht ausreichend schnell von Katalasen oder Peroxidasen weiter entgiftet wird. Darüber hinaus gibt es aber auch ein Modell von mathematischen Modellierern, mit der die Erhöhung der „steady-state“-Konzentration an H_2O_2 erklärt werden kann (Kowald und Klipp, 2004; Kowald et al., 2006). Anhand dieser mathematischen Modellierung ist es zunächst einmal nicht möglich, dass sich die H_2O_2 -Gleichgewichtskonzentration bei steigender SOD-Aktivität erhöht, da davon

auszugehen ist, dass die Superoxidproduktion in der Zelle gleich bleibt. Eine Erhöhung der H_2O_2 -Konzentration wurde allerdings in zahlreichen Studien (s. o.) gezeigt, und lässt sich nur durch einen alternativen Reaktionsweg erklären, über den das Superoxid so abgebaut wird, dass kein H_2O_2 entsteht. Ein solcher zusätzlicher Reaktionsweg kann beispielsweise die Reaktion von Superoxid mit Proteinen oder Lipiden sein. Wird die SOD-Aktivität erhöht, verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Abbauwegen hin zu dem Weg über die SOD, und führt dadurch zu einer Erhöhung der H_2O_2 -Gleichgewichtskonzentration. Diese Erhöhung der H_2O_2 -Gleichgewichtskonzentration konnte experimentell für die *PaSod3*-Überexpressionsstämme gezeigt und durch die mathematische Modellierungen erklärt werden (Kowald et al., 2012). Durch Zugabe von Paraquat wird wesentlich mehr H_2O_2 in den *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen im Vergleich zum Wildtyp produziert. Möglicherweise wird durch den erhöhten H_2O_2 -Level oder den vorzeitigen Anstieg der „steady-state“-Konzentration eine frühzeitige Seneszenz hervorgerufen. So lassen sich auch erhöhte Mengen an H_2O_2 in seneszenten *P. anserina*-Stämmen nachweisen (Scheckhuber et al., 2007). Zudem ist bei der Hefe bekannt, dass durch H_2O_2 -Zugabe die Caspase-Aktivität induziert und Apoptose ausgelöst wird (Madeo et al., 2002). Dies könnte erklären, warum die *PaSod3*-Überexpressionsstämme eine verkürzte Lebensspanne aufweisen. Ebenfalls zu einer reduzierten Lebensspanne kommt es bei *MnSod*-überexprimierenden *D. melanogaster*-Stämme (Mockett et al., 1999), währenddessen eine andere Arbeitsgruppe darlegt, dass die Überexpression der *MnSod* in *Drosophila* zu einer verlängerten Lebensspanne führt (Sun et al., 2002). Während die *MnSod* bei Mockett et al. (1999) über den ganzen Lebenszyklus in *Drosophila* überexprimiert wird, wird die gesteigerte Expression der *MnSod* bei Sun et al. (2002) nur in adulten *Drosophila* induziert. Die Autoren um Sun et al. (2002) vermuten, dass die unterschiedliche Lebensspanne die bei diesen beiden Studien erhalten wurden, durch die zeitlich induzierte Überexpression der *MnSod* begründet sei und davon abhängt, in welcher Entwicklungsphase die *MnSod* überexprimiert wird. Dabei können nachteilige Effekte der Überexpression im frühen Entwicklungsstadium die positiven Effekte der Überexpression in adulten Stadium aufgehoben werden. Daraus lässt sich schließen, dass es entscheidend ist, ob eine Überexpression permanent erfolgt, oder nur in einem bestimmten Stadium ausgelöst wird.

Eine naheliegende Erklärung für den lebensverkürzenden Effekt der *PaSod3*-Überexpression wäre eine gesteigerte Menge geschädigter Proteine durch die erhöhte H_2O_2 -Produktion.

Jedoch sind die Mengen an carbonylierten Proteinen verhältnismäßig gleich stark wie bei den getesteten Wildtypen (siehe Abb. 17 C). Dabei ist jedoch nicht auszuschließen, dass gezielt einzelne Proteine oxidativ geschädigt werden und dazu führen, dass der Organismus vorzeitig altert.

Um die negativen phänotypischen Effekten der *PaSod3*-überexprimierenden Stämme detaillierter zu klären, wurde eine Auswahl an mitochondrialen Proteinen untersucht. Dabei handelte es sich um Komponenten des ROS-Schutzsystems und der mitochondrialen Protein-Qualitätskontrolle (PQC: „protein quality control“).

Zum ROS-Schutzsystem bei *P. anserina* gehört das in den Mitochondrien lokalisierte Peroxiredoxin (PaPRX1). Dieses Enzym gehört zu der Proteinfamilie der Peroxidasen und detoxifiziert unter Energieverbrauch eines Reduktionsäquivalents Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die Proteinmenge dieses Proteins in seneszenten Wildtypen vermindert ist (Groebe et al., 2007).

Bei der Protein-Qualitätskontrolle (PQC) handelt es sich um einen zellulären Schutzmechanismus. Die dazu zählenden Proteine sorgen für das Überleben des Organismus sowie für die Aufrechterhaltung eines funktionalen Proteoms (= Die Gesamtheit aller Proteine in einem Zellkompartiment, einer Zelle, einem Gewebe oder einem Organismus). Proteine, die zu der PQC zählen, sind u. a. Chaperone wie das HSP60 sowie die Proteasen LON und CLPP, die geschädigte Proteine abbauen. Das Hitzeschockprotein PaHSP60 und die beide Proteasen, PaLON und PaCLPP, wurden bereits in *P. anserina* untersucht und spezifische Antikörper standen für die durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung.

Die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zeigen, dass durch die erhöhte Aktivität der mitochondrialen MnSOD die Protein- und Transkriptmengen von Komponenten des ROS-Schutzsystems und der PQC beeinflusst sind (siehe Abb. 21). Dabei sind die Proteinmengen von PaCLPP und PaPRX1 stark reduziert, während beide Transkripte (*PaPrx1* und *PaClpP*) hochreguliert werden. Darüber hinaus steigen Transkript- und die Proteinmengen von PaLON und PaHSP60 in den *PaSod3*-überexprimierenden Stämmen an. Untersuchungen bei *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass die Menge an LON (PIM1) und HSP78 durch H₂O₂-Stress ansteigt und die Menge an PRX1 durch Superoxid- und H₂O₂-Stress abnimmt (Bender et al., 2010). Des Weiteren postulieren die Autoren, dass die LON-Protease der Hefe PRX1 abbaut. Eine naheliegende Vermutung, warum die Menge an PaPRX1 und PaCLPP in *P. anserina* abnimmt, ist, dass diese Proteine aufgrund einer gesteigerten Menge an H₂O₂ in den Mitochondrien oxidativ geschädigt werden und im Falle von PaPRX1 ähnlich zur Hefe von den gesteigerten Mengen an PaLON abgebaut werden. Auch die Befunde der gesteigerten PaHSP60-Proteinmengen lassen vermuten, dass dieses Protein, das zu den Hitzestressproteinen gehört und bei verschiedenen Stressfaktoren, wie z. B. Hitzestress

hochreguliert wird (Feder and Hofmann, 1999; Lindquist, 1986; Ritossa, 1996), in *P. anserina* bei oxidativen Stress induziert wird.

Die negativen Effekte der *PaSod3*-überexprimierenden Stämme konnten größtenteils mit Hilfe von ergänzenden Experimenten und eines mathematischen Modells schlüssig erklärt werden (Kowald et al., 2012). Durch die erhöhte Aktivität der PaSOD3 steigt die „steady-state“-Konzentration von H_2O_2 dramatisch an und führt dazu, dass Proteine wie PaPRX1 und PaCLPP oxidativ geschädigt werden und die Menge beider Proteine abnimmt. Die Abnahme des H_2O_2 -abbauenden PaPRX1 führt wiederum zu einem Anstieg der H_2O_2 -Menge und vermindert dadurch die Proteinmengen von PaPRX1 noch zusätzlich.

Insgesamt haben die Befunde dieser vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Manipulation eines einzigen Gens zu weitreichenden Auswirkungen auf andere Komponenten führt. Daher ist die reduktionistische Vorgehensweise vieler Studien, d. h. ein Gen wird hochreguliert oder ausschaltet und spezifisch einfache Effekte werden beobachtet, sehr kritisch zu sehen. Vielmehr muss das ganze System in Betracht gezogen werden, um die Auswirkungen der Manipulation zu begründen. Die Systembiologie ist dabei ein wichtiger Bereich. Durch sie sollen die komplexen und dynamischen Abläufe eines Organismus bspw. während des Alterns in einen sinnvollen Gesamtzusammenhang gebracht und durch mathematische Modellierungen nachgebildet werden, sodass Zusammenhänge einzelner Signalwege besser verstanden werden können. Die Befunde dieser Arbeit eröffnen neue Einblicke, um die einzelnen komplexen und interagierenden Netzwerke besser zu verstehen und neue Ideen zu entwickeln, diese experimentell und computermoduliert zu überprüfen. Es konnte gezeigt werden, dass die Superoxid-Dismutasen mit einer Vielzahl von unterschiedlichen molekularen Netzwerken verbunden sind und es wichtig ist die Interaktionswege, ihre Wechselwirkung und Regulation detaillierter zu analysieren.

7 Ausblick

Ein wichtiger Aspekt dieser vorliegenden Arbeit lag in der Klärung, welche Rolle die Superoxid-Dismutasen im Alterungsprozess und bei der Abwehr von oxidativen Stress in *P. anserina* übernehmen. Ausgehend von den erhaltenen Befunden ergeben sich dabei neue Ansatzpunkte für weiterführende Analysen. Entgegen früherer Annahmen konnte nun gezeigt werden, dass PaSOD2 nicht die mitochondriale SOD ist. Überraschenderweise scheint das Protein im ER vorzuliegen bzw. könnte sekretiert werden. Leider war es nicht möglich, das PaSOD2-Protein im Sekretom nachzuweisen, da der verwendete Antikörper nach möglichen Modifikationen des PaSOD2-Proteins (ggf. auch Abspaltung der N-terminalen Peptidsequenz gegen die der Antikörper generiert wurde) dieses nicht nachweisen kann. Da bislang keine Daten zu sekretierten MnSODs vorliegen, ist es wichtig, diesen Punkt endgültig zu klären. Ein möglicher Ansatz dazu könnte eine massenspektrometrische Untersuchung der ausgeschnittenen SOD-Aktivitätsbande der aufgetragenen Sekretomproben aus dem nativen Polyacrylamidgel sein. Ebenfalls interessant wäre, falls es sich bei PaSOD2 tatsächlich um eine sekretierte Mn-SOD handelt, welches Resistenzverhalten die *PaSod2*-modulierten Stämme gegenüber extrazellulärem Superoxid-Stress durch Riboflavin aufweisen.

Überraschende Ergebnisse brachten auch die Western Blot-Analysen der *PaSod3*-Deletionsmutante. Hierbei wurden große Mengen PaSOD1 in der mitochondrialen Proteinfraction nachgewiesen. Eine derart deutliche Verlagerung der Lokalisation ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Wodurch es zu solch einer vermehrten Translokalisierung von PaSOD1 an die Mitochondrien kommt und ob es sich dabei um ein Kompensationsmechanismus der mitochondrialen ROS-Entgiftung handelt, ist unklar und bedarf weiterer Analysen.

Nach Abschluss der praktischen Arbeit im Labor ergaben sich Anfang 2012 neue Erkenntnisse über das Vorhandensein einer möglichen dritten MnSOD, PaSOD4. Über ihre Funktion und Lokalisation ist nichts bekannt. Da PaSOD4 von der Proteinsequenz so stark von PaSOD2 und PaSOD3 abweicht, ist nicht sicher, ob es sich hierbei tatsächlich um eine funktionelle SOD handelt. In den verschiedensten durchgeführten Aktivitätsgelen konnte keine vierte PaSOD-Aktivitätsbande nachgewiesen werden. Dies könnte ebenfalls dafür sprechen, dass es sich

bei PaSOD4 um keine funktional aktive PaSOD handelt. Ausstehend sind hier noch weitere Untersuchungen, die klären sollen, ob *PaSod4* überhaupt translatiert wird und wenn ja, welche Funktion es im Alterungsprozess von *P. anserina* ausübt.

Bezüglich der Fragestellung, welchen Einfluss die Superoxid-Dismutasen im Alterungsprozess von *P. anserina* haben, ist festzustellen, dass die Lebensspanne der *PaSod*-deletierten Stämme unter den normalen Standardbedingungen nicht oder nur geringfügig beeinflusst ist. Es ist aber gut möglich, dass unter Stressbedingungen (bspw. Superoxid- und H₂O₂-Stress), wie sie auch in der Natur vorkommen, die Lebensspanne der *PaSod*-Deletionsstämme negativ beeinflusst wird. Es ist daher in zukünftigen Studien notwendig, dies zu überprüfen.

Die Experimente zur Bestimmung der Gesamtmengen an carbonylierten Protein haben gezeigt, dass entgegen der Erwartungen die *PaSod*-Deletions- bzw. Überexpressionsstämme keine signifikant zum Wildtyp veränderten Mengen an carbonylierten Proteinen aufweisen. Da sich die Untersuchungen auf die Gesamtmenge der carbonylierten Proteinen bezog, ist nicht auszuschließen, dass einzelne Proteine - besonders „anfällig“ sind solche Proteine mit Fe-S-Zentren (bspw. die Aconitase, die NADH-Dehydrogenase, Succinat-Dehydrogenase oder Cytochrom-c-Reduktase der Atmungskettenkomplexe I, II oder III) - durch oxidativen Stress geschädigt werden. Aufschlussreich wären hier 2D-Western Blot-Analysen (Auftrennung der Proteine in einer zweiten Dimension), um zu untersuchen, ob einzelne carbonylierte Protein-„Spots“ sich verändern, die in einer massenspektrometrischen Analyse genauer untersucht werden können. Damit wäre es möglich, herauszufinden, ob gezielt bestimmte Proteine oxidativ geschädigt werden. Es ist jedoch auch nicht auszuschließen, dass die Manipulation der SOD-Menge kompensatorische Mechanismen in der Zelle auslöst, wie z.B. die Induktion von Autophagie, die den eigentlichen Effekt „maskieren“. Daher ist es nötig, in zukünftigen Untersuchungen über die eigentlichen ROS-Abbaumechanismen hinaus, auch andere Proteinqualitätskontrollwege wie das Ubiquitin-Proteasom-System oder die Autophagie zu analysieren.

Des Weiteren sind Untersuchungen nötig, die die Co-Regulation der PaSODs bzw. den Einfluss auf die Katalase B-Aktivität aufklären. In *C. elegans* wird die Deletion einer *Sod* durch die Hochregulation einer anderen *Sod* auf Transkriptebene kompensiert (Van Raamsdonk und Hekimi, 2009). Um dies für *P. anserina* zu prüfen, müssten die Transkripte der

verschiedenen *PaSods* aus den unterschiedlichen *PaSod*-Mutanten durch Transkriptanalysen untersucht werden. Relevant dafür ist die plausible Co-Regulation der beiden sekretierten Enzyme PaSOD2 und PaCATB. Um zu überprüfen, ob möglicherweise der H₂O₂-Spiegel in bzw. auch außerhalb der Zelle – mitverursacht durch eine niedrigere oder höhere Superoxid-Dismutation - eine entscheidende Rolle bei der Induktion der PaCATB-Aktivität führt, müsste die H₂O₂-Freisetzung der entsprechenden Stämme ermittelt werden.

Auch die Analysen der *PaSod3*-Überexpressionstämmen bergen Potenzial für zukünftige Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Überexpression der *PaSod3* Komponenten des mitochondrialen ROS-Schutzsystems und der Protein-Qualitätskontrolle verändert sind. Die genaue Ursache ist bislang noch unklar. Diese und weitere neu aufkommende Fragen sollen im Rahmen des fortlaufenden DFG-Antrags weiter bearbeitet werden.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser vorliegenden Doktorarbeit sollte die Bedeutung von Superoxid-Dismutasen für das Resistenzverhalten und den Alterungsprozess bei *P. anserina* untersucht werden. Folgende Befunde aus den Analysen konnten erhalten werden:

1. Lokalisationsstudien der drei *PaSods*

Aus den biochemischen und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der drei verschiedenen PaSODs geht hervor, dass PaSOD1, eine Cu/ZnSOD, überwiegend im Cytosol und zu einem geringen Anteil im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert ist. Eine der beiden MnSODs, PaSOD2, wird vermutlich zur Abwehr von exogenem Superoxid sekretiert. Bei PaSOD3 handelt es sich um eine mitochondriale MnSOD.

2. Generierung von verschiedenen *PaSod*-Mutanten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von jeder *PaSod* mindestens drei unabhängige Überexpressionsstämme, ein GFP-Stamm- und ein Deletionsstamm hergestellt. Weiterhin wurden alle möglichen Doppel-Deletionsstämme und die Dreifach-Deletionsmutante erzeugt. Alle Stämme wurden auf DNA-Ebene verifiziert, zusätzlich wurde die Proteinmenge bzw. -Aktivität überprüft.

3. Einfluss der PaSODs auf die ROS-Toleranz

Die Analysen der ROS-Resistenzen haben gezeigt, dass PaSODs eine wichtige Rolle in der Entgiftung von Superoxiden spielt. So ließ sich bei den Deletionsstämmen der *PaSods* eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Paraquat feststellen. Eine Aufsummierung der Sensitivität gegenüber Paraquat ist bei der *PaSod*-Tripelmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) zu erkennen.

Überraschenderweise kann durch die gesteigerten Mengen an aktiver PaSOD in den Überexpressionsstämmen (*PaSod1-3_OEx*) keine verbesserte Resistenz gegenüber Paraquat erzielt werden. Darüber hinaus führt die Überexpression des Gens für die mitochondriale SOD, PaSOD3, zu massiven negativen Effekten.

4. Einfluss auf die Lebensspanne

Durch eine fehlende Entgiftung von Superoxid in den *PaSod*-Deletionsmutanten ist eine Verminderung der Lebensspanne nicht festzustellen. Bei *PaSod*-Mutantenstämme, die eine erhöhte PaSOD-Aktivität und damit eine gesteigerte Abbaurate des Superoxids aufweisen,

kann bei den *PaSod1*- und *PaSod2*-Überexpressionsstämmen keine verbesserte Lebensspanne unter den gewählten Standardbedingungen erzielt werden. Vielmehr noch ist die Lebensspanne der *PaSod3*-Überexpressionsstämme stark reduziert.

5. Einfluss der *PaSod*-Modulation auf andere Komponenten des ROS-Abbausystems

Die PaSOD-Aktivitäten scheinen miteinander co-reguliert zu werden. Des Weiteren scheint es ein Zusammenhang zwischen den beiden sekretierten Enzymen PaSOD2 und PaCATB zu geben. Deutlich wird auch, dass die Modulation der Superoxid-Dismutasen eine weitreichende Auswirkung auf andere Schutzsysteme hat. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Komponenten des mitochondrialen ROS-Schutzsystems und der Protein-Qualitätskontrolle in den *PaSod3*-Überexpressionsstämmen verändert sind.

Zusammenfassend lassen die Analysen der *PaSod*-modulierten Stämme den Schluss zu, dass die Superoxid-Dismutase in *P. anserina* ein wichtiges Enzym zum Abbau des schädlichen Superoxids darstellt, welches aber nur eine untergeordnete Rolle bei der Kontrolle der Lebensspanne unter den gewählten Wachstumsbedingungen im Labor ausübt. Des Weiteren haben die Analysen gezeigt, dass es durch die Modulation der *PaSod*-Gene zu weitreichenden Änderungen, die das ROS-Schutzsystem (PaSOD, PaCATB und PaPRX1) sowie die Protein-Qualitätskontrolle (PaHSP60, PaLON und PaCLPP) betreffen, kommt. Welche Auswirkung dabei diese Veränderungen in Bezug auf die Lebensspanne hat, kann nur schwer abgeschätzt werden und muss mit weiteren Untersuchungen geklärt werden.

9 Literaturverzeichnis

- Aguirre J und Lambeth J D (2010). Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1342-1353.
- Aguirre J, Rios-Momberg M, Hewitt D und Hansberg W (2005). Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13, 111-118.
- Amstad P, Moret R und Cerutti P (1994). Glutathione peroxidase compensates for the hypersensitivity of Cu,Zn-superoxide dismutase overproducers to oxidant stress. *J. Biol. Chem.* 269, 1606-1609.
- Amstad P, Peskin A, Shah G, Mirault M E, Moret R, Zbinden I und Cerutti P (1991). The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry* 30, 9305-9313.
- Archer D B und Peberdy J F (1997). The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit Rev. Biotechnol.* 17, 273-306.
- Averbeck N B, Borghouts C, Hamann A, Specke V und Osiewacz H D (2001). Molecular control of copper homeostasis in filamentous fungi: increased expression of a metallothionein gene during aging of *Podospora anserina*. *Mol. Gen. Genet.* 264, 604-612.
- Bannister J V, Bannister W H und Rotilio G (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *CRC Crit Rev. Biochem.* 22, 111-180.
- Barondeau D P, Kassmann C J, Bruns C K, Tainer J A und Getzoff E D (2004). Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* 43, 8038-8047.
- Bender T, Leidhold C, Ruppert T, Franken S und Voos W (2010). The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* 10, 1426-43.
- Benov L (2001). How superoxide radical damages the cell. *Protoplasma* 217, 33-36.
- Bernhardt D (2010) Diplomarbeit: Untersuchungen zur Rolle einer sekretierten Katalase im antioxidativen Schutzsystem des Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Bielski B H (1985). Fast kinetic studies of dioxygen-derived species and their metal complexes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 311, 473-482.
- Bilinski T, Krawiec Z, Liczmanski A und Litwinska J (1985). Is hydroxyl radical generated by the Fenton reaction in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 130, 533-539.
- 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.
- 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.
- Bradford M M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brouwer M, Hoexum B T, Grater W und Brown-Peterson N (2003). Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. *Biochem. J.* 374, 219-228.
- Brown-Peterson N J und Salin M L (1995). Purification and characterization of a mesohalic catalase from the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* 177, 378-384.

- Buettner G R, Ng C F, Wang M, Rodgers V G und Schafer F Q (2006). A new paradigm: manganese superoxide dismutase influences the production of H₂O₂ in cells and thereby their biological state. *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1338-1350.
- Cabreiro F, Ackerman D, Doonan R, Araiz C, Back P, Papp D, Braeckman B P und Gems D (2011). Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* 51, 1575-1582.
- Cai H und Harrison D G (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87, 840-844.
- Cano-Dominguez N, Varez-Delfin K, Hansberg W und Aguirre J (2008). NADPH Oxidases NOX-1 and NOX-2 Require the Regulatory Subunit NOR-1 To Control Cell Differentiation and Growth in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* 7, 1352-1361.
- Carlsson L M, Jonsson J, Edlund T und Marklund S L (1995). Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 6264-6268.
- Carol R J und Dolan L (2006). The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J. Exp. Bot.* 57, 1829-1834.
- Chance B, Sies H und Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59, 527-605.
- Chelikani P, Fita I und Loewen P C (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol. Life Sci.* 61, 192-208.
- Claros M G und Vincens P (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* 241, 779-786.
- Crocker P R und Feizi T (1996). Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell-cell interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 679-691.
- Culotta V C, Klomp L W, Strain J, Casareno R L, Krems B und Gitlin J D (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 272, 23469-23472.
- Culotta V C, Yang M und O'Halloran T V (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 747-758.
- Doonan R, McElwee J J, Matthijssens F, Walker G A, Houthoofd K, Back P, Matscheski A, Vanfleteren J R und Gems D (2008). Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 22, 3236-3241.
- Dreher D und Junod A F (1995). Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 162, 147-153.
- Droeg W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Duttaroy A, Paul A, Kundu M und Belton A (2003). A *Sod2* null mutation confers severely reduced adult life span in *Drosophila*. *Genetics* 165, 2295-2299.
- Elchuri S, Oberley T D, Qi W, Eisenstein R S, Jackson R L, Van Remmen H, Epstein C J und Huang, T T (2005). CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24, 367-380.
- Elroy-Stein O, Bernstein Y und Groner Y (1986). Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation. *EMBO J.* 5, 615-622.
- Esser K (1974). *Podospora anserina*. King R C (eds), *Handbook of Genetics*, Plenum Press, 531-551.

- Esser K und Tudzynski P (1980). Senescence in Fungi. Thimann K V (eds), Senescence in Plants, CRC Press, 67-83.
- Esser K und Keller W (1976). Genes inhibiting senescence in the ascomycete *Podospira anserina*. Mol. Gen. Genet. 144, 107-110.
- Esser K, Kück U, Lang-Hinrichs C, Lemke P A, Osiewacz H D, Stahl U und Tudzynski P (1986). Plasmids of Eukaryotes. Fundamentals and Applications, Springer.
- Fabrizio P, Pletcher S D, Minois N, Vaupel J W und Longo V D (2004). Chronological aging-independent replicative life span regulation by Msn2/Msn4 and Sod2 in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 557, 136-142.
- Farr S B und Kogoma T (1991). Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol. Rev. 55, 561-585.
- Fattman C L, Chu C T, Kulich S M, Enghild J J und Oury T D (2001). Altered expression of extracellular superoxide dismutase in mouse lung after bleomycin treatment. Free Radic. Biol. Med. 31, 1198-1207.
- Feder M E und Hofmann G E (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61, 243-282.
- Fenton H J H (1894). Oxidation of tartaric acid in presence of iron. J. Chem. Soc. 65, 899-910.
- Finkel T (2003). Oxidant signals and oxidative stress. Curr. Opin. Cell Biol. 15, 247-254.
- Fleming I und Busse R (2001). Vascular cytochrome P450 in the regulation of renal function and vascular tone: EDHF, superoxide anions and blood pressure. Nephrol. Dial. Transplant. 16, 1309-1311.
- Florence T M (1990). Free radicals, antioxidants and cancer prevention. Proc. Nutr. Soc. Aust. Annu. Conf. 15, 88-93.
- Fraaije M W, Roubroeks H P, Hagen W R und Van Berkel W J (1996). Purification and characterization of an intracellular catalase-peroxidase from *Penicillium simplicissimum*. Eur. J. Biochem. 235, 192-198.
- Fridovich I (1986). Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biochem. Biophys. 247, 1-11.
- Fujii M, Ishii N, Joguchi A, Yasuda K und Ayusawa D (1998). A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *Caenorhabditis elegans*. DNA Res. 5, 25-30.
- Gallagher D S, Gibbs L S, Shaffer J B und Womack J E (1992). Somatic cell mapping of bovine EC-SOD and SOD1L loci. Genomics 12, 610-612.
- Grief J (2007) Dissertation: Untersuchungen zur molekularen Kontrolle der Kupferhomöostase in dem Ascomyceten *Podospira anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Groebe K, Krause F, Kunstmann B, Unterluggauer H, Reifschneider N H, Scheckhuber C Q, Sastri C, Stegmann W, Wozny W, Schwall G P, Poznanović S, Dencher N A, Jansen-Dürr P, Osiewacz H D, Schratzenholz A (2007). Differential proteomic profiling of mitochondria from *Podospira anserina*, rat and human reveals distinct patterns of age-related oxidative changes. Exp. Gerontol. 42, 887-898.
- Haber F und Weiss J (1932). On the catalysis of hydroperoxide. Naturwissenschaften 20, 948-950.
- Halliwell B (1978). Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Its role in degradation of hyaluronic acid by a superoxide-generating system. FEBS Lett. 96, 238-242.
- Halliwell B. und Gutteridge J M (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. Arch. Biochem. Biophys. 246, 501-514.

- Hamann A, Brust D und Osiewacz H D (2007). Deletion of putative apoptosis factors leads to lifespan extension in the fungal ageing model *Podospora anserina*. Mol. Microbiol. 65, 948-958.
- Hamann A, Brust D und Osiewacz H D (2008). Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. Trends Microbiol. 16, 276-283.
- 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. 48, 270-275.
- Han D, Canali R, Rettori D und Kaplowitz N (2003). Effect of glutathione depletion on sites and topology of superoxide and hydrogen peroxide production in mitochondria. Mol. Pharmacol. 64, 1136-1144.
- Han D, Williams E und Cadenas E (2001). Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. Biochem. J. 353, 411-416.
- Harman D (1956). A theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol. 11, 298-300.
- Harman D (1972). The biologic clock: the mitochondria? J. Am. Geriatr. Soc. 20, 145-147.
- Harris N, Bachler M, Costa V, Mollapour M, Moradas-Ferreira P und Piper P W (2005). Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu²⁺-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase. Aging Cell 4, 41-52.
- Hjalmarsson K, Marklund S L, Engstrom A und Edlund T (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 6340-6344.
- Horton P und Nakai K (1997). Better prediction of protein cellular localisation sites with the *k* nearest neighbors classifier. Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. 5, 147-152.
- Huang P, Feng L, Oldham E A, Keating M J und Plunkett W (2000). Superoxide dismutase as a target for the selective killing of cancer cells. Nature 407, 390-395.
- Hwang C S, Rhie G, Kim S T, Kim Y R, Huh W K, Baek Y U und Kang S O (1999). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. Biochim. Biophys. Acta 1427, 245-255.
- Hwang C S, Rhie G E, Oh J H, Huh W K, Yim H S und Kang S O (2002). Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. Microbiology 148, 3705-3713.
- Imlay J A und Fridovich I (1991). Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 266, 6957-6965.
- Jensen L T und Culotta V C (2005). Activation of CuZn superoxide dismutases from *Caenorhabditis elegans* does not require the copper chaperone CCS. J. Biol. Chem. 280, 41373-41379.
- Kant S (2009) Diplomarbeit: Funktionsanalyse von IDI-1 in dem Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Keele B B, McCord J M und Fridovich I (1970). Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme. J. Biol. Chem. 245, 6176-6181.
- Kim K H, Rodriguez A M, Carrico P M und Melendez J A (2001). Potential mechanisms for the inhibition of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. Antioxid. Redox. Signal. 3, 361-373.
- Kimpel E (1999) Dissertation: Die genetische Kontrolle biologischen Alterns: Untersuchungen zur Rolle von Gerontogen GR1SEA des Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

- Kirby K, Hu J, Hilliker A J und Phillips J P (2002). RNA interference-mediated silencing of *Sod2* in *Drosophila* leads to early adult-onset mortality and elevated endogenous oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16162-16167.
- Kirkwood T B und Austad S N (2000). Why do we age? *Nature* 408, 233-238.
- Kowald A, Hamann A, Zintel S, Ullrich S, Klipp E und Osiewacz H D (2012). A systems biological analysis links ROS metabolism to mitochondrial protein quality control. *Mech. Ageing Dev.* 133, 331-337.
- Kowald A und Klipp E (2004). Alternative pathways might mediate toxicity of high concentrations of superoxide dismutase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1019, 370-374.
- Kowald A, Lehrach H und Klipp E (2006). Alternative pathways as mechanism for the negative effects associated with overexpression of superoxide dismutase. *J. Theor. Biol.* 238, 828-840.
- Kwan W P und Voelker B M (2003). Rates of hydroxyl radical generation and organic compound oxidation in mineral-catalyzed Fenton-like systems. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1150-1158.
- Lamarre C, LeMay J D, Deslauriers N und Bourbonnais Y (2001). *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *J. Biol. Chem.* 276, 43784-43791.
- Lambeth J D (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 181-189.
- Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N und Latge J P (2010). Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol. Microbiol.* 75, 910-923.
- Lapointe J und Hekimi S (2010). When a theory of aging ages badly. *Cell Mol. Life Sci.* 67, 1-8.
- Lardy B, Bof M, Aubry L, Palet M H, Morel F, Satre M und Klein G (2005). NADPH oxidase homologs are required for normal cell differentiation and morphogenesis in *Dictyostelium discoideum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1744, 199-212.
- Larsen P L (1993). Aging and resistance to oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8905-8909.
- Lebovitz R M, Zhang H, Vogel H, Cartwright J, Dionne L, Lu N, Huang S und Matzuk M M (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9782-9787.
- Lecellier G und Silar P (1994). Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr. Genet.* 25, 122-123.
- Li S, Yan T, Yang J Q, Oberley T D und Oberley L W (2000). The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 60, 3927-3939.
- Li Y, Huang T T, Carlson E J, Melov S, Ursell P C, Olson J L, Noble L J, Yoshimura M P, Berger C und Chan P H (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* 11, 376-381.
- Lindquist S (1986). The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- Loew O (1900). A New Enzyme of General Occurrence in Organisms. *Science* 11, 701-702.
- Longo V D, Gralla E B und Valentine J S (1996). Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *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.

- Luce K, Weil A C und Osiewacz H D (2010). Mitochondrial Protein Quality Control Systems in Aging and Disease. Tavernarakis N (eds), Protein metabolism and homeostasis in aging, Springer Science+Business Media 108-125.
- Lynch R E und Fridovich I (1978). Permeation of the erythrocyte stroma by superoxide radical. J. Biol. Chem. 253, 4697-4699.
- Madeo F, Herker E, Maldener C, Wissing S, Lächelt S, Herlan M, Fehr M, Lauber K, Sigrist S J, Wesselborg S, Fröhlich KU (2002). A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. Mol. Cell 9, 911-917.
- 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.
- Mao G D und Poznansky M J (1992). Electron spin resonance study on the permeability of superoxide radicals in lipid bilayers and biological membranes. FEBS Lett. 305, 233-236.
- Marcou D (1961). Notion de longevité et nature cytoplasmique du déterminant de sénescence chez quelques champignons. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 12, 653-764.
- Marklund S L (1984). Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissues from nine mammalian species. Biochem. J. 222, 649-655.
- Martchenko M, Alarco A M, Harcus D und Whiteway M (2004). Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. Mol. Biol. Cell 15, 456-467.
- Martino E, Franco B, Piccoli G, Stocchi V und Perotto S (2002). Influence of zinc ions on protein secretion in a heavy metal tolerant strain of the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius*. Mol. Cell Biochem. 231, 179-185.
- Massey V, Strickland S, Mayhew S G, Howell L G, Engel P C, Matthews R G, Schuman M und Sullivan P A (1969). The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 891-897.
- McCord J M und Day E D (1978). Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. FEBS Lett. 86, 139-142.
- McCord J M und Fridovich I (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. J. Biol. Chem. 244, 6049-6055.
- Medvedev Z A (1990). An attempt at a rational classification of theories of ageing. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 65, 375-398.
- Mehler A H (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. Arch. Biochem. Biophys. 34, 339-351.
- Mehler A H und Brown A H (1952). Studies on reactions of illuminated chloroplasts. III. Simultaneous photoproduction and consumption of oxygen studied with oxygen isotopes. Arch. Biochem. Biophys. 38, 365-370.
- Meneshian A und Bulkley G B (2002). The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. Microcirculation. 9, 161-175.
- Michelson A M (1977). Toxic effects of active oxygen. Hayaishi O und Asada K (eds), Biochemical and medical aspects of active oxygen, University Park Press 155-168.
- Miwa S und Brand M D (2005). The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 1709, 214-219.

- Miwa S, St-Pierre J, Partridge L und Brand M D (2003). Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 938-948.
- Mockett R J, Orr W C, Rahmandar J J, Benes J J, Radyuk S N, Klichko V I und Sohal R S (1999). Overexpression of Mn-containing superoxide dismutase in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* 371, 260-269.
- Muller F L, Liu Y und Van Remmen H (2004). Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 279, 49064-49073.
- Muller F L, Song W, Jang Y C, Liu Y, Sabia M, Richardson A und Van Remmen H (2007). Denervation-induced skeletal muscle atrophy is associated with increased mitochondrial ROS production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, 1159-1168.
- Müller-Ohldach M (2007) Diplomarbeit: Charakterisierung der Poly(ADP-Ribose)Polymerase bei degenerativen Prozessen des Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Müller-Ohldach M, Brust D, Hamann A und Osiewacz H D (2011). Overexpression of *PaParp* encoding the poly(ADP-ribose) polymerase of *Podospora anserina* affects organismal aging. *Mech. Ageing Dev.* 132, 33-42.
- Munkres K D (1990). Purification of exocellular superoxide dismutases. *Methods Enzymol.* 186, 249-260.
- Munkres K D (1990). Histochemical detection of superoxide radicals and hydrogen peroxide by *Age-1* mutants of *Neurospora*. *Fungal. Genet. Newsl.* 37,24-24.
- Munkres K D (1992). Selection and analysis of superoxide dismutase mutants of *Neurospora*. *Free Rad. Biol. & Med.* 13, 305-318.
- Okado-Matsumoto A und Fridovich I (2001). Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276, 38388-38393.
- Orr W C, Mockett R J, Benes J J und Sohal R S (2003). Effects of overexpression of copper-zinc and manganese superoxide dismutases, catalase, and thioredoxin reductase genes on longevity in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.* 278, 26418-26422.
- Orr W C und Sohal R S (1993). Effects of Cu-Zn superoxide dismutase overexpression of life span and resistance to oxidative stress in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Arch. Biochem. Biophys.* 301, 34-40.
- Osiewacz H D, Hamann A und Zintel S (im Druck). Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Galluzzi L et al. (eds), *Cell Senescence: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology 965, Springer Science+Business Media. DOI 10.1007/978-1-62703-239-1_30.
- Osiewacz H D (2002). Aging in fungi: role of mitochondria in *Podospora anserina*. *Mech. Ageing Dev.* 123, 755-764.
- 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.
- Oury T D, Day B J und Crapo J D (1996). Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 957-965.
- Pérez V I, Bokov A, Van Remmen H, Mele J, Ran Q, Ikeno Y und Richardson A (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1005-1014.
- Pfaffl M W (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

- Phillips J P, Campbell S D, Michaud D, Charbonneau M und Hilliker A J (1989). Null mutation of copper/zinc superoxide dismutase in *Drosophila* confers hypersensitivity to paraquat and reduced longevity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 86, 2761-2765.
- Phillips J P, Parkes T L und Hilliker A J (2000). Targeted neuronal gene expression and longevity in *Drosophila*. Exp. Gerontol. 35, 1157-1164.
- Pryor W A (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Annu. Rev. Physiol. 48, 657-667.
- 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.
- Rae T D, Torres A S, Pufahl R A und O'Halloran T V (2001). Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. J. Biol. Chem. 276, 5166-5176.
- Ravindranath S D und Fridovich I (1975). Isolation and characterization of a manganese-containing superoxide dismutase from yeast. J. Biol. Chem. 250, 6107-6112.
- Regelsberger G, Atzenhofer W, Ruker F, Peschek G A, Jakopitsch C, Paumann M, Furtmüller P G und Obinger C (2002). Biochemical characterization of a membrane-bound manganese-containing superoxide dismutase from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. J. Biol. Chem. 277, 43615-43622.
- Reveillaud I, Niedzwiecki A, Bensch K G und Fleming J E (1991). Expression of bovine superoxide dismutase in *Drosophila melanogaster* augments resistance of oxidative stress. Mol. Cell Biol. 11, 632-640.
- Ritossa F (1996). Discovery of the heat shock response. Cell Stress. Chaperones. 1, 97-98.
- Rizet G (1953). Sur l'impossibilité d'obtenir la multiplication végétative ininterrompue illimitée de l'ascomycète *Podospira anserina*. C. R. Acad. Sci. Paris 237, 838-855.
- Rocha E R und Smith C J (1997). Regulation of *Bacteriodes fragilis katB* mRNA by oxidative stress and carbon limitation. J. Bacteriol. 179, 7033-7039.
- Rodriguez A M, Carrico P M, Mazurkiewicz J E und Melendez J A (2000). Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H₂O₂. Free Radic. Biol. Med. 29, 801-813.
- Ross D und Moldeus P (1991). Antioxidant defence systems and oxidative stress. Pelfrey V (eds), Membrane Lipid Oxidation, CRC Press, FL, 151-170.
- Sanz A, Fernandez-Ayala D J, Stefanatos R K und Jacobs H T (2010). Mitochondrial ROS production correlates with, but does not directly regulate lifespan in *Drosophila*. Aging (Albany. NY) 2, 200-223.
- Sawyer D T und Valentine J S (1981). How Super Is Superoxide. Accounts of Chemical Research 14, 393-400.
- Scandalios J G (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. Braz. J. Med. Biol. Res. 38, 995-1014.
- Scheckhuber C Q, Erjavec N, Tinazli A, Hamann A, Nyström T und Osiewacz H D (2007). Reducing mitochondrial fission results in increased life span and fitness of two fungal ageing models. Nat. Cell Biol. 9, 99-105.
- Scheckhuber C Q und Osiewacz H D (2008). *Podospira anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing. Mol. Genet. Genomics 280, 365-374.

- Schriner S E, Linford N J, Martin G M, Treuting P, Ogburn C E, Emond M, Coskun P E, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, Wallace D C und Rabinovitch P S (2005). Extension of murine lifespan by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308,1909-1911.
- Schwitalla D (2007) Diplomarbeit: Rolle der Superoxid-Dismutasen PaSOD1, PaSOD2 und PaSOD3 bei Alterungsprozessen im Ascomyceten *Podospora anserina*. Fachbereich Biowissenschaften, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.
- Scott M D, Meshnick S R und Eaton J W (1987). Superoxide dismutase-rich bacteria. Paradoxical increase in oxidant toxicity. *J. Biol. Chem.* 262, 3640-3645.
- Seaver L C und Imlay J A (2001). Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 7182-7189.
- Seto N O, Hayashi S und Tener G M (1990). Overexpression of Cu-Zn superoxide dismutase in *Drosophila* does not affect life-span. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 4270-4274.
- Sies H und Stahl W (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1315S-1321S.
- Singh A (1982). Chemical and biochemical aspects of superoxide radicals and related species of activated oxygen. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60, 1330-1345.
- St-Pierre J, Buckingham J A, Roebuck S J und Brand M D (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784-44790.
- Storz G und Imlay J A (1999). Oxidative stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 188-194.
- Stralin P, Karlsson K, Johansson B O und Marklund S L (1995). The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 2032-2036.
- 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.
- Sturtz L A, Diekert K, Jensen L T, Lill R und Culotta V C (2001). A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276, 38084-38089.
- Sun J, Folk D, Bradley T J und Tower J (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161, 661-672.
- Sun J und Tower J (1999). FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol. Cell. Biol.* 19, 216-228.
- Tanaka A, Christensen M J, Takemoto D, Park P und Scott B (2006). Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic association. *Plant Cell* 18, 1052-1066.
- Terzenbach D P und Blaut M (1998). Purification and characterization of a catalase from the nonsulfur phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* ATH 2.4.1 and its role in the oxidative stress response. *Arch. Microbiol.* 169, 503-508.
- Unlu E S und Koc A (2007). Effects of deleting mitochondrial antioxidant genes on life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1100, 505-509.
- Valentine J S, Mikszta A Z und Sawyer D T (1984). Methods for the study of superoxide chemistry in nonaqueous solutions. *Methods Enzymol.* 105, 71-81.
- Van Raamsdonk J M und Hekimi S (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase *sod-2* extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS. Genet.* 5, e1000361.

- Van Raamsdonk J M und Hekimi S (2012). Superoxide dismutase is dispensable for normal animal lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 5785-5790.
- Van Remmen H, Ikeno Y, Hamilton M, Pahlavani M, Wolf N, Thorpe S R, Alderson N L, Baynes J W, Epstein C J, Huang T T, Nelson J, Strong R und Richardson A (2003). Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol. Genomics* 16, 29-37.
- Van Remmen H, Salvador C, Yang H, Huang T T, Epstein C J und Richardson A (1999). Characterization of the antioxidant status of the heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mouse. *Arch. Biochem. Biophys.* 363, 91-97.
- Venkataraman S, Jiang X, Weydert C, Zhang Y, Zhang H J, Goswami P C, Ritchie J M, Oberley L W und Buettner G R (2005). Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. *Oncogene* 24, 77-89.
- Venkataraman S, Wagner B A, Jiang X, Wang H P, Schafer F Q, Ritchie J M, Patrick B C, Oberley L W und Buettner G R (2004). Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes the survival of prostate cancer cells exposed to hyperthermia. *Free Radic. Res.* 38, 1119-1132.
- Wawryn J, Krzepilko A, Myszk A und Bilinski T (1999). Deficiency in superoxide dismutases shortens life span of yeast cells. *Acta Biochim. Pol.* 46, 249-253.
- Wenzel P, Schuhmacher S, Kienhöfer J, Müller J, Hortmann M, Oelze M, Schulz E, Treiber N, Kawamoto T, Scharffetter-Kochanek K, Münzel T, Bürkle A, Bachschmid M M, Daiber A (2008). Manganese superoxide dismutase and aldehyde dehydrogenase deficiency increase mitochondrial oxidative stress and aggravate age-dependent vascular dysfunction. *Cardiovasc. Res.* 80, 280-289.
- Yang C C, Ma M C, Chien C T, Wu M S, Sun W K und Chen C F (2007). Hypoxic preconditioning attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat kidneys. *J. Physiol.* 582, 407-419.
- Yost F J und Fridovich I (1973). An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 248, 4905-4908.
- Zamocky M, Furtmuller P G und Obinger C (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxid. Redox. Signal.* 10, 1527-1548.
- Zhang H J, Zhao W, Venkataraman S, Robbins M E, Buettner G R, Kregel K C und Oberley L W (2002). Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 277, 20919-20926.
- Zintel S, Bernhardt D, Rogowska-Wrzesinska A und Osiewacz H D (2011). PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. *Aging (Albany. NY)* 3, 768-781.
- Zintel S, Schwitalla D, Luce K, Hamann A und Osiewacz H D (2010). Increasing mitochondrial superoxide dismutase abundance leads to impairments in protein quality control and ROS scavenging systems and to lifespan shortening. *Exp. Gerontol.* 45, 525-532.

10 Anhang

10.1 Ergänzende Abbildungen

Southern Blot-Analysen zur Identifizierung der *PaSod1*-Mutantenstämme

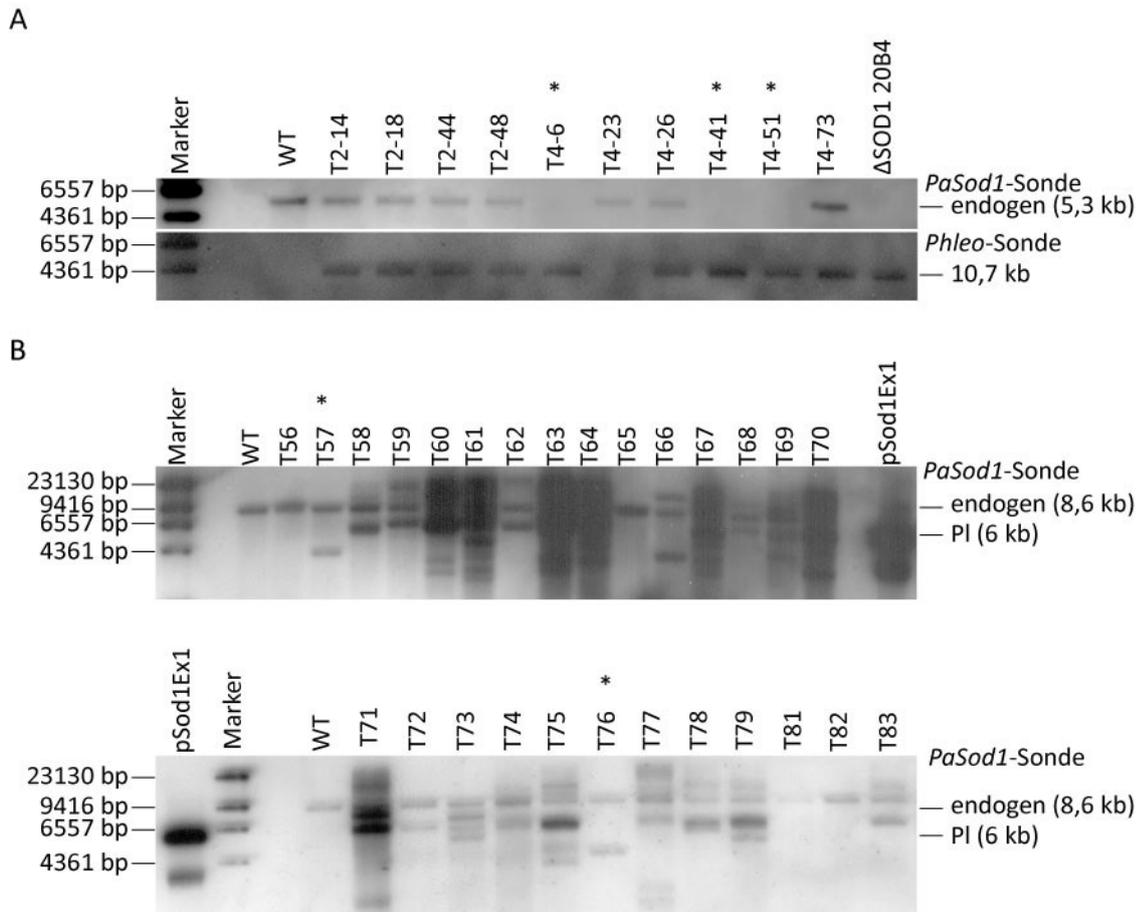


Abb. S1: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung der *PaSod1*-Mutantenstämme. 500 ng genomische DNA des Wildtyps und der putativen *PaSod1*-Mutantenstämme wurden mit *Hind*III bzw. mit *Bam*HI geschnitten. Als Kontrolle wurden entweder 5 ng Cosmid-DNA (SOD1 20B4) oder 5 ng Plasmid-DNA (pSod1Ex1) verdaut. Die DNA-Proben wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard dienten 5 μ L λ -*Hind*III-Marker und 1,5 μ L DIG-markierter λ -*Hind*III-Marker. **A** Identifikation der *PaSod1*-Deletionsstämme: Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod1*-Sonde führt bei *Hind*III-verdauter genomischer Wildtyp-DNA zu einem 5,3 kb großen Fragment (endogen) und mit einer DIG-markierten *Phleo*-Sonde zu einem 10,7 kb großen Fragment. Mit * sind die Transformanten gekennzeichnet, die eine *PaSod1*-Deletion aufweisen. **B** Analyse der *PaSod1*-Überexpressionsstämme: Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod1*-Sonde führt bei *Bam*HI-verdauter genomischer Wildtyp-DNA zu einem 8,6 kb großen Fragment (endogen) und bei *Bam*HI-verdautem Plasmid pSod1Ex1 zu einem 6 kb großen Fragment durch die Linearisierung des Plasmids. Eine korrekt und vollständig integrierte Überexpressionskassette führt zu einer zusätzlichen Band von mindestens 1,4 kb. Mit * sind die Transformanten gekennzeichnet, die eine Einzelintegration aufweisen. PI=Plasmid-DNA.

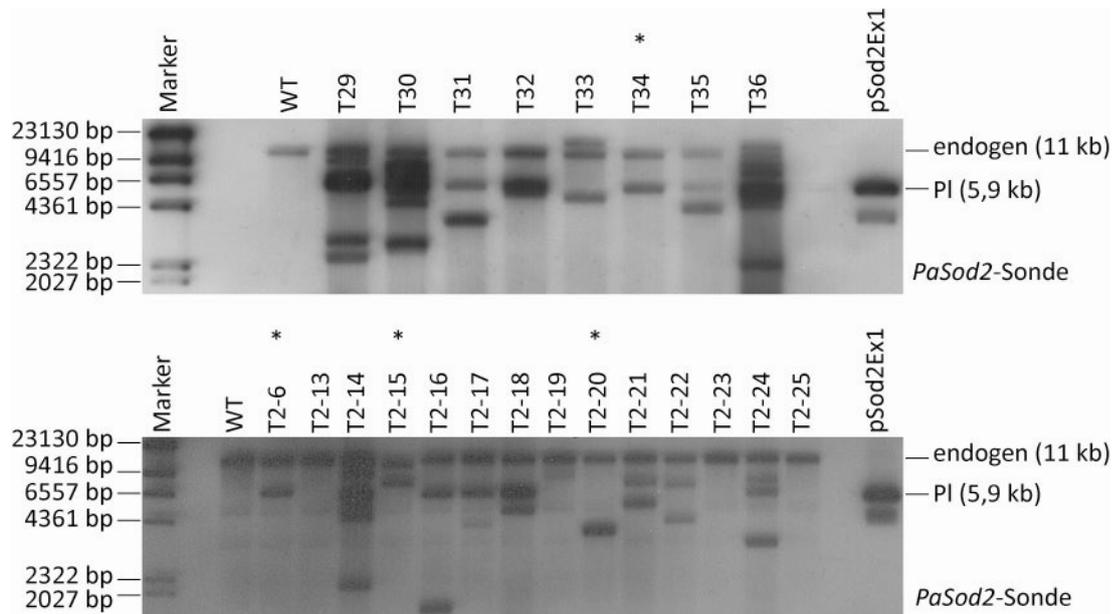


Abb. S2: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung der *PaSod2*-Überexpressionstransformanten. 5 ng Plasmid pSod2Ex1 sowie 500 ng genomische DNA des Wildtyps und der putativen *PaSod2*-Überexpressionstransformanten wurden mit *Hind*III geschnitten. Die DNA-Proben wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod2*-Sonde führt bei *Hind*III-verdauter genomischer Wildtyp-DNA zu einem 11 kb großen Fragment (endogen) und bei *Hind*III-verdautem Plasmid pSod2Ex1 zu einem 5,9 kb großen Fragment. Als Größenstandard dienen 5 μ L λ -*Hind*III-Marker und 1,5 μ L DIG-markierter λ -*Hind*III-Marker. Eine korrekt und vollständig integrierte *PaSod2*-Überexpressionskassette führt zu einer zusätzlichen Band von mindestens 1,9 kb. Mit * sind die Transformanten gekennzeichnet, die eine Einzelintegration aufweisen. PI=Plasmid-DNA.

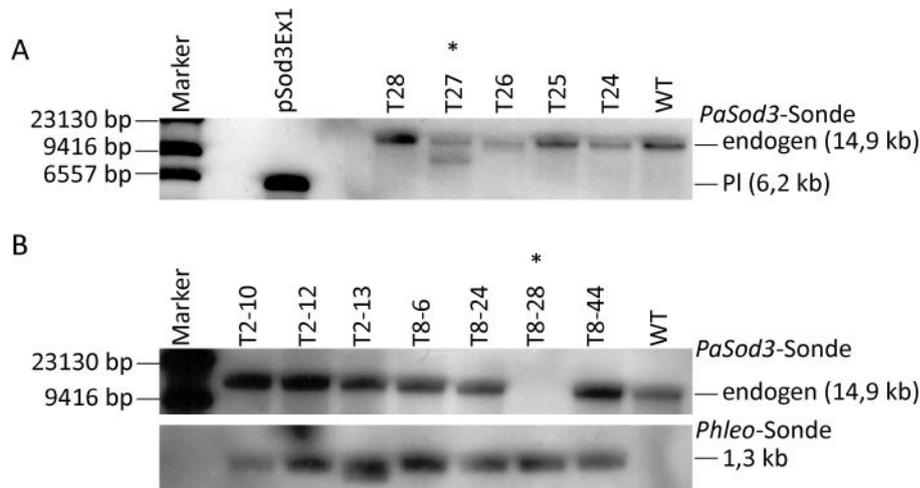


Abb. S23: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod3*-Deletions- und Überexpressionsstammes. 500 bis 700 ng genomische DNA des Wildtyps und der putativen *PaSod3*-Mutantenstämme wurden mit *Bam*HI geschnitten. Die DNA-Proben wurden in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard dienten 5 μ L λ -*Hind*III-Marker und 1,5 μ L DIG-markierter λ -*Hind*III-Marker. **A** Analyse des *PaSod3*-Überexpressionsstammes: Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod3*-Sonde führt bei *Bam*HI-verdauter genomischer Wildtyp-DNA zu einem 14,9 kb großes Fragment (endogen). Als Kontrolle wurden 5 ng Pasmid-DNA (pSod3Ex1) verdaut. Durch die Hybridisierung der *PaSod3*-Sonde wird ein 6,2 kb großes Fragment detektiert. Eine korrekt und vollständig integrierte *PaSod3*-Überexpressionskassette führt zu einer zusätzlichen Band von mindestens 1,5 kb. Mit * ist der Transformant T27 gekennzeichnet, der eine Einzelintegration aufweist. **B** Analyse des *PaSod3*-Deletionsstammes: Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod3*-Sonde bzw. *Phleo*-Sonde führt bei *Bam*HI-verdauter genomischer Wildtyp-DNA zu einem 14,9 kb bps großen Fragment und 1,3 kb großen Fragment. Mit * ist der *PaSod3*-Deletionstransformant T8-28 gekennzeichnet, der eine Deletion des *PaSod3*-Gens aufweist. PI=Plasmid-DNA.

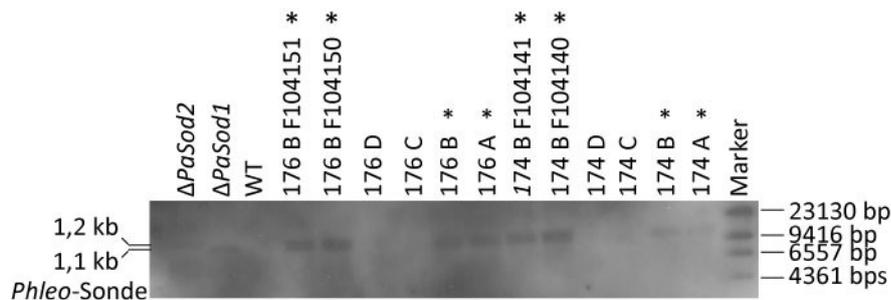


Abb. S4: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/2*-Deletionsstammes. Aus einer Kreuzung der Deletionsstämme Δ *PaSod1* und Δ *PaSod2* wurden 4-sporige Asci isoliert. Die putativen Doppeldeletionsstämme wurden durch eine Southern Blot-Analyse untersucht. Je 1,5 μ g genomische DNA des Wildtyps (WT), der putativen Δ *PaSod1/2*-Stämme, sowie je zwei Sekundärtransformanten wurden mit *Hind*III geschnitten, in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Kontrolle wurde ebenfalls die genomische DNA der Einzeldelentionsstämme (Δ *PaSod1* und Δ *PaSod2*) verdaut und aufgetragen. 1,5 μ L DIG-markierter λ -*Hind*III-Marker dienten als Größenstandard. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *Phleo*-Sonde führt bei einer *PaSod1/2*-Doppeldeletion zu zwei Fragmenten, 1,1 kb (*PaSod1*-Deletionskassette) und 1,2 kb (*PaSod2*-Deletionskassette). Mit * sind die Ascisporen gekennzeichnet, die eine Doppeldeletion (Δ *PaSod1/2*) aufweisen. PI=Plasmid-DNA.

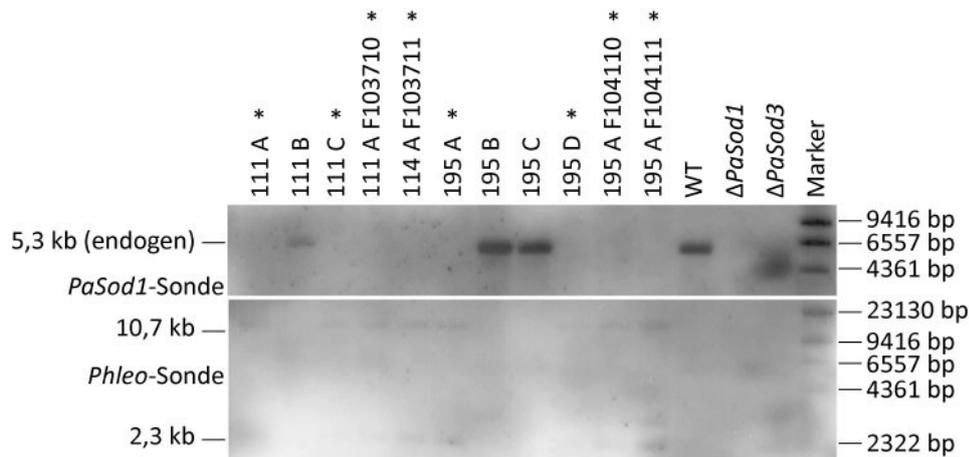


Abb. S5: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/3*-Deletionsstammes. Aus einer Kreuzung der Deletionsstämme $\Delta PaSod1$ und $\Delta PaSod3$ wurden 4-sporige Asci isoliert. Die putativen Doppeldelentionsstämme wurden durch eine Southern Blot-Analyse untersucht. Je 1,5 μ g genomische DNA des Wildtyps (WT), der putativen $\Delta PaSod1/3$ -Stämme, sowie je zwei Sekundärtransformanten wurden mit *HindIII* geschnitten, in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Kontrolle wurde ebenfalls die genomische DNA der Einzeldelentionsstämme ($\Delta PaSod1$ und $\Delta PaSod3$) verdaut und aufgetragen. 1,5 μ L DIG-markierter λ -*HindIII*-Marker dienten als Größenstandard. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod1*-Sonde führt bei Wildtyp-DNA zu einem 5,3 kb großen Fragment (endogen), währenddessen die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *Phleo*-Sonde bei einer *PaSod1/3*-Doppeldelention zu Fragmenten von 10,7 kb (*PaSod1*-Deletionskassette) und 2,3 kb (*PaSod3*-Deletionskassette) führt. Mit * sind die Sporen gekennzeichnet, die eine Doppeldelention ($\Delta PaSod1/3$) aufweisen. Pl=Plasmid-DNA.

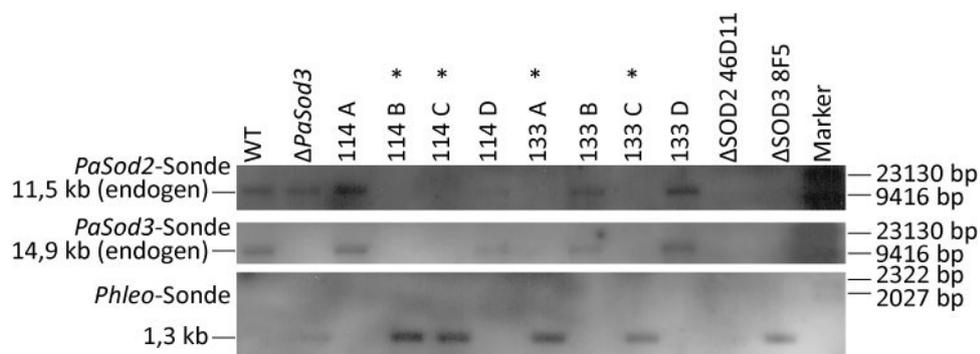


Abb. S6: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod2/3*-Deletionsstammes. Aus einer Kreuzung der Deletionsstämme $\Delta PaSod2$ und $\Delta PaSod3$ wurden 4-sporige Asci isoliert. Die putativen Doppeldelentionsstämme wurden durch eine Southern Blot-Analyse untersucht. Je 500 ng genomische DNA des Wildtyps (WT), der putativen $\Delta PaSod2/3$ -Stämme, sowie die beiden Deletionscosmide ($\Delta SOD2$ 46D11 und $\Delta SOD3$ 8F5) und der *PaSod3*-Deletionsstamm ($\Delta PaSod3$) zur Kontrolle wurden mit *BamHI* geschnitten, in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard dienten 1,5 μ L DIG-markierter λ -*HindIII*-Marker. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod2*-Sonde führt bei Wildtyp-DNA zu einem 11,5 kb großes Fragment (endogen), währenddessen die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *PaSod3*-Sonde zu einem 14,9 kb Fragment (endogen) führt. Die Fragmente der Deletionskassetten des *PaSod2/3*-Deletionsstammes, die mit einer *Phleo*-Sonde hybridisieren liegen bei 1,3 kb. Mit * sind die Sporen gekennzeichnet, die eine Doppeldelention ($\Delta PaSod2/3$) aufweisen. Pl=Plasmid-DNA.

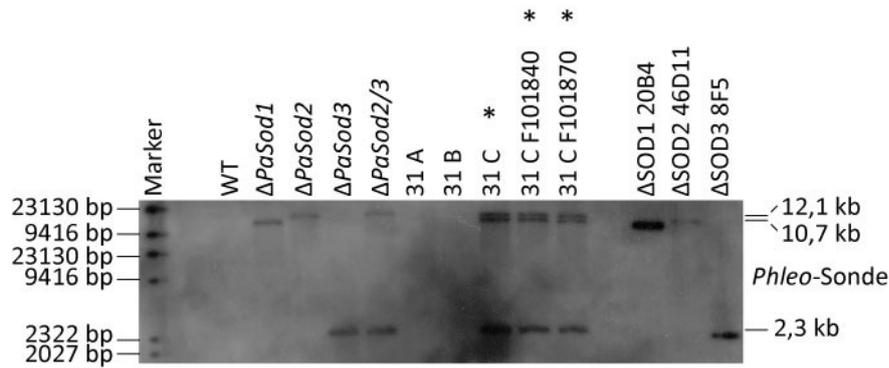


Abb. S7: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/2/3*-Deletionsstammes. Aus einer Kreuzung der Deletionsstämme $\Delta PaSod1$ und $\Delta PaSod2/3$ wurden 4-sporige Asci isoliert. Die putativen *PaSod1/2/3*-Deletionsstämme wurden durch eine Southern Blot-Analyse untersucht. Je 500 ng genomische DNA des Wildtyps (WT), der putativen $\Delta PaSod1/2/3$ -Stämme und zwei ihrer Nachkommen, sowie die Deletionsstämme ($\Delta Sod1-3$ und $\Delta PaSod2/3$) wurden mit *HindIII* geschnitten, in einem 1 %igen TAE-Agarosegel elektrophoretisch bei 80 V 90 min aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Größenstandard dienten 1,5 μ L DIG-markierter λ -*HindIII*-Marker. Die Hybridisierung mit einer DIG-markierten *Phleo*-Sonde führt bei einer Deletion aller drei *PaSods* zu drei Fragmenten: 10,7 kb (*PaSod1*-Deletionskassette), 12,1 kb (*PaSod2*-Deletionskassette) und 2,3 kb (*PaSod3*-Deletionskassette). Mit * sind die Sporen gekennzeichnet, die eine *PaSod1/2/3*-Deletion aufweisen. PI=Plasmid-DNA.

Oxyblot-Analysen zur Ermittlung der oxidativ-geschädigten Proteinmengen

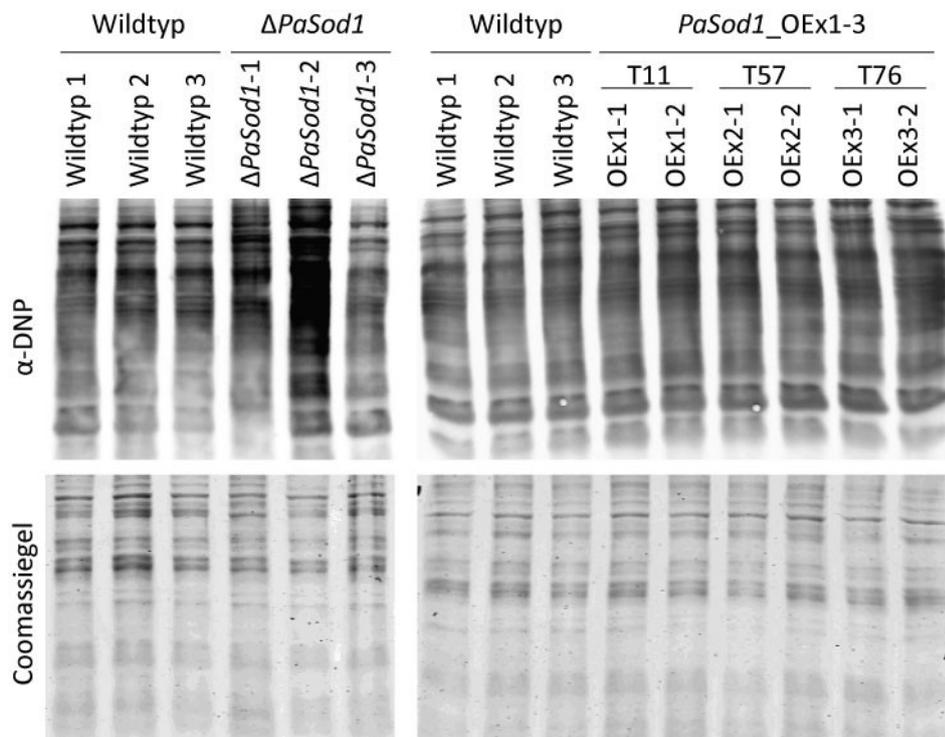


Abb. S8: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod1*-Mutantenstämmen. Western Blot-Analyse von 10 μ g Gesamtproteinextrakt aus mittelalten *PaSod1*-Deletions- und Überexpressionsstämmen sowie von *P. anserina* Wildtypen. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran wurde das Polyacrylamidgel zur Kontrolle einer gleichartigen Beladung mit Coomassie gefärbt. Zur Detektion der carbonylierten Proteine diente der Antikörper α -DNP.

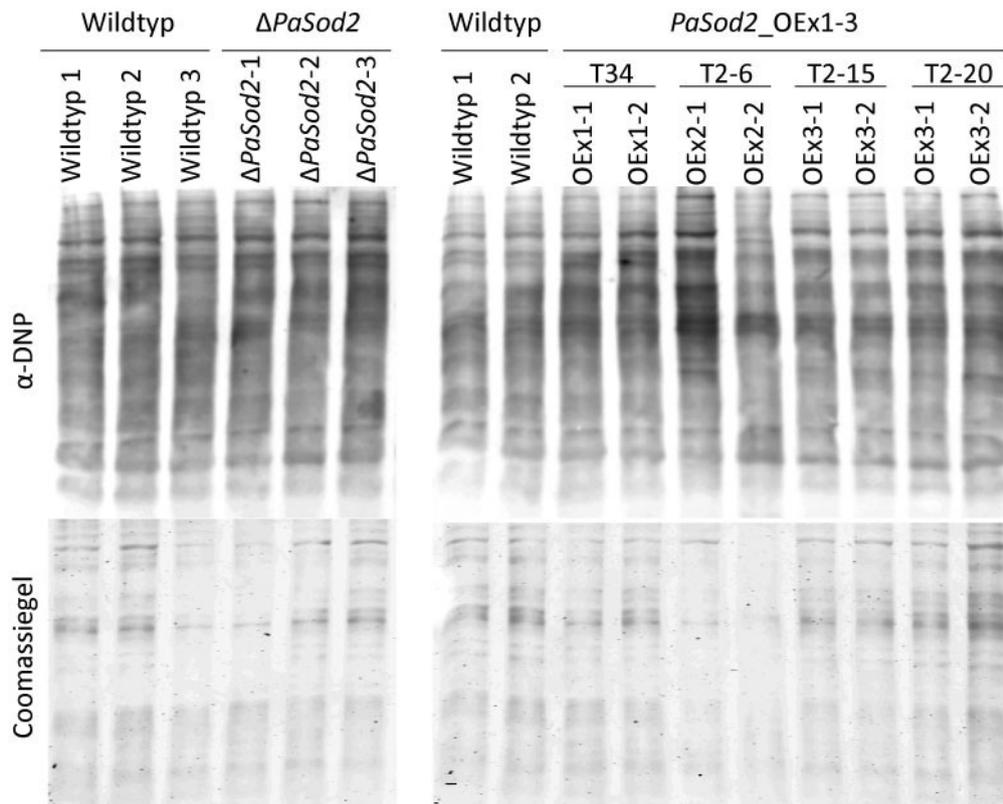


Abb. S9: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod2*-Mutantenstämmen. Western Blot-Analyse von 10 µg Gesamtproteinextrakt aus mittelalten *PaSod2*-Deletions- und Überexpressionsstämmen sowie von *P. anserina* Wildtypen. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran wurde das Polyacrylamidgel zur Kontrolle einer gleichartigen Beladung mit Coomassie gefärbt. Zur Detektion der carbonylierten Proteine diente der Antikörper α -DNP.

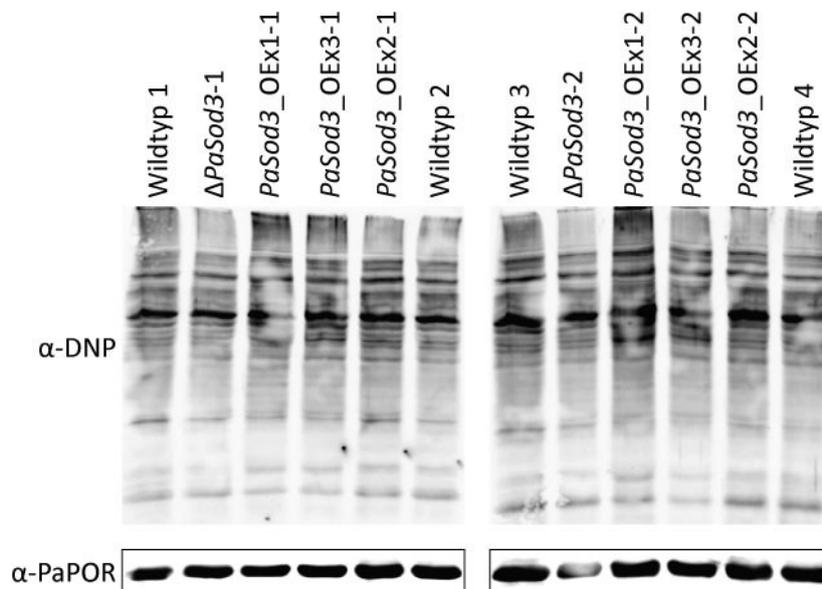


Abb. S10: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod3*-Mutantenstämmen. Western Blot-Analyse von 10 µg Gesamtproteinextrakt aus mittelalten *PaSod3*-Deletions- und Überexpressionsstämmen sowie von *P. anserina* Wildtypen. Als Ladekontrolle diente der Nachweis von PaPORIN mittels des Antikörpers α -PaPOR. Zur Detektion der carbonylierten Proteine diente der Antikörper α -DNP.

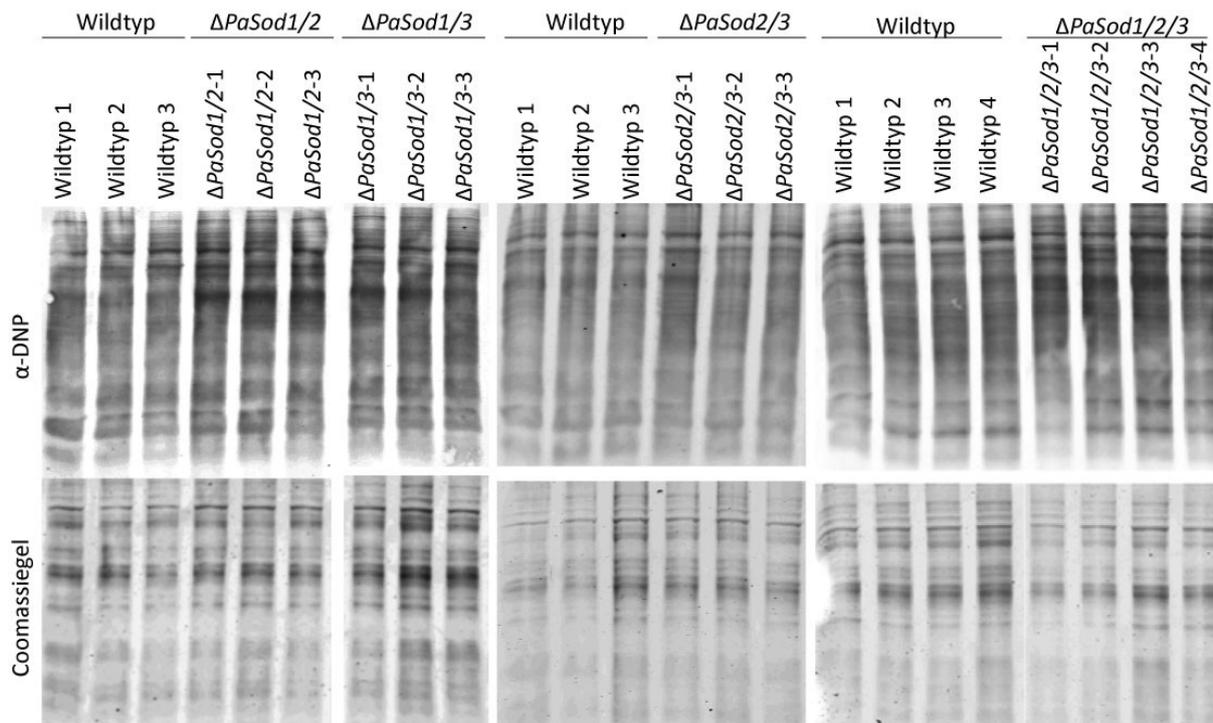


Abb. S24: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den Mehrfach-*PaSod*-Deletionsstämmen. Je 10 μ g Gesamtproteinextrakt von mittelalten Wildtypen und mittelalten *PaSod*-Deletionsstämmen ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$) wurden durch einen Western Blot analysiert. Nach dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran wurde das Polyacrylamidgel zur Kontrolle einer gleichartigen Beladung mit Coomassie gefärbt. Zur Detektion der carbonylierten Proteine diente der Antikörper α -DNP.

10.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	min	Minute(n)
APS	Ammoniumperoxidsulfat	mind.	mindestens
ATP	Adenosintri-phosphat	mL	Milli-Liter
BMM	Biomalz Mais-Medium	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
bp	Basenpaar	NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
BSA	bovines Serumalbumin	NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
bspw.	beispielsweise	PBS	„phosphate buffered saline“
bzw.	beziehungsweise	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ca.	circa	PEG	Polyethylenglykol
cDNA	komplementäre DNA	pH	potentia hydrogenii
C(t)	„Cycle(threshold)“	rev	“revers“
d	Tag	RNA	Ribonukleinsäure
d.h.	das heist	ROS	“reactive oxygen species“
DAPI	2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidin dihydrochlorid	rpm	“round per minute“
DIG	Digoxigenin	RT	Raumtemperatur
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	SDS	Natriumdodecylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure	sec	Sekunde
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat	sen	seneszent
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	SSC	Natriumsalz zitat
ER	Endoplasmatisches Retikulum	STC	Sorbitol-Tris-Kalziumchlorid
for	“forward“	Tab.	Tabelle
g	Gramm	TAE	Tetramethylethylendiamin, Tris-Acetat-EDTA
g	Gravitationskraft	TEMED	Tetramethylethylendiamin
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TENS	Tris-EDTA-NaCl-SDS
GSH	Glutathion	TPS	Transformations-Phosphat-Saccharose-Puffer
h	Stunde	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid	U	Unit
IAA	Isoamylalkohohl	V	Volt
juv.	juvenil	v/v	„volume per volume“
kbp	Kilo-Basenpaare	Vol.	Volumen
kDa	Kilo-Dalton	w/v	„weight per volume“
L	Liter	z.B.	zum Beispiel
M	Molar		
max.	maximal		
mg	Milli-Gramm		

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einflüsse, die den Prozess des Alterns beeinflussen.

Abb. 2: Schematische Darstellung der Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Entstehung und des Abbaus von ROS.

Abb. 4: Enzymatischer Abbau des Wasserstoff-peroxids durch Katalasen.

Abb. 5: Enzymatischer Abbau des Superoxids durch Superoxid-Dismutasen.

Abb. 6: Bildung und Morphologie des Fruchtkörpers von *P. anserina*.

Abb. 7: Die morphologischen Veränderungen des Myzels während des Alterns bei *P. anserina*.

Abb. 8: Schematische Darstellung der Domänenanordnung der drei Superoxid-Dismutasen in *P. anserina*.

Abb. 9: SOD-Aktivitäts- und Western Blot-Analysen vom Wildstamm und *PaSod*-Deletionsstämmen.

Abb. 10: Mikroskopische Lokalisationsanalysen der PaSOD::GFP-Fusionsproteine.

Abb. 11: Sekretomanalysen zur Untersuchung einer möglichen extrazellulären Lokalisation von PaSOD2.

Abb. 12: Nachweis der Proteinmengen und PaSOD-Aktivitäten der *PaSod*-Deletions- und Überexpressionsstämmen.

Abb. 13: Identifizierung der Mehrfach-Deletionsstämme ($\Delta PaSod1/2$, $\Delta PaSod1/3$, $\Delta PaSod2/3$ und $\Delta PaSod1/2/3$) durch Western Blot-Analysen.

Abb. 14: Analysen der Paraquat-Toleranz der verschiedenen *PaSod*- Überexpressions- und Deletionsstämme.

Abb. 15: Analysen der Wasserstoffperoxid-Toleranz der verschiedenen *PaSod*- Überexpressions- und Deletionsstämme.

Abb. 16: Nachweis der H₂O₂-Freisetzung bei der *PaSod*-Tripeldeletionsmutante ($\Delta PaSod1/2/3$) im Vergleich zum Wildtyp.

Abb. 17: Analysen zum Nachweis von oxidativ-geschädigter Proteinen der *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämmen.

Abb. 18: Untersuchungen der mittleren Lebensspanne der verschiedenen *PaSod*-Mutantenstämme.

Abb. 19: Co-Regulation der PaSODs.

Abb. 20: Qualitative Katalase B-Aktivitätsanalysen der verschiedenen *PaSod*-Überexpressions- und Deletionsstämmen.

Abb. 21: Western Blot-Analyse des *PaSod3*-Deletionsstammes und der *PaSod3*-Überexpressionsstämme.

Abb. 22: Transkriptmengen des *PaSod3*-Deletionsstammes und der *PaSod3*-Überexpressionsstämme im Vergleich zum Wildtyp.

Abb. S1: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung der *PaSod1*-Mutantenstämme.

Abb. S2: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung der *PaSod2*-Transformationstransformanten.

Abb. S3: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod3*-Deletions- und Überexpressionsstammes.

Abb. S4: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/2*-Deletionsstammes.

Abb. S5: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/3*-Deletionsstammes.

Abb. S6: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod2/3*-Deletionsstammes.

Abb. S7: Southern Blot-Analyse zur Identifizierung des *PaSod1/2/3*-Deletionsstammes.

Abb. S8: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod1*-Mutantenstämmen.

Abb. S9: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod2*-Mutantenstämmen.

Abb. S10: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den *PaSod3*-Mutantenstämmen.

Abb. S11: Nachweis von carbonylierten Proteinen in den Mehrfach-*PaSod*-Deletionsstämmen.

10.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Die drei bedeutendsten reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal).

Tab. 2: Verwendete Geräte.

Tab. 3: Sonstige verwendete Materialien.

Tab. 4: Verwendete Chemikalien.

Tab. 5: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits.

Tab. 6: Verwendete Plasmide sowie Cosmide und ihre Verwendung.

Tab. 7: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide.

Tab. 8: Verwendete Enzyme und ihre Hersteller.

Tab. 9: Verwendete Größenstandards.

Tab. 10: Verwendete Antikörper.

Tab. 11: Verwendete Computerprogramme.

Tab. 12: Aufstellung der eingesetzten cDNA-Menge sowie die optimale Konzentration der Oligonukleotide und deren ermittelte Effizienz.

11 Danksagung

Ich danke:

Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz für die freundliche Aufnahme und Betreuung in seinem Arbeitskreis sowie für die Vergabe des interessanten Themas der Dissertation. Weiterhin bin ich sehr dankbar für sein großes Interesse am Verlauf meiner Arbeit und die Bereitstellung der materiellen und finanziellen Mittel, die es mir ermöglicht haben diese Arbeit anfertigen zu können.

Prof. Dr. Bernd Ludwig für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Dr. Andrea Hamann, die mich schon seit meinem ersten Praktikum im Arbeitskreis begleitet hat. Ich bin sehr dankbar für die beherzte Unterstützung, die hilfreichen Anregungen und Ratschläge, gerade auch in der letzten Phase dieser Arbeit. Ich konnte viel von ihr lernen. Vielen Dank!

Allen anderen Mitgliedern des AK Osiewacz, die mich während meiner Zeit begleitet und unterstützt haben. Vor allem meiner Doktor-Schwester Andrea Weil sowie meinen Ex-Diplomanten und Doktor-Bruder Dominik Bernhardt. Ich danke euch für die netten und hilfreichen Gespräche während der Inkubationszeiten und die Versüßung des Laboralltags.

Meinen Eltern Werner und Monika Zintel für die Unterstützung und stete Hilfe in allen Lebenslagen. Ebenfalls möchte ich mich bei meiner großen Schwester Tina bedanken, die für mich immer ein Vorbild war, Ziele zu reichen. Mit einem offenen Ohr aus der Ferne hat sie mich unterstützt und begleitet. Ich danke euch!

12 Publikationsliste

Originalarbeiten

Kowald A, Hamann A, Zintel S, Ullrich S, Klipp E und Osiewacz H D (2012). A systems biological analysis links ROS metabolism to mitochondrial protein quality control. *Mech. Ageing Dev.* 133, 331-337.

Zintel S, Bernhardt D, Rogowska-Wrzesinska A und Osiewacz H D (2011). PaCATB, a secreted catalase protecting *Podospora anserina* against exogenous oxidative stress. *Aging (Albany. NY)* 3, 768-781.

Zintel S, Schwitalla D, Luce K, Hamann A und Osiewacz H D (2010). Increasing mitochondrial superoxide dismutase abundance leads to impairments in protein quality control and ROS scavenging systems and to lifespan shortening. *Exp. Gerontol.* 45, 525-532.

Buchbeiträge

Osiewacz H D, Hamann A und Zintel S (im Druck). Assessing organismal aging in the filamentous fungus *Podospora anserina*. Galluzzi L et al. (eds), *Cell Senescence: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* 965, Springer Science+Business Media. DOI 10.1007/978-1-62703-239-1_30.

13 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sandra Zintel
 Geboren am: 7. September 1981 in Offenbach
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: ledig



Schulbildung

09/1988 bis 06/1992 Grundschule Bieber in Offenbach
 09/1992 bis 06/1999 Mittlere Reife an der Marienschule der Ursulinen in Offenbach
 09/1999 bis 07/2002 Allgemeine Hochschulreife am Rudolf Koch Gymnasium in Offenbach (Note: 2,6)

Studium

10/2002 bis 02/2008 Studium der Biologie an der Goethe-Universität Frankfurt am Main, Abschluss Diplom, Thema der Diplomarbeit „Untersuchungen zur Bedeutung von *Mmi1* für degenerative Prozesse bei *Podospora anserina*“, mit erfolgreichem Abschluss (Note: 1,5) durchgeführt in dem Arbeitskreis „Molekulare Zell- und Entwicklungsbiologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

Promotion

Seit 04/2008 Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit „Untersuchungen zur Bedeutung von Superoxid-Dismutasen für die Alterung von *Podospora anserina*“, Promotion durchgeführt in dem Arbeitskreis „Molekulare Zell- und Entwicklungsbiologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz

Berufstätigkeit

04/2008 bis 04/2012 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz an der Goethe-Universität Frankfurt
 Seit 08/2012 Dentalfachberaterin bei Quintiles für Procter&Gamble GmbH, Oral Health in Schwalbach am Taunus