

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Isolierung und Charakterisierung von Kupferhomeostase-
Faktoren aus *Trametes versicolor* und deren Einfluss auf
die Laccase-Expression**

von

Andreas Uldschmid

aus

Fürstenfeldbruck

München 2002

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs.3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München den 2. August 2002

Andreas Uldschmid

Dissertation eingereicht am 02.08.2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker
2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

Mündliche Prüfung am 11. November 2002

für Eva

Was wir wissen, ist ein Tropfen, was wir nicht wissen - ein Ozean.

Isaac Newton

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1998 bis Juli 2002 am Institut für Biochemie unter der Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker im Labor von Dr. Karin Marbach angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. E.-L. Winnacker möchte ich mich für die Betreuung dieser Arbeit, für die Aufnahme an seinem Institut und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Genzentrum herzlich bedanken.

Frau Dr. Karin Marbach gilt mein besonderer Dank für die Vergabe des Themas, für ihre hervorragende und engagierte Betreuung, sowie für die stets hilfreiche Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Auch für das von ihr entgegengebrachte Vertrauen in meine Fähigkeiten herzlichen Dank.

Beim Consortium für elektrochemische Industrie (Dr. Wich, Dr. Candussio und Dr. Pfaller) bedanke ich mich vor allem für die Finanzierung dieser Arbeit und den guten wissenschaftlichen Austausch.

Besonderer Dank gilt hier Dr. Rupert Pfaller für die gute Zusammenarbeit und Diskussion, sowie für seine hilfreichen und produktiven Vorschläge.

Bei Prof. Dr. Patrick Cramer bedanke ich mich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Den Mitgliedern des Labors 4.55 (Dr. Heidi Feldmann, Sigrun Jaklin, Dr. Bettina Meier, Regina Knapp, Dipl. Chem. Karsten Beck, Dipl. Biochem. Renate Dombi und vielen mehr) danke ich für die gute und kameradschaftliche Zusammenarbeit.

Besonders bei Dipl. Biochem. Renate Dombi bedanke ich mich für die technische Unterstützung, die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit.

Dipl. Chem. Michael Engel und meinen FH-Praktikanten Andreas Schmid, Karolin Meixenberger, Heidi Reindl, Alexander Knaupp und Ralf Schneider danke ich für ihre engagierte Mitarbeit.

Dipl. Chem. Karsten Beck danke ich für seine Freundschaft, die auch weit über den Laboralltag hinaus reicht.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir ermöglichten zu studieren und dass sie mich lehrten, die Welt mit offenen Augen zu betrachten.

Meiner Frau Eva danke ich an dieser Stelle ganz besonders für ihre jahrelange Geduld, für den großen Rückhalt, den sie mir während der Promotion gab, und ihre Liebe. Die seelische Unterstützung ihrerseits hat sicherlich zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen.

Folgende Veröffentlichungen sind während dieser Arbeit entstanden bzw. noch in Vorbereitung:

Veröffentlichung der Patentanmeldung:

„Expressionssystem zur Überexpression von Kupfer-abhängigen sekretierten Proteinen in eukaryontischen Zellen“ (DE10046932)

Andreas Uldschmid, Michael Engel, Renate Dombi and Karin Marbach (2002). Identification and functional expression of *tahA*, a filamentous fungal gene involved in copper trafficking to the secretory pathway in *Trametes versicolor*. *Microbiology* 2002; 148: 4049-4058

Andreas Uldschmid, Renate Dombi and Karin Marbach.

Identification and functional over expression of *ctaA*, a P-type ATPase gene involved in copper trafficking to the secretory pathway in *Trametes versicolor*.

In Vorbereitung.

Andreas Uldschmid and Karin Marbach.

Formation of apo-Laccase from *Trametes versicolor* and its reconstitution with copper.

In Vorbereitung.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Der Weißfäulepilz <i>Trametes versicolor</i>	1
1.2	Laccase	2
1.3	Biotechnologische Anwendungen der Laccase.	4
1.4	Kupfer als Kofaktor	5
1.5	Kupferhomeostase in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> und Versorgung des sekretorischen Systems mit Kupfer	5
1.5.1	Grundzüge der Kupferhomeostase in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.5.2	Regulation der Kupferhomeostase in <i>S. cerevisiae</i>	8
1.6	Kupferaufnahme in Eukaryonten - die Ctr-Familie	9
1.7	Kupferchaperone für das TGN - Atx1 und Homologe	10
1.8	Kupfer-P-Typ-ATPasen.....	11
1.9	Zielsetzung	13
2	Material.....	15
2.1	Geräte	15
2.2	Software	16
2.3	Verbrauchsmaterialien	16
2.4	Bakterienstämmen	17
2.5	Hefestämmen	17
2.6	<i>Trametes versicolor</i> Stämme	18
2.7	Plasmide, Phagenbank und cDNA-Banken.....	19
2.8	Chemikalien und Kits	20
2.9	Enzyme.....	21
2.10	Medien.....	21

2.10.1	<i>E. coli</i> Medien	21
2.10.2	Hefemedien	22
2.10.3	Medien für <i>Trametes versicolor</i>	23
2.11	DNA und Protein Molekulargewichtsstandards	24
2.12	Synthetische Oligonukleotide	24
2.13	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	27
3	Methoden	28
3.1	Kultivierung der Mikroorganismen	28
3.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	28
3.1.1.1	Vermehrung in Flüssigkultur	28
3.1.1.2	Anzucht auf Agarplatten	28
3.1.1.3	Stammhaltung	28
3.1.2	Anzucht von <i>Trametes versicolor</i>	29
3.1.2.1	Anzucht und Stammhaltung auf Festmedium	29
3.1.2.2	Standvorkultur	29
3.1.2.3	Schüttelvorkultur	29
3.1.2.4	Hauptkultur	29
3.1.3	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.1.3.1	Anzucht auf Agarplatten	30
3.1.3.2	Vermehrung in Flüssigkultur	30
3.1.3.3	Stammhaltung	30
3.1.3.4	Tropftiterest	31
3.2	Isolation von DNA	31
3.2.1	Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	31
3.2.1.1	Alkalischer Schnellaufschluss	31
3.2.1.2	Plasmidreinigung über kommerzielle Plasmid Kits	31
3.2.2	Elution von DNA aus Agarosegelen	32
3.2.2.1	Zentrifugation durch Glaswolle	32
3.2.2.2	Extraktion der DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ von Qiagen	32
3.2.3	Isolation von DNA aus <i>Trametes versicolor</i>	32
3.2.4	Isolation von Plasmiden aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.3	Isolation von RNA aus <i>Trametes versicolor</i>	33
3.3.1	Isolation von Gesamt-RNA	33
3.3.2	Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA	34
3.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	34

3.4.1	Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration	34
3.4.2	DNA-Konzentrationsbestimmung auf Ethidiumbromid-Platten	34
3.5	Enzymatische Reaktionen an DNA	35
3.5.1	Restriktionsspaltung von DNA	35
3.5.2	Auffüllen von 5'- und 3'-überhängenden Enden	35
3.5.3	Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase	35
3.5.4	Ligation	35
3.6	PCR-Amplifizierung	35
3.7	Herstellung von cDNA	36
3.8	Radioaktive Markierung von DNA	37
3.9	Southern- und Northern-Blot Analysen	37
3.9.1	Kapillarblot	37
3.9.2	Hybridisierung nach Church	38
3.10	Untersuchung von RNA durch S1-Nucleaseschutz Analyse	38
3.11	Transformation von <i>E. coli</i>-Zellen	39
3.11.1	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
3.11.2	Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.11.3	Bestimmung der Transformationseffizienz	39
3.12	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
3.13	Transformation von <i>Trametes versicolor</i>	40
3.13.1	Herstellung der Protoplasten	40
3.13.2	Transformation der Protoplasten	41
3.14	Durchmusterung einer Phagenbank	42
3.14.1	Identifizierung von positiven Phagen durch Hybridisierung	42
3.15	Gelelektrophorese.....	43
3.15.1	Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	43
3.15.2	Auftrennung von DNA-Fragmenten in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen	44
3.15.3	Auftrennung von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen.....	44
3.15.4	Auftrennung von Proteinen in nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (Nativ-Gele)	45
3.16	Proteinextrakte aus <i>Trametes versicolor</i> oder <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45
3.17	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
3.18	Western-Blot	46

3.19	Laccase – Aktivitätstest (ABTS – Test)	46
3.20	Reinigung von Laccase bzw. Apo-Laccase	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Grundlegende Beobachtung und Strategie	49
4.1.1	Die Expression der Laccase ist kupferabhängig	49
4.1.2	Strategie	51
4.2	Isolierung und Charakterisierung von <i>T. versicolor</i> Kupferhomeostase -Genen	51
4.2.1	Herstellung von <i>T. versicolor</i> cDNA Banken	51
4.2.2	Isolierung des Gens eines Kupferchaperones (<i>tahA</i>) aus <i>T. versicolor</i>	53
4.2.3	Strukturelle Charakterisierung des <i>tahA</i> Gens	55
4.2.4	Funktionelle Analyse des <i>tahA</i> Gens	58
4.2.5	Isolierung des Gens einer Kupfer-P-Typ-ATPase (<i>ctaA</i>) aus <i>T. versicolor</i>	60
4.2.5.1	Komplementation einer <i>S. cerevisiae ccc2</i> Deletionsmutante	60
4.2.5.2	Sequenzierung der cDNA der <i>ctaA</i> Klone	63
4.2.5.3	Southernblot-Analyse der <i>ctaA</i> -Sequenzen	63
4.2.5.4	Isolierung eines genomischen <i>ctaA</i> -Gens	64
4.2.6	Charakterisierung des <i>ctaA</i> -Gens	65
4.2.7	Charakterisierung der Proteinsequenz von <i>ctaA</i>	66
4.2.8	Isolierung der Gene von zwei putativen Kupfer-Permeasen (<i>cupA</i> und <i>cupB</i>) aus <i>T. versicolor</i>	68
4.2.8.1	Isolierung des Gens der Kupfer-Permease <i>cupA</i> durch Komplementation einer <i>S. cerevisiae</i> Δ <i>ctr1</i> -Mutante	68
4.2.8.2	Isolierung des Gens einer putativen Kupfer-Permease aus <i>T. versicolor</i> durch Komplementation einer Δ <i>cup5</i> Hefemutante	71
4.2.9	Southernblot-Analyse von <i>cupA</i> und <i>cupB</i>	72
4.2.10	Charakterisierung von <i>cupA</i> und <i>cupB</i> auf Proteinebene	74
4.2.11	Funktionelle Charakterisierung von <i>cupA</i> und <i>cupB</i>	76
4.3	Transkriptionelle Regulation der aus <i>T. versicolor</i> isolierten Gene	78
4.3.1	Transkriptionelle Regulation von <i>T. versicolor tahA</i>	78
4.3.2	Transkriptionelle Regulation von <i>ctaA</i>	83
4.3.3	Transkriptionelle Regulation von <i>cupA</i> und <i>cupB</i>	83
4.4	Koexpression von <i>tahA</i> und <i>ctaA</i> in <i>S. cerevisiae</i> und <i>T. versicolor</i>	84
4.4.1	Koexpression von <i>lacIII</i> , <i>tahA</i> und <i>ctaA</i> in <i>S. cerevisiae</i>	84
4.4.2	Koexpression von <i>tahA</i> und <i>ctaA</i> in <i>T. versicolor</i>	86
4.4.2.1	Konstruktion von <i>tahA</i> und <i>ctaA</i> Expressionsplasmiden	86
4.4.2.2	Kotransformation von <i>T. versicolor</i> mit pUC-gapCTA und gPura-gapTAH	87

4.4.2.3	Laccase-Expression in den <i>T. versicolor</i> Kotransformanden	92
4.5	Herstellung, Reinigung, Charakterisierung und Rekonstitution von Apo-Laccase	96
4.5.1	Herstellung von Apo-Laccase	96
4.5.2	Reinigung von Apo-Laccase	97
4.5.3	Charakterisierung der Apo-Laccase	97
4.5.4	Rekonstitution der Apo-Laccase mit Kupfer	99
4.5.4.1	Abhängigkeit der Rekonstitution von der Kupferkonzentration	99
4.5.4.2	Ascorbatabhängigkeit der Rekonstitution	101
4.5.4.3	Abhängigkeit der Rekonstitution von einwertigen Anionen (Halogenide)	102
4.5.4.4	Einfluss des pH-Wertes auf die Rekonstitution	102
4.5.4.5	Zeitabhängigkeit der Rekonstitution	103
5	Diskussion	105
5.1	Vortest	105
5.2	Herstellung der Genbanken	106
5.3	Isolierung und Charakterisierung von <i>tahA</i>	106
5.4	Isolierung und Charakterisierung von <i>ctaA</i>	109
5.5	Isolierung und Charakterisierung von <i>cupA</i> und <i>cupB</i>	111
5.6	Koexpression von <i>tahA</i> und <i>ctaA</i> in Hefe und in <i>T. versicolor</i>	113
5.7	Herstellung, Reinigung und Rekonstitution der Apo-Laccase	115
5.7.1	Herstellung und Reinigung der Apo-Laccase	115
5.7.2	Rekonstitution der Apo-Laccase	116
5.8	Modell der Kupferhomestase von <i>T. versicolor</i>	118
6	Zusammenfassung	121
7	Anhang	123
7.1	Sequenzen und Vergleiche	123
7.1.1	Vergleich von TahA mit Atx1, CCH, CUC-1 und HAH	123
7.1.2	Vergleich der genomischen Sequenzen von <i>tahA-1</i> und <i>tahA-2</i>	123
7.1.3	Primer für die Sequenzierung von <i>ctaA</i>	127
7.1.4	Vergleich der genomischen <i>ctaA-1</i> Sequenz mit den cDNA Sequenzen von <i>ctaA-1</i> und <i>ctaA-2</i>	127
7.2	Klonierungen und Vektoren	135
7.2.1	Laccase-Expressionsvektor für Hefe (pLacP2)	135

7.2.2	Vektoren für <i>tahA</i> - und <i>ctaA</i> -Expression in <i>S. cerevisiae</i>	136
7.2.3	Vektoren für <i>cupA</i> - und <i>cupB</i> -Expression in <i>S. cerevisiae</i>	137
7.2.4	Klonierung der cDNA Banken in pJG4-5, pAH und pAT	138
7.2.5	Karte des Vektors pCR2.1gcta	139
7.2.6	Konstruktion der Vektoren pUC-Pgap+ und pUC-Pgap-	140
7.2.7	Konstruktion des Vektors pUC-Pgap-cta.....	141
7.2.8	Konstruktion des Vektors gPuragapTAH	142
8	Literaturverzeichnis	143

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ω	Ohm
μ	micro
AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATX	Anti-Oxidant
BCS	Bathocuproin-di-sulfonsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
COX	Cytochrom-Oxidase
cpm	Zerfälle pro Minute
Cu	Kupfer
Da	Dalton
DABA	4-Dimethylaminobenzaldehyd
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Farad
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunde
k	kilo
kb	Kilobasenpaare

l	Liter
M	Molar
m	milli
MBS	Metall Binding Site
MCS	Multiple Cloning Site
min.	Minute
MRE	Metall Response Element
mRNA	messenger RNA
N	normal (chem.)
n	nano
nt	Nukleotide
OD _x	optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
p	pico
PAA	Pylyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive oxygene species
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s	Sekunde
SOD	Superoxiddismutase
TAH	<i>Trametes</i> ATX homolog
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslated Region
V	Volt
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosid
Y x g	Y-fache Erdbeschleunigung

Codes für Nukleinsäuren und Aminosäuren

Nukleinsäurecodes

A	Adenosin	
C	Cytidin	
G	Guanin	
T	Thymin	
U	Uracil	
R	G oder A	(Purin)
Y	T oder C	(Pyrimidin)
K	G oder T	(Keto)
M	A oder C	(Amino)
S	G oder C	(Strong)
W	A oder T	(Weak)
B	G oder T oder C	
D	G oder A oder T	
H	A oder C oder T	
V	G oder C oder A	
N	A oder G oder C oder T	(Any)

Aminosäurecodes

Ein-Buchstaben-Code	Drei-Buchstaben-Code	
A	Ala	Alanin
B	Asx	Aspartat oder Asparagin
C	Cys	Cystin
D	Asp	Aspartat
E	Glu	Glutamat
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamat oder Glutamin
X		Belibige AS

1 EINLEITUNG

1.1 Der Weißfäulepilz *Trametes versicolor*

Der Basidiomycet *Trametes versicolor* (auch *Coriolus versicolor*, *Polyporus versicolor* oder deutsch: *Schmetterlings-Porling*) wächst auf abgestorbenem Hartholz von Eichen oder Buchen, befällt aber auch kranke Obstbäume (Abb. 1-1, *Grosser* [1985]). Er gehört zu der ökologischen Gruppe der Weißfäulepilze. Diese können Lignin, das zusammen mit Cellulose den Hauptbestandteil des Holzes bildet, vollständig zu CO₂ und Wasser abbauen (*Cullen* [1997]). Zurück bleibt nur die weiße Cellulose, was zu dem Namen der Pilzgruppe führte.



Abb. 1-1 Fruchtkörper (Basidien) von *Trametes versicolor* auf einem Baumstumpf.

Lignin wird durch Polymerisation freier Radikale der Zuckerderivate Coniferyl-Alkohol und Sinapyl-Alkohol gebildet. Das Produkt aus dieser Reaktion ergibt eine hochpolymere, heterogene, wachsartige und rotbraune Substanz, die sehr schwer abzubauen ist. Deshalb sekretieren Weißfäulepilze metallabhängige Redoxenzyme, wie Manganperoxidasen, Häm-abhängige Ligninperoxidasen und kupferabhängige Laccasen, um das komplexe aromatische Biopolymer Lignin zersetzen zu können (*Jeffries* [1994]). Bei der Untersuchung des Ligninabbaus von *T. versicolor* wurde festgestellt, dass der Pilz diverse Ligninasen, und zwar Ligninperoxidasen und fünf verschiedene Laccasen produziert, wovon die Laccase III am

stärksten exprimiert wird (*Bertrand et al.* [2002]). Überhaupt ist die Menge der sekretierten Laccasen natürlicherweise in diesem Pilz höher als diejenige, welche bei einer heterologen Expression in *Pichia* oder *Aspergillus* erzielt werden konnte (*Rupert Pfaller*, Consortium für elektrochemische Industrie, mündliche Mitteilung). *T. versicolor* lässt sich gut auf Agar-Platten und in Schüttelkulturen bzw. Fermentern anziehen, was ihn zu einem idealen Organismus für die großtechnische Herstellung von metallabhängigen, ligninabbauenden Enzymen - vor allem der Laccase III - macht. Seit kurzem existiert auch ein Transformationssystem für *T. versicolor* (*Schuren et al.* [1999]) was seine genetische Manipulation ermöglicht

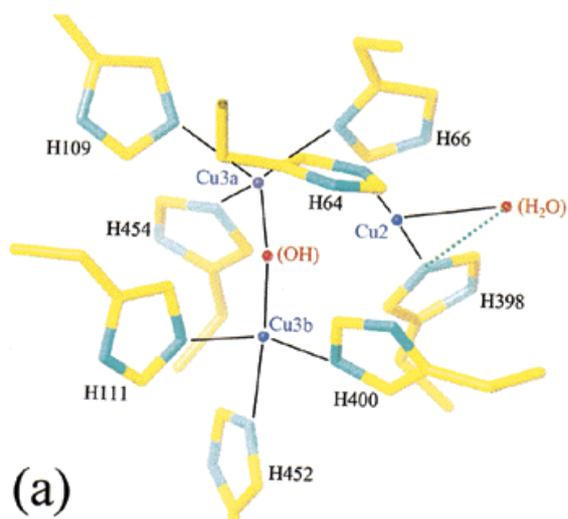
1.2 Laccase

Laccasen (para-Diphenol: Dioxigen Oxidoreduktase; EC 1.10.3.2) sind glykosylierte, sekretierte, blaue Multi-Kupfer-Oxidasen mit vier Kupferionen im aktiven Zentrum. Sie werden hauptsächlich von Pflanzen und Pilzen gebildet (*Wahleithner et al.* [1996]). *In vivo* haben sie Funktionen bei der Pigmentsynthese, bei der Morphogenese von Pilzen und bei der Entgiftung von Phenolen, die beim Ligninabbau entstehen. In Pflanzen sind sie am Aufbau des Lignins beteiligt. Bei Pflanzen befallenden Pilzspezien wurden Laccasen als Virulenzfaktor identifiziert, der die von der Wirtspflanze ausgeschiedenen Abwehrstoffe entgiftet (*Schouten et al.* [2002]). Auch in dem opportunistischen Humanpathogen, *Cryptococcus neoformans*, wurde Laccase als Pathogenitätsfaktor beschrieben (*Zhu et al.* [2001]). Das Enzym katalysiert die Oxidation von einem weiten Spektrum an aromatischen Verbindungen, wie z.B. Polyphenole, Methoxy-substituierte Monophenole oder aromatische Amine (*Xu* [1996]; *Xu et al.* [1996]). Bei der Reaktion werden von vier Substratmolekülen jeweils ein Elektron auf das Enzym übertragen und dann alle vier Elektronen an molekularen Sauerstoff weitergegeben, wobei zwei Wassermoleküle entstehen.

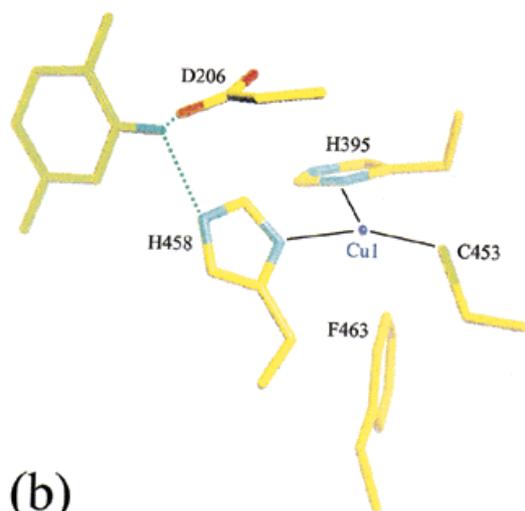
Kürzlich wurden die Strukturen der *Coprinus cinerius* Laccase und der *T. versicolor* Laccase III gelöst und verglichen (*Bertrand et al.* [2002]; *Ducros et al.* [1998]), wobei festgestellt wurde, dass beide Laccasen strukturell stark konserviert sind, vor allem was die Koordination der vier Kupferionen im aktiven Zentrum betrifft (Abb. 1-2). Das Typ 1 (T1) Kupferzentrum, das ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von etwa 600 nm hat, verursacht die blaue Färbung des Enzyms und ist somit namensgebend für die „Blauen“ Oxidasen. Das

Kupferion wird in dieser Bindestelle über zwei Histidine und ein Cystein koordiniert. In der Typ 2 (T2) / Typ 3 (T3) Kupferbindestelle werden drei Kupferionen durch acht stark konservierte Histidine koordiniert, die in vier H-x-H Motiven (wobei H für Histidin und x für jede beliebige Aminosäure steht) gruppiert sind. Die beiden Kupferionen in den T3 Zentren werden über jeweils drei Histidine und ein gemeinsames (OH)⁻-Ion koordiniert, während das Kupferion im T2 nur durch zwei Histidine und H₂O koordiniert wird.

Auch pflanzliche Ascorbatoxidase, das im Plasma von Säugern vorkommende Ceruloplasmin und die Eisenreduktase Fet3 aus *S. cerevisiae* gehören zu der Gruppe von blauen Oxidasen und haben homologe Kupferzentren (Messerschmidt und Huber [1990]).



(a)



(b)

Abb. 1-2: Die Kupferbindestellen der *T. versicolor* Laccase III (aus Bertrand et al. [2002]): a) Das trinukleare T2/T3 Zentrum: Seitenketten der Histidine, die an der Koordination des Kupfers beteiligt sind, sind als Stabmodell dargestellt. Kupferionen sind blau, N-Atome cyan und C-Atome gelb, Sauerstoffatome, die an der Koordination des Kupfers beteiligt sind, sind rot dargestellt. Die Koordination der Kupferionen sind durch schwarze Linien markiert. b) Darstellung des T1-Zentrum mit einem 2,5-Xylidin Substratmolekül: Das Kupfer ist durch die Seitenketten von zwei Histidinen und einem Cystein koordiniert. Zusätzlich sind die Seitenketten des Phe 463 und das Asp 206, welches mit dem 2,5-Xylidin interagiert, dargestellt.

1.3 Biotechnologische Anwendungen der Laccase.

Aufgrund des breiten Substratspektrums der Laccase wurde eine Vielzahl von biotechnologischen Prozessen entwickelt, an denen Laccase beteiligt ist. So wurden Verfahren entwickelt, in denen Laccase als Biosensor für Xenobiotica, Catecholamine und Adrenalin dient (*Ghindilis et al.* [1995]; *Szeponik et al.* [1997]). Auch die Entgiftung von Herbiziden, wie Chloronitrofen und Nitrofen, sowie des Pestizids Lindan mit Hilfe von Laccase wurde erfolgreich getestet (*Hiratsuka et al.* [2001]; *Tekere et al.* [2002]). So kann das Enzym unter anderem zur Sanierung von mit PCB kontaminierten Böden verwendet werden (*Dietrich et al.* [1995]).

Eine weitere Anwendung des Enzyms ist die Verklebung von Holz, wobei durch die Laccase-Aktivität kovalente Bindungen zwischen dem Lignin der Holzstücke erzeugt werden (*Felby et al.* [1997]).

Die größte industrielle Anwendung von Laccase liegt allerdings in der chlorfreien Papierbleichung. Bei einem Umsatz von mehr als 150 Millionen Tonnen Papierpulpe im Jahr 1997 fielen bei der heutigen chemischen Bleiche etwa 50 Millionen Tonnen von chlorierten, phenolischen Verbindungen und Ligninresten an, die ein großes Umweltproblem darstellen (*Call und Mücke* [1997]). Dieser Wert dürfte bei ständig steigendem Papierverbrauch heute noch höher sein. Im sogenannten Lignozym®-Verfahren (*Call und Mücke* [1997]) wird Lignin, das die braune Farbe des Papiers verursacht, durch ein Laccase-Mediator-System abgebaut. Der Mediator (1-Hydroxybenzotriazol, HBT) dient dabei als Redox-Überträger, da die Laccase für das Eindringen in die Holzfasern zu groß ist. Die Effizienz des Bleichprozesses konnte durch die Einführung des Mediators erheblich gesteigert werden.

Zusätzlich könnte die Laccase, im Anschluss an diesen Prozess, für die Klärung des entstandenen Abwassers eingesetzt werden (*Roy-Arcand und Archibald* [1991]).

Ähnliche Systeme werden zur Zeit auch für die Textilbleichung erprobt (*Nyanhongo et al.* [2002]).

Eine wirtschaftliche industrielle Umsetzung dieser Prozesse setzt allerdings voraus, dass Laccase in ausreichenden Mengen zu einem wirtschaftlich konkurrenzfähigen Preis produziert werden kann.

1.4 Kupfer als Kofaktor

Wegen der Eigenschaft des Kupfers mehrere Redoxzustände (Cu(I) und Cu(II)) annehmen zu können, ist es in allen Organismen von Bakterien bis hin zum Menschen ein essentielles Spurenelement (Linder [1991]). Dort dient es in vielen Enzymen, wie z.B. in Cytochrom-C-Oxidase, in Lysyl-Oxidase, in Dopamin- β -Hydroxylase, in Cu/Zn Superoxiddismutase (SOD) und in den Multikupfer-Ferroxidasen Ceruloplasmin aus Säugern, bzw. Fet3 aus *S. cerevisiae*, als Redox-Kofaktor. Die selbe Eigenschaft macht Kupfer allerdings auch toxisch für die Zelle, da freie Kupferionen in Fenton-Reaktionen hoch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) wie z.B. Hydroxylradikale erzeugen können, die dann die DNA, Proteine und Lipide schädigen (Halliwell und Gutteridge [1984]; Santoro [1997]). Freie Cu(I)-Ionen können auch unspezifisch freie Thiol- oder Amingruppen in Proteinen angreifen und diese dadurch denaturieren. Außerdem kann Cu(I) andere Metallionen von ihrer Position in Proteinen verdrängen und somit deren Funktion beeinträchtigen. Die Zellen kontrollieren daher die Anzahl der freien Kupferionen im Cytoplasma sehr stark. So wurde in *S. cerevisiae* nur ein freies Kupferion pro Zelle prognostiziert (Rae et al. [1999]).

1.5 Kupferhomeostase in *Saccharomyces cerevisiae* und Versorgung des sekretorischen Systems mit Kupfer

1.5.1 Grundzüge der Kupferhomeostase in *S. cerevisiae*

Da Kupfer für Zellen einerseits essentiell, andererseits aber toxisch ist (Pearce und Sherman [1999]), müssen diese durch eine ausgeklügelte und streng regulierte Kupferhomeostase sicherstellen, dass die essentiellen Proteine mit Kupfer beladen werden, ohne eine toxische Anhäufung von Kupfer zuzulassen. Der in dieser Hinsicht am besten untersuchte eukaryontische Organismus ist die Bäckerhefe *S. cerevisiae* (siehe auch Abb. 1-3 und Abb. 1-4). Dies liegt einerseits daran, dass *S. cerevisiae* vollständig sequenziert ist, und dass andererseits die molekularbiologischen Werkzeuge für genetische Manipulation und Mutationsanalyse in Hefe gut entwickelt und einfach zu handhaben sind. Mit Ausnahme der Cu-abhängigen Transkriptionsfaktoren Mac1 und Ace1 (Koch et al. [1997]; Winge et al. [1998]) sind für alle in Hefe untersuchten Kupferhomeostasefaktoren homologe Proteine aus

dem Menschen identifiziert worden. Dies unterstreicht das Potential von Hefe als Modellorganismus für das Verständnis des Kupfermetabolismus und die starke Konservierung dieser Mechanismen unter den Eukaryonten.

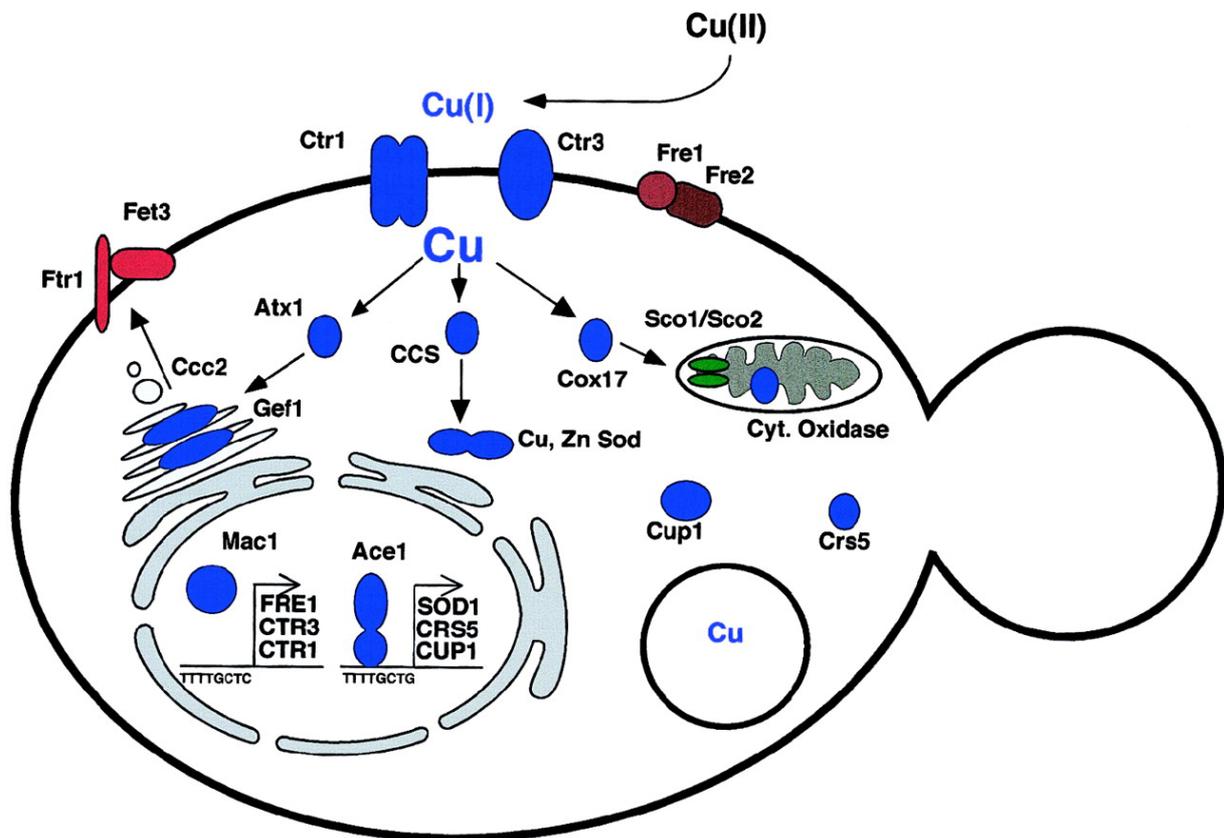


Abb. 1-3: Kupfertransport und -verteilung in *Saccharomyces cerevisiae* (aus Pena et al. [1999]): Kupfer wird zuerst Cu(II) zu Cu(I) durch die Metallreduktase Fre1/Fre2 reduziert. Die hoch-affine Kupferaufnahme wird dann von Ctr1 und Ctr3 durchgeführt. In der Zelle bindet das Kupfer an die bekannten Kupferchaperone Atx1, Cox17 und Ccs, die es jeweils zum sekretorischen System, zu den Mitochondrien bzw. zu Sod1 transportieren und dort übergeben. Innerhalb des Golgi-Apparates übernimmt Ccc2 das Kupfer von Atx1 und transferiert es in das Golgi-Lumen, wo es in die Eisenoxidase Fet3 eingebaut wird. Fet3 bildet zusammen mit der Eisenpermease Ftr1 einen Komplex, der an der Plasmamembran für die hoch-affine Eisenaufnahme sorgt. In den Mitochondrien wird das von Cox17 angelieferte Kupfer mit Hilfe von Sco1 und Sco2 in die Cytochrom-C-Oxidase eingebaut. Ccs (Lys7) inkorporiert das Kupfer in Sod1. Bis jetzt ist nicht klar, ob Kupferchaperone für den Einbau von Kupfer in die Metallothioneine Cup1 und Crs5 bzw. in die kupferabhängigen Transkriptionsfaktoren Mac1 und Ace1 benötigt werden.

In Hefe wird Kupfer (Cu(II)) durch die Metallreduktasen Fre1 und Fre2 zu Cu(I) reduziert bevor es durch die beiden hoch-affinen Kupferpermeasen Ctr1 und Ctr3 aufgenommen wird (Dancis et al. [1994]; Knight et al. [1996]). Das Kupfer wird dann sofort durch kleine cytoplasmatische Proteine – so genannte Kupferchaperone – gebunden, die es an ihren Zielort dirigieren. In Hefe wurden bis jetzt drei dieser Kupferchaperone identifiziert, nämlich Cox17

(Glerum *et al.* [1996]), Ccs (Culotta *et al.* [1997]) und Atx1 (Lin und Culotta [1995]). Cox17 transportiert Kupfer zu den Mitochondrien, wo es mit Hilfe von Sco1 und Sco2 in die Cytochrom-C-Oxidase eingebaut wird (Rentzsch *et al.* [1999]). Ccs (Lys7) ist das Kupferchaperon für Cu/Zn-SOD (Sod1) aus Hefe. Mit Kupfer beladenes Ccs bindet an der unbeladenen Form der Sod1 und überträgt dabei das Kupferion (Culotta *et al.* [1997]).

Atx1, welches das Kupfer zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bringt, wurde erstmals von Lin und Culotta [1995] als Supressor für den Phänotyp einer SOD-defizienten Hefemutante isoliert und wurde deshalb als „Anti-Oxidant 1“ bezeichnet.

Später wurde von Pufahl *et al.* [1997] gezeigt, dass Atx1 Kupfer an die im TGN lokalisierte P-Typ-ATPase Ccc2 (Fu *et al.* [1995]; Yuan *et al.* [1995]) übergibt. Diese pumpt das Kupfer dann unter ATP-Verbrauch in das Golgi-Lumen, wo es in die blaue Multi-Kupfer-Oxidase Fet3 eingebaut wird (Lin *et al.* [1997]; Pufahl *et al.* [1997]), die zusammen mit der Eisenpermease Ftr1 das hoch-affine Eisenaufnahme-System der Hefezelle bildet (Stearman *et al.* [1996]). Es wurde noch zusätzlich zu CCC2 weitere Gene identifiziert, die an der Beladung von Fet3 mit Kupfer beteiligt sind. So wird das Gen *GEF1*, das für einen in der Golgi-Membran lokalisierten Chloridkanal kodiert, für eine effiziente Beladung von Fet3 mit Kupfer benötigt (Davis-Kaplan *et al.* [1998]; Gaxiola *et al.* [1998]). Gleiches gilt für die Protonenpumpe Vma3 (Cup5) (Eide *et al.* [1993]). Ein Modell der Kupferhomeostase des TGN ist in Abb. 1-4 dargestellt.

Zu erwähnen ist noch, dass alle Disruptionen der an der Kupferbeladung von Fet3 beteiligten Gene *CTR1*, *CTR3*, *ATX1*, *CCC2*, *VMA3 (CUP5)* und *GEF1* zum gleichen Phänotyp führen, nämlich dass solche Hefestämme nicht mehr auf Eisenmangelmedien mit ausschließlich veratembaren C-Quellen (EtOH und Glycerin) wachsen können. Dies liegt daran, dass solche Hefestämme Fet3 nicht mehr mit Kupfer beladen können, und somit unter Eisenmangelbedingungen kein Eisen aufnehmen können. Hieraus folgt wiederum, dass die eisenabhängigen Proteine der Atmungskette nicht funktionsfähig sind. Hefe besitzt kein endogenes Laccase-Gen, exprimiert aber mit der Eisenoxidase Fet3 ein homologes Protein mit einem homologen aktiven Zentrum. Hefe ist daher und aufgrund der Tatsache, dass Mutanten fast aller Gene leicht zu beschaffen sind, ein idealer Organismus um Gene aus *T. versicolor* durch Komplementation zu isolieren und deren Funktion zu testen.

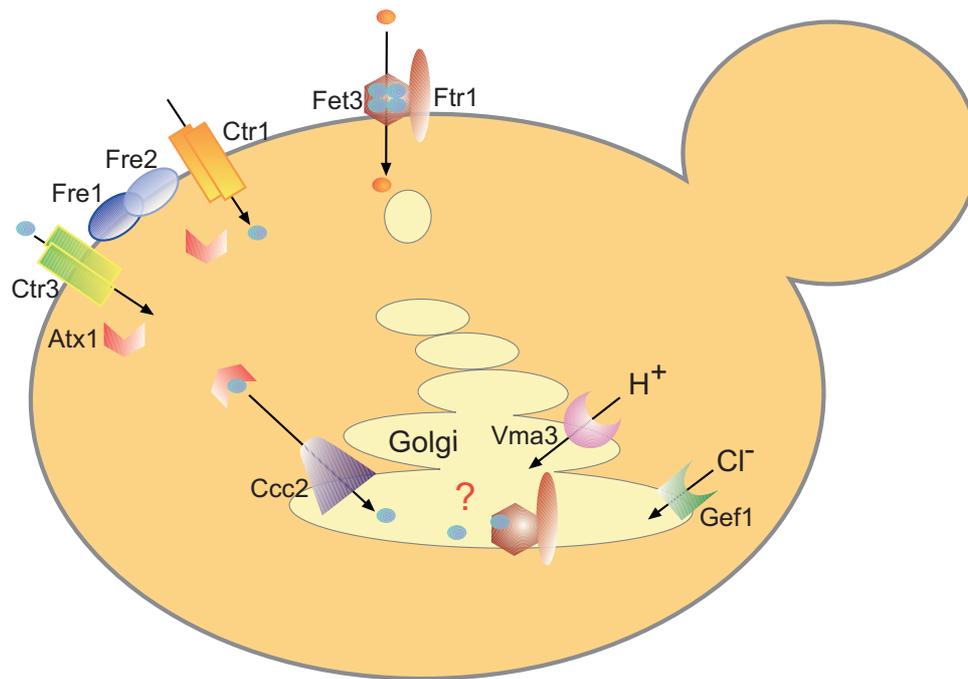


Abb. 1-4: Beladung der blauen Eisenoxidase Fet3 im Golgi-Systems von *S. cerevisiae*. Kupfer wird zuerst von Cu(II) zu Cu(I) durch die Metallreduktasen Fre1/Fre2 reduziert. Die hoch-affine Kupferaufnahme wird dann von Ctr1 und Ctr3 durchgeführt. In der Zelle bindet das Kupfer an das Kupferchaperon Atx1 das Cu(I) dann zu der im Golgi inserierte Kupfer-P-Typ-ATPase Ccc2 bringt. Diese pumpt das Kupfer in das Golgi-Lumen wo es auf noch nicht geklärt Weise in apo-Fet3 eingebaut wird. Vollständig beladenes Fet3 bildet dann zusammen mit der Eisenpermease Ftr1 das hoch-affine Eisenaufnahme-System. Zusätzlich wurden der Chloridkanal Gef1 und die Protonen-Pumpe Vma3 als wichtige Faktoren für eine effiziente Kupferbeladung von Fet3 beschrieben. Kupfer wird in der Abbildung als blau, Eisen als orange Kugeln dargestellt.

1.5.2 Regulation der Kupferhomeostasegene in *S. cerevisiae*

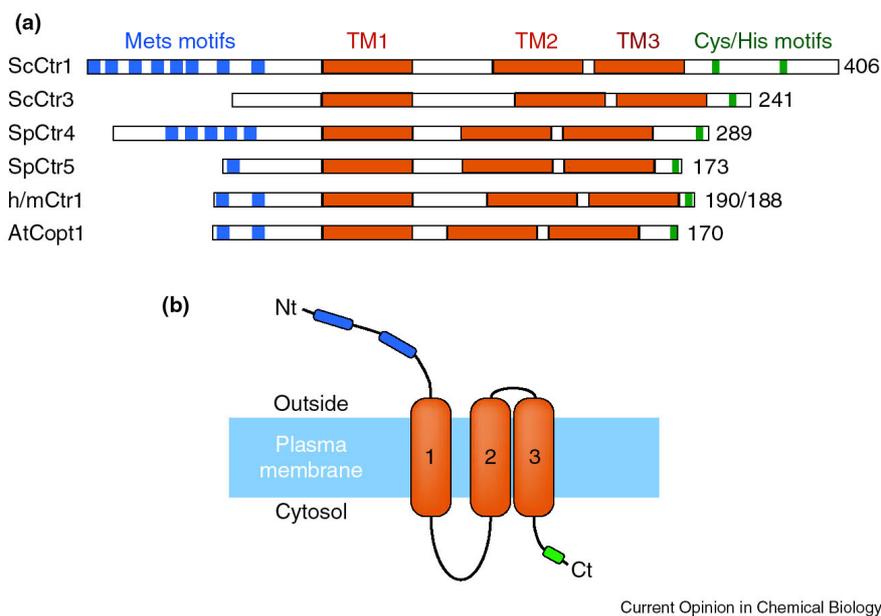
Wie oben bereits erwähnt, verlangt die einerseits essentielle andererseits toxische Natur der Kupferionen eine strenge Regulation der Kupferhomeostase, damit unter allen Lebensbedingungen der Zelle eine adäquate Menge des Spurenelements zur Verfügung steht. *S. cerevisiae* besitzt zwei kupferregulierte Transkriptionsaktivatoren, Mac1 und Ace1 (Jungmann et al. [1993]), welche die Expression von Genen aktivieren, deren Produkte die Kupferhomeostase aufrecht erhalten. Die Aktivität von Ace1 und Mac1 ist an den Kupferstatus der Hefezelle gekoppelt. Wenn die Zellen erhöhten Kupferkonzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$) ausgesetzt werden, bindet Kupfer an Ace1 und ermöglicht diesem an seine DNA-Bindestelle (MRE = Metall Response Element) zu binden. Ace1 aktiviert dabei diejenigen Gene, welche die Zellen vor der Giftigkeit der Kupferionen schützen sollen. Hierzu zählen die

Gene der Metallothioneine Cup1 und Crs1, sowie das *SOD1*-Gen (Gralla et al. [1991]; Culotta et al. [1995] und Jensen et al. [1996]).

Ist der Kupfergehalt in der Zelle zu niedrig gibt Mac1 Kupfer ab, wodurch es aktiv wird und dann die Gene *CTR1*, *CTR3* und *FRE1* aktiviert (Labbe et al. [1997]; Yamaguchi-Iwai et al. [1997]), deren Produkte für die hoch-affine Kupferaufnahme benötigt werden (siehe auch Abb. 1-3).

1.6 Kupferaufnahme in Eukaryonten - die Ctr-Familie

Gene, die für hoch-affine Kupferaufnahme Proteine ($K_M \approx 1-5 \mu M$) in Eukaryonten kodieren, wurden in *S. cerevisiae*, *S. pombe*, Säugetieren und Pflanzen durch genetische Analyse von Hefe, Komplementation von Hefe-Kupferaufnahmemutanten und durch Datenbankvergleiche identifiziert. Ein Vergleich dieser Proteine (Ctr-Familie) (Abb. 1-5) zeigt, dass alle diese Proteine drei Membrandomänen haben, die mehr oder weniger in einem hydrophoben Bereich liegen.



Current Opinion in Chemical Biology

Abb. 1-5: Struktur der Ctr-Proteinfamilie (aus Puig und Thiele [2002]): a) Vergleich der Proteine aus *S. cerevisiae* (ScCtr1, ScCtr3), *S. pombe* (SpCtr4, SpCtr5), Mensch (h/mCtr1) und *A. thaliana* (AtCopt1). Alle Ctr-Proteine enthalten drei Transmembrandomänen (TM1 – 3, orange). Die methioninreichen Motive (blau) bestehen aus drei bis fünf Methioninen, die in MxM und / oder MxxM Gruppen angeordnet sind. His/Cys Motive (grün) wurden im C-Terminus gefunden. b) Der methioninreiche N-Terminus (Nt) ist auf der Zellaußenseite der C-Terminus (Ct) innerhalb der Zelle lokalisiert.

Mit Ausnahme von Ctr3 aus Hefe haben alle Mitglieder der Ctr-Familie einen methioninreichen hydrophilen N-Terminus. Es wurde erst kürzlich gezeigt, dass diese MxxM- oder MxM-Motive an der Kupferbindung und Kupferaufnahme beteiligt sind (Puig *et al.* [2002]). Der C-Terminus birgt in allen Proteinen der Ctr-Familie ein Motiv mit Cystein bzw. Histidin. Aus biochemischen und mikroskopischen Untersuchungen von ScCtr1 und hCtr1 wurde geschlossen, dass die Proteine der Ctr-Familie oligomerisieren, und dass es sich dabei um Membranproteine handelt, wobei der N-Terminus auf der Zellaußenseite liegt (Abb. 1-5b) (Lee *et al.* [2002]; Dancis *et al.* [1994]; Puig *et al.* [2002]).

1.7 Kupferchaperone für das TGN - Atx1 und Homologe

Das Kupferchaperon Atx1 („anti oxidant“) wurde, wie oben erwähnt, als Suppressor für den Phänotyp einer SOD-defizienten Hefemutante isoliert (Lin und Culotta [1995]). Diese Eigenschaft ist allerdings auf die Überexpression zurückzuführen und hat wahrscheinlich nur einen untergeordnete physiologische Relevanz (Portnoy *et al.* [1999]). Atx1 transportiert Kupfer zum Trans-Golgi-Netzwerk und übergibt es dort an eine der beiden zu Atx1 homologen Kupferbindedomänen von Ccc2.

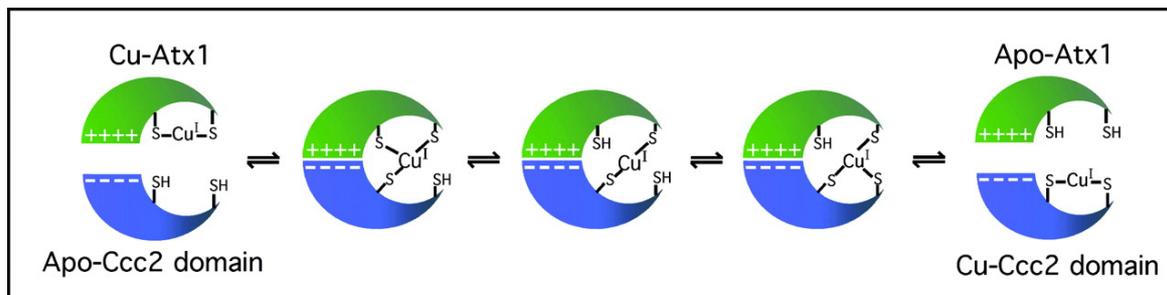


Abb. 1-6: Angenommener Mechanismus für die Kupferübertragung von Atx1 auf Ccc2 (aus O'Halloran und Culotta [2000]). In diesem Modell bindet das mit Cu(I) beladene Atx1 durch elektrostatische Interaktion positiv geladener Aminosäuren (lysinreiches Motiv) in Atx1 mit negativ geladenen Aminosäuren in Ccc2 an eine Apo-Metallbindestelle von Ccc2. Der Kupferaustausch erfolgt über einen Mechanismus in dem das Kupfer zuerst mit einem Cystein von der Akzeptor-MBS angegriffen wird. Dabei entsteht eine Reihe von zwei- und dreifach koordinierten Übergangszuständen des Cu(I), wobei schließlich die der Atx1-MBS durch die Cysteine der Ccc2-MBS ersetzt werden (Pufahl *et al.* [1997]).

Atx1 ist ein 73 AS langes cytosolisches Polypeptid, das am N-Terminus ein Metallbindemotiv (MBS für „Metall Binding Site“) MTCxxC birgt, das auch in anderen metallbindenden

Proteinen gefunden wurde (*Lin und Culotta* [1995]). Ein weiteres konserviertes Motiv ist ein lysinreicher Bereich am C-Terminus, der an der Interaktion mit Ccc2 beteiligt ist (*Rosenzweig und O'Halloran* [2000]). Weitere Untersuchungen von *Pufahl et al.* [1997] zeigten, dass pro Atx1-Molekül je ein Kupfer (Cu(I)) über die SH-Gruppe der beiden Cysteine der MBS gebunden wird, und dass die Interaktion mit Ccc2 von einer mit Kupfer beladenen MBS abhängig ist. Diese Koordination des an Atx1 gebundenen Kupferions ist sehr flexibel und lässt dadurch zusätzliche Bindungen, und damit unterschiedliche (zwei oder drei) Koordinationszahlen des Cu(I) zu. Diese Eigenschaft ist bei allen Kupferchaperonen vorhanden (*O'Halloran und Culotta* [2000]) und spielt eine Rolle bei der Übergabe des Kupfers von Atx1 an die Kupfer-P-Typ-ATPase Ccc2 (*Pufahl et al.* [1997]). Der Kupferaustausch erfolgt dabei über einen Mechanismus, bei dem das Kupfer zuerst von einem Cystein von der Akzeptor-MBS angegriffen wird. Dabei entsteht eine Reihe von zwei und dreifach koordinierten Übergangszuständen des Cu(I), wobei schließlich die Cysteine der Atx1-MBS durch die Cysteine der Ccc2-MBS ersetzt werden (siehe auch Abb. 1-6). Zu Atx1 homologe Proteine wurden aus dem Menschen (HAH1), aus *A. thaliana* (CCH) und aus *C.elegans* (CUC-1) isoliert (*Himmelblau et al.* [1998]; *Klomp et al.* [1997]). Alle haben die gleichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften wie Atx1.

1.8 Kupfer-P-Typ-ATPasen

P-Typ-ATPasen sind eine in allen Reichen weit verbreitete Proteinfamilie, die geladene Substrate (K^+ , Na^+ , H^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+}) unter ATP-Verbrauch durch Membranen pumpen, wobei die ATPase-Aktivität von der spezifischen Bindung des zu transportierenden Ions abhängt (*Moller et al.* [1996]). Ihre charakteristische Eigenschaft ist die Bildung eines phosphorylierten Zwischenprodukts während des Reaktionszyklus, was zum Namen P-Typ führte. Die Phosphorylierung findet an einem Aspartatrest statt, der sich in einem DKTGT-Motiv befindet, das in allen P-Typ-ATPasen konserviert ist (*Axelsen und Palmgren* [1998]). Aufgrund ihrer Substratspezifität werden die P-Typ-ATPasen in fünf Gruppen eingeteilt. Die Kupfer transportierenden P-Typ-ATPasen gehören in die Unterfamilie der P-Typ-IB-ATPasen, die hauptsächlich Schwermetalle pumpen (*Axelsen und Palmgren* [1998]). Gene, die für Kupfer-P-Typ-ATPasen kodieren, wurden unter anderem aus *E. hireae* (CopA und CopB), Mensch („Menkes Disease Protein“ [MNKP] und „Wilson's Disease Protein“ [WNDP]),

A. thaliana (RAN1) und *S. cerevisiae* (Ccc2 [„Ca²⁺-sensitive Cross Complementer“]) isoliert und charakterisiert (siehe Abb. 1-7).

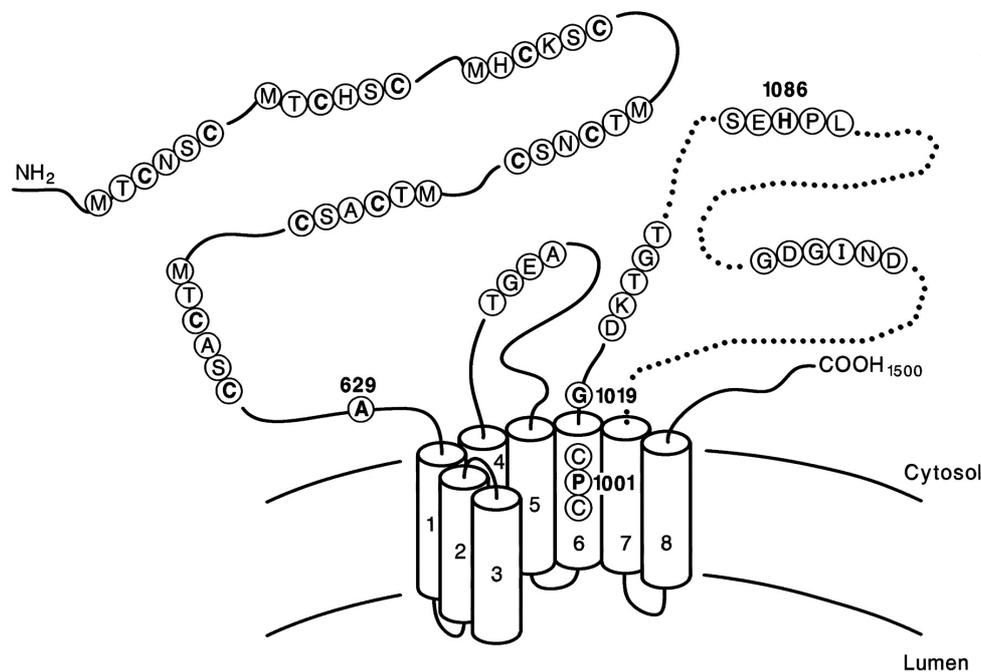


Abb. 1-7: Angenommenes, topologisches Modell des MNKP (aus Payne und Gitlin [1998]): Das Protein hat acht putative Membrandomänen. Im N-Terminus befinden sich sechs MTCxxC-Kupferbindemotive. Im Loop zwischen den Membrandomänen 4 und 5 liegt das Phosphatasemotiv TGEA. Die Motive DKTGT (Phosphorylierungsstelle), GDGxND (ATP-Bindestelle) und das noch nicht genauer definierte Motiv SEHPL befinden sich im Loop zwischen den Membrandomänen 6 und 7. In der Membrandomäne 6 befindet sich das CPC-Motiv, das an der Kupfertransduktion beteiligt ist.

In allen Fällen wurden acht Membrandomänen prognostiziert (Solioz und Vulpe [1996]), wobei sich das für die Kupfer-ATPasen spezifische CPC-Motiv in Membrandomäne 6 befindet. Dieses Motiv ist wahrscheinlich an der Kupfertransduktion beteiligt (Hung et al. [1997]). Weitere konservierte Motive befinden sich in der Schlaufe zwischen den Membrandomänen 6 und 7. So sind dort die bereits erwähnte Phosphorylierungsstelle DKTGT, die ATP-Bindestelle GDGxNDxP und ein SEHPL-Motiv, das auch am Kupfertransport beteiligt sein soll, lokalisiert. Im N-Terminus befinden sich eine (in CopA) bis sechs (in MNKP und WNDP) Kupferbindestellen mit der Konsensussequenz MTCxxC. Diese Motive interagieren mit den Kupferchaperonen (Atx1, HAH und CCH siehe oben) und übernehmen dabei das Kupferion (Pufahl et al. [1997]; Larin et al. [1999]; Hamza et al. [1999]). Die meisten eukaryontischen Kupfer-P-Typ-ATPasen sind im Trans-Golgi lokalisiert, in dessen Lumen sie das Kupfer pumpen. MNKP und WNDP sind bei hoher Kupferkonzentration auch an der Plasmamembran lokalisiert, wo sie vermutlich zur

Entgiftung der Zelle beitragen (*Hung et al.* [1997]; *Petris et al.* [1996]). Mutationen in den konservierten Motiven, welche die Funktion von MNKP oder WNDP beeinträchtigen, führen im Menschen zu schweren Kupferstoffwechselstörungen (*Llanos und Mercer* [2002]), die als Menkes- und Wilson-Krankheit bekannt sind (*Menkes* [1988]; *Cox* [1996]).

1.9 Zielsetzung

Das Enzym Laccase ist durch sein weites Substratspektrum und durch seine vielfältigen Einsatzzwecke in Prozessen wie Papier- oder Textilbleichung von großem biotechnologischen Interesse. Laccasen gehören zur Gruppe der blauen Oxidasen und haben vier Kupferionen im aktiven Zentrum. Der Basidiomycet *T. versicolor* erweist sich als ein gutes Expressionssystem für diese sekretierten kupferabhängigen Enzyme, da er sich gut in Kultur anziehen lässt und natürlicherweise große Mengen (0,1-1g/l) an aktiver Laccase bildet. Voruntersuchungen zur Laccase-Expression zeigten, dass die Kupferversorgung der Zellen einen starken Einfluss auf die Menge der sezernierten Laccase hat, selbst wenn diese überexprimiert wird. Es gibt allerdings kaum Untersuchungen zur Kupferhomeostase von höheren Pilzen und so gut wie keine Daten zum Kupfermetabolismus von *T. versicolor*. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Faktoren, welche das sekretorische Netzwerk des Pilzes mit Kupfer versorgen und den Kupfereinbau in die Laccase vermitteln, zu isolieren und zu charakterisieren.

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* stellt ein gut charakterisiertes genetisches System dar, in dem Mutanten leicht zu erzeugen sind. Zudem ist die Kupferhomeostase in *S. cerevisiae* gut untersucht. Deshalb wurde das Hefe als Modellorganismus verwendet, um in einem ersten Schritt die gesuchten Gene aus *T. versicolor* zu isolieren und funktionell zu charakterisieren.

In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob durch gezielte Überexpression bestimmter Kupferhomeostasegene aus *T. versicolor* die Expression der Laccasen gesteigert werden kann, um eine verbesserte und damit verbunden eine wirtschaftlichere Produktion dieser Enzyme zu erreichen.

Zusätzlich sollte durch biochemische Untersuchung zur Kupferbeladung einer gereinigten Apo-Laccase geklärt werden wie das Kupfer in das Enzym eingebaut wird.

Ein besseres Verständnis der Kupferhomeostase-Faktoren, der Bahnen von Kupferchaperonen und der Kupferverteilung in diesen höheren Pilzen wäre hilfreich, um Stämme herzustellen, die als bessere Laccase-Produzenten für die industrielle Produktion von Laccase geeignet sind.

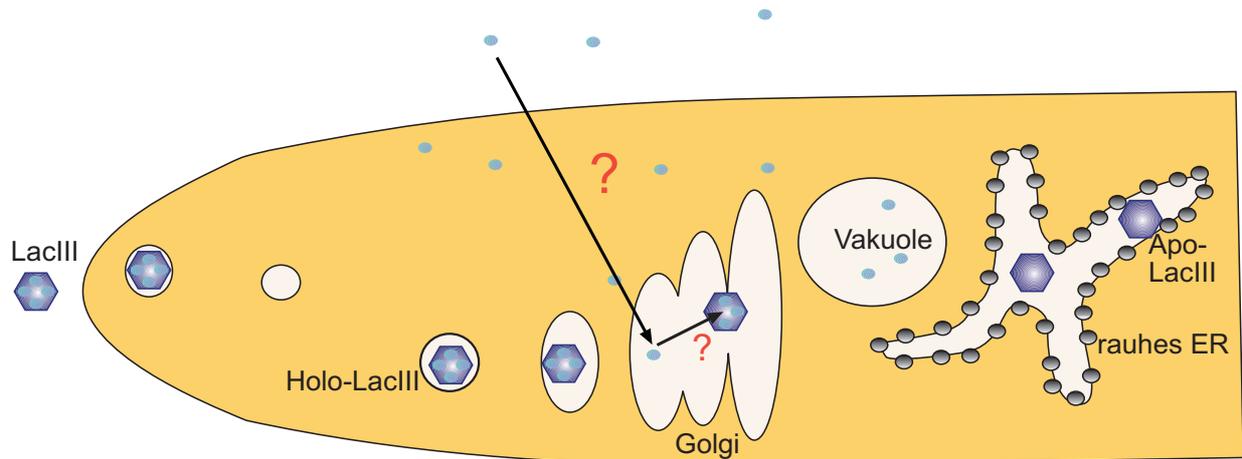


Abb. 1-8: Modell der Laccase-Biosynthese in einer Hyphe von *T. versicolor*: Die Laccase wird als Apo-Enzym ins ER synthetisiert und dann im Golgi-Netzwerk mit Kupfer beladen. Die Holo-Laccase wird dann an zur Hyphenspitze transportiert und dort ins Medium sezerniert. In dieser Arbeit sollte geklärt werden wie *T. versicolor* das Kupfer von der Zellaußenseite in das Golgi-Lumen transportiert und wie es dort in die Apo-Laccase eingebaut wird. Die Pfeile mit den roten Fragezeichen symbolisieren diese Fragestellung.

2 MATERIAL

2.1 Geräte

Filmentwicklermaschine	Amersham, Hyperprocessor
Gelelektrophorese-Apparaturen	Hybaid, BioRad
Westernblot-Apparaturen	BioRad
Elektroporator	Gene Pulser, BioRad
Brutschrank	WTC Binder
Geldokumentation	Eagle Eye II, Stratagene
Photometer	UVIKON Spektrometer, Kontron
Reaktionsgefäß-Schüttler	Eppendorf-Thermomixer 5437
Hybridisierungsöfen	Bachofer
Membran-Inkubationsautomat	Jobo MCR 3000 (Spezialanfertigung)
Thermo Cycler	FTS-4000 Capillary Fast Thermal Sequenzer Vers. V1.0, CORBETT RESEARCH
Phosphor-Imager	Storm 860, Molecular Dynamics
Phosphor-Screen	Kodak Storage Phosphor Screen
Schüttelinkubatoren	Ikamag IKA-Vibrax-VXR,
Spannungsgeräte	Consort E321, 433, 734
Szintillationszähler	Beckmann LS 6800
Ultraschall-Gerät	Branson Sonifier 250
Ultraturrax	DIAX 900 Heidolph
Vakuum-Konzentrator („speed-vac“)	Bachofer
Zentrifugen	Centrifuge 5417, Eppendorf MinifugeRT, Heraeus RC 26 Plus, Sorvall Hettich, Rotonda RT
Vortex	Vortex-Genie, Scientific Industries

2.2 Software

Mac Molly Tetra Software Paket	Soft Gene Berlin
Image Quant	Molecular Dynamics
Gene Construction Kit	Textco, Inc.
Gene Inspector	Textco, Inc
Clustal X	NCBI
GenDoc	Nicholas, K.B. und Nicholas H.B. Jr. 1997 GeneDoc: http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml

2.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Papiere	3MM Whatman® Chromatographie-Papier
PVDF-Membran	ImmunoBlot (0,2 µ) ,BioRad; Poly Screen®, NEN®
Elektroporationsküvetten	BioRad, Eurogentec
Kunststofffolie	Saran Wrap, Dow
Mikrotiterplatten (versch. Größen)	Greiner
Nylonmembranen	Hybond-N+, Amersham
Parafilm	American National Can
Pipettenspitzen	Peske
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf Safe-Lock
Röntgenfilme	Kodak X-omat, Bio-max
Sterilfilter (0,22 µm Durchmesser)	Millipore
Zellkultur-Flaschen (versch. Größen)	Greiner
Petrischalen	Peske
Rundbodenröhrchen 15 ml	Peske
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Peske

2.4 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> TOP10F'	F' {lacI ^q Tet ^R }, <i>mcrA</i> , D(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), <i>f80lacZDM15</i> , <i>DlacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , D(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen BV Niederlande
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , [F' <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>lac</i> ^q ZDM15, Tn10(<i>tet</i> ^r)]	Bullock <i>et al.</i> , 1987
<i>E. coli</i> XL1-blue MRF'	D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q ZDM15 Tn10 (<i>tet</i> ^r)]	Stratagene
<i>E. coli</i> XL0LR	D(<i>mcrA</i>)183 D(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac</i> ^q ZDM15 Tn10 (<i>tet</i> ^r)] Su ⁻ (nonsuppressing) I ^r (lambda resistant)	Stratagene

2.5 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz	Quelle
W303-1A	Mat α , <i>ade2-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>his3-11</i> , <i>trp1-1</i> , <i>leu2-3,2-112</i> , <i>can1-100</i> , <i>rad5-535</i>	Thomas und Rothstein, 1989	Prof. Bandlow, München
CenPK2a	Mat α , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp1-289</i> , <i>his3-Δ1</i> , MAL2-8c, MAL3, SUC3, GAL	Prof. K.-D. Entian, Frankfurt/M	Prof. H. Domdey, München
YPH250	Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i>		Valleria Culotta Baltimore (MA)
SL215	Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>atx1::LEU2</i>		Valleria Culotta Baltimore (MA)
Strain 3	Mat α , <i>ura3-52</i> , <i>lys2-801</i> , <i>ade2</i> , <i>trp1-Δ1</i> , <i>his3-Δ200</i> , <i>leu2-Δ1</i> , <i>ccc2Δ::URA3</i>		Valleria Culotta Baltimore (MA)

AH22	Mat a, <i>leu2-1</i> , <i>his4</i> , <i>ura-Δ3</i> , [KTa]		Christine Lang, TU Berlin
CM3260	Mat a, <i>leu2-3,122</i> , <i>his3-609</i> , <i>trp1-63</i> , <i>ura3-52</i> , <i>gcn4-101</i>	D. Winge Salt Lake City	Dennis Winge Salt Lake City
BY 4741 ΔYPR 124 w	Mat a, <i>his3-Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> YPR 124 w::kanMX4	EUROSCARF	EUROSCARF
BY 4741 ΔYEL 027 w	Mat a, <i>his3-Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , YEL 027 w::kanMX4	EUROSCARF	EUROSCARF
BY 4741	Mat a, <i>his3-Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>met15Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	EUROSCARF	EUROSCARF
EG103	Mat α, <i>leu2-3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp289a</i> , <i>his3-112Δ1</i> , GAL+		Valleria Culotta Baltimore (MA)
SL103	Mat α, <i>leu2-3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp289a</i> , <i>his3-112Δ1</i> , GAL+, <i>atx1Δ::LEU2</i>		Valleria Culotta Baltimore (MA)
SL133	Mat α, <i>leu2-3</i> , <i>ura3-52</i> , <i>trp289a</i> , <i>his3-112Δ1</i> , GAL+, <i>atx1Δ::LEU2</i> , <i>sod1Δ::URA3</i> , <i>sod2Δ::TRP1</i>		Valleria Culotta Baltimore (MA)

2.6 Trametes versicolor Stämme

<i>T. versicolor</i> DSM 3086	Wildtyp (TV1) Dikaryon	Consortium für Elektrochemische Industrie
<i>T. versicolor</i> F6-79	Monokaryon	Consortium für Elektrochemische Industrie
<i>T. versicolor</i> F6-79 B11	Monokaryon Δ <i>pyrG</i>	Consortium für Elektrochemische Industrie
<i>T. versicolor</i> F2-100	Monokaryon	Consortium für Elektrochemische Industrie
<i>T. versicolor</i> F2-100 C4-8	Monokaryon Δ <i>pyrF</i>	Consortium für Elektrochemische Industrie

<i>T. versicolor</i> SP4	Monokaryon (aus Sporulation von TV1)	Arbeitskreis
<i>T. versicolor</i> SP17	Monokaryon (aus Sporulation von TV1)	Arbeitskreis
<i>T. versicolor</i> SP21	Monokaryon (aus Sporulation von TV1)	Arbeitskreis

2.7 Plasmide, Phagenbank und cDNA-Banken

Beschreibungen und Ursprung der verwendeten Plasmide sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

Plasmidbezeichnung	Referenz	Quelle
pJG4-5	<i>Zervos et al.</i> [1993]	Arbeitskreis
pUC19	<i>Yanisch-Perron et al.</i> [1985]	Arbeitskreis
gPura	Consortium für elektrochemische Industrie GmbH	Consortium für elektrochemische Industrie GmbH
pZero TM -2	Invitrogen Cooperation, 1995	Arbeitskreis
pCR2.1	Invitrogen	Invitrogen
λZAP Express [®] Vektor	Stratagene	Stratagene
λZAP Sau3a <i>T. versicolor</i> Genbank	Consortium für elektrochemische Industrie GmbH	Consortium für elektrochemische Industrie GmbH
pBK-CMV	Stratagene	Stratagene
pYEX-S1	Clontech	Clontech
pAU ⁻ pAH ⁻ pAT ⁻ pAL ⁻	Dissertation Mai, Bernd, München	Mai, Bernd, München
pAHtahA	diese Arbeit	diese Arbeit

pATctaA	diese Arbeit	diese Arbeit
pAUcupA	diese Arbeit	diese Arbeit
pALcupB	diese Arbeit	diese Arbeit
PlacP2	diese Arbeit	diese Arbeit
pCR2.1gcta	diese Arbeit	diese Arbeit
pJG4-5-cDNA-Bank	diese Arbeit	diese Arbeit
pAH ⁻ -cDNA-Bank	diese Arbeit	diese Arbeit
pAT ⁻ -cDNA-Bank	diese Arbeit	diese Arbeit

2.8 Chemikalien und Kits

Plasmid Präparations Kits	Qiagen oder Machery&Nagel
Gel Extraction Kit	Qiagen
cDNA Synthese Kit	Stratagene
TRizol Reagent	Gibco BRL
ABTS, 2,2'- Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	Sigma
BCS, Bathocuproindisulfonsäure	Sigma
Ferrozin,	Sigma
Paraquat	Sigma
DABA, 4-Dimethylaminobenzaldehyd	Aldrich
2,5-Dimethylanilin (Xylidin)	Aldrich
Cu(I)tetrakis(acetonitril)hexafluorophosphat (Cu-tetrakis)	Aldrich

Alle anderen Chemikalien und Medienbestandteile wurden von Sigma, Aldrich, Fluka, Merck, Difco, Roth, ICN Biomedicals GmbH oder Riedel de Haen als Feinchemikalie bezogen.

2.9 Enzyme

Polynucleotid Kinase	New England Biolabs
T4 Ligase	New England Biolabs
Klenow Fragment	New England Biolabs
S1 Nuclease	Amersham Pharmacia
Restriktionsenzyme	Roche, MBI Fermentas, New England Biolabs
Pfu-DNA-Polymerase	Promega
Pwo-DNA-Polymerase	Roche
High Fidelity PCR System	Roche
Taq-DNA-Polymerase	Roche
Alkaline Phosphatase SAP	Roche
Lysing Enzyme aus <i>T.harzianum</i>	Sigma
Lyticase	Sigma

2.10 Medien

2.10.1 *E. coli* Medien

LB (Luria-Bertani) Medium und Platten	1,0 %	Trypton
	0,5 %	Yeast Extrakt
	1,0 %	NaCl
		pH 7,0
	+1.5 %	Agar (für Platten)
Zusätze	100 µg/ml	Ampicillin
	50 µg/ml	Kanamycin
	250 µg/ml	IPTG
	60 µg/ml	X-Gal
	20 µg/ml	Tetracyclin

SOC Medium	2,0 %	Trypton
	0,5 %	Yeast Extract
	10 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
SOB Medium		SOC Medium
	+20 mM	Glukose
NZY Medium und Platten	0,5 %	NaCl
	0,2 %	MgSO ₄ · 7H ₂ O
	0,5 %	Yeast Extract
	1,0 %	NZ Amin (Casein hydrolysate)
		pH 7,5
	+2 %	Agar (für Platten)
NZY Top Agar		NZY Medium
	+0,7 %	Agarose

Für die Selektion wurde den Medien entweder 100 µg/ml Ampecillin oder 100 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Tetracyclin zugesetzt.

2.10.2 Hefemedien

Vollmedium YPD	1 %	Hefeextrakt
	2 %	Bactopepton
	2 %	Glukose (getrennt autoklaviert als 10x Stammlösung)
	1,5 %	Agar (für Platten)
SC-Medium: <i>Guthrie, C. und Fink, G.R., 1991</i>	0,67 %	Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids (Difco)
	2 %	Glucose (getrennt autoklaviert)
	2 %	Agar (für Platten)
	+ 2,0 g/l	Aminosäuren- und Nukleoside Mix (siehe Tabelle unten)

Adeninsulfat*	0,5 g	L-Leucin*	4,0 g
L-Alanin	2,0 g	L-Lysin	2,0 g
L-Arginin	2,0 g	L-Methionin	2,0 g
L-Asparagin	2,0 g	p-Aminobenzoesäure	0,2 g
L-Aspartat*	2,0 g	L-Phenylalanin	2,0 g
L-Cystein	2,0 g	L-Prolin	2,0 g
L-Glutamin	2,0 g	L-Serin	2,0 g
L-Glutamat	2,0 g	L-Threonin	2,0 g
Glycin	2,0 g	L-Tryptophan*	2,0 g
L-Histidin*	2,0 g	L-Tyrosin	2,0 g
myo-Inositol	2,0 g	Uracil*	2,0 g
L- Isoleucin	2,0 g	L-Valin	2,0 g

*wurden je nach Transformationsansatz nicht zugegeben, um auf das entsprechende Plasmid selektionieren zu könne. Zur Selektion auf das Kanamycin-Gen als Selektionsmarker für Plasmide und Disruptionen wurden dem Vollmedium 300 µg/ml aktives Geneticin (G418) zugesetzt.

2.10.3 Medien für *Trametes versicolor*

Malz-Medium (Merck)	30 g	Malzextrakt
	3 g	Pepton aus Sojamehl
	ad 1 l	H ₂ O
	10 min, 121 °C	autoklavieren
Vorkulturmedium oder	20 g	Glucose
Minimal-Medium (MM)	1 g	KH ₂ PO ₄
	0,5 g	MgSO ₄
	0,1 g	Na ₂ HPO ₄
	27,5 mg	Adenin
	0,15 g	DL-Phenylalanin
	2,5 g	L-Asparagin
	10 mg	CaCl ₂
	10 mg	FeSO ₄

	2 mg	CuSO ₄
	1 mg	ZnSO ₄
	1 mg	MnSO ₄
	ad 1 l	H ₂ O
	pH 5,0	mit H ₂ SO ₄ einstellen
Hauptkulturmedium		Wie MM-Medium statt L-Asparagin wird Glutaminsäure verwendet
Minimal-Saccharose-Medium (MMS)		MM-Medium, zusätzlich mit 0,6 M Saccharose
Topagar (MMS)		MMS-Medium, zusätzlich mit 0,7 % Agar

Für jeweilige Platten werden noch 1,5 % Agar zugegeben.

In alle Medien wurde Thiamin zugegeben. Uridin wurde bei der Anzucht der uridinauxotrophen *T. versicolor* Stämme zugegeben.

2.11 DNA und Protein Molekulargewichtsstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermenters), Lambda DNA mit Eco 130 I geschnitten, Smart Ladder (Eurogentec) und 1 kb DNA Ladder (Gibco)

Protein Standard Low Range Prestaind (BioRad), Precision Protein Standard® (BioRad) und Polypeptide SDS-PAGE Standard (BioRad)

2.12 Synthetische Oligonukleotide

ATX-Ord	5'-GTC GNN ATG ACC TGC-3'
ATX-RevCo	5'-CTT RCC GGT CTT-3'
cTAH-FW	5'-ACC ATG TCC GAG CAC ATC TAC-3'
cTAH-RV	5'-GA TCA TAC CAC CGT CTC TCC-3'

gTAH-FW	5'-ACC ATG TCC GAG CAC ACT TAC-3'
gTAH-RV-Not	5'-GAT CAT ACC ACC GTC TCT CC-3'
TCC1-Ord	5'-GCT GAA GAA GAC GGA CGG TGC-3'
TCC1-RevCo	5'-GTC GTC GTA CGG AAT CGT GCC-3'
pJG4-5Forw	5'-TTG CTG AGT GGA GAT GCC TCC-3'
pJG4-5Rev	5'-TGG AGA CTT GAC CAA ACC TCT G-3'
T7 Promotor	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T3 Promotor	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
SP6 Promotor	5'-AT TTA GGT GAC ACT ATA-3'
M13(-40) Forward Primer	5'-GTT TTC CCA GTC ACG A-3'
M13 Reverse Primer	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
21Cb	5'-AGC ACG TTG TAC AGG CAC-3'
21Nb	5'-TCA CGA AGA CGC GAC TCA G-3'
34Nb	5'-ATC AAG AAG ACG CGA CTC AG-3'
34Cb	5'-CCG GAT CGT CGT GAA GAT C-3'
21/34Cf	5'-CTA TCC GTT CTA CCA GCT C-3'
34Nf	5'-GTG TCT CTA CAA CGT GCT G-3'
21Nf	5'-TGC CTG TAC AAC GTG CTC-3'
34Ne	5'-CGT CGA TAC ATG CGA TCA G-3'
21Ne	5'-TCG TCG ATA CAC GCG ATC A-3'
34Ce	5'-AAG CGC CAT GAG ATC AGT C-3'
21Ce	5'-CGC CTA TGG AGT AGA TGT AC-3'
34Nd	5'-GAA GAA CGG GAT CCT GAT C-3'
21/34Cd	5'-CTT GAT CAG GAT CCC GTT C-3'
21/34Nc	5'-CAC GCA GGA GAA GAA GAT C-3'
21Cc	5'-CGA CGA AGA GCG TGC ATT G-3'
34Cc	5'-CGA CGA ATA GCG TGC ACT G-3'
cta-fw	5'-TTT CGA TGC TAC TCT CAT ACC-3'
cta-rv	5'-CGA TCC GCT TGA TAA ATC GAC-3'
gCta-fw	5'-GAA TGC TGA AGT CGG GAG AAG C-3'
gCta-rv	5'-GAA GTT GAA CAT CCC GTG TGA C-3'

gCta-fw2	5'-CAG TAA TAT TGA ACT CAG CG-3'
gCta-rv2	5'-GAA TAT TCG TAC TCA CCT TC-3'
gcta-ATG	5'-ACC ATG GCG GGC CTT TC-3'
172-N1	5'-CAT ATA GCA CAT TGG GGT AC-3'
ADH-L	5'-CTG CAC AAT ATT TCA AGC-3'
ADH-R	5'-CTT GAC CAA ACC TCT GGC G-3'
g421-N1	5'-GCA AGA CTC CAT TGG AAG C-3'
521A-C2	5'-CAG CAC GAG ACG ATG TTC G-3'
532-N2	5'-TAT TGG AAC ACG GTC TCG G-3'
gCta-fw3	5'-ACC ATG GCG GGC CTT TC-3'
Pgap	5'-CGC TGG GCG GGT AGC GT-3'
gapA	5'-CGG ATT GGG CGA GAT TAG G-3'
tahE	5'-TTC GAA CAC GGG AAC CTA TC-3'
Ctakont	5'-CCG ATG ATC TTG TCT GCA TC-3'
pYEX-S1-forw	5'-CGT AGT TTT TCA AGT TCT TAG-3'
CCC2ord	5'-ACG AAA TGA GAG AAG TGA TAC-3'
gcta-C1	5'-TTA TCA AGC GGA TCG CTC TC-3'
gcta-O1	5'-AGG ATT GAT GAC CTT GAT GC-3'
gcta-R1	5'-CTA ACC TGT ATC GGC GTA G-3'
gCtaN1	5'-CAC GTC GCA TTT CTC TGA C-3'
S1-tahA	5'- GTA AGT GTG CTC GGA CAT GGT GTA TAT CGG TTC AAG AGG CGG GGG ATG AAC CAG GGG GTG CGA GGC AGA AGt CAG TCA GCA -3'
S1-gapDH	5'- GTG GGC GTG CGA GGA GTC CCA AGA GGC CGT TGA ATG CGG CAG AAA GGC CCG CCA TTC AGT CAG CA-3'

2.13 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA
TAE (50x)	242 g Tris-Base, 57 ml Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA, mit HCl auf pH 8,3 titriert - ad 1 l H ₂ O
TBE (10x)	108 g Tris-Base, 55 g Borat, 40 ml 0,5 M EDTA, mit HCl auf pH 8 titriert - ad 1 l H ₂ O
10x PBS	Lösung A: 250 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,25 mM NaCl Lösung B: 250 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,25 mM NaCl Lösung B wird zu Lösung A gegeben, bis gewünschter pH erreicht wird.
SSC (20x)	175 g NaCl, 88 g Na-Citrat dihydrat, mit HCl auf pH 7 titriert- ad 1 l H ₂ O
Mac Ilvaine	100 mM Citrat mit 0,2 M Na ₂ HPO ₄ auf pH 4,5 titriert
Tris-Glycin (10x)	30,2 g Tris-Base, 188 g Glycin, pH 8,3 - ad 1 l H ₂ O

3 METHODEN

3.1 Kultivierung der Mikroorganismen

3.1.1 Anzucht von *E. coli*

3.1.1.1 Vermehrung in Flüssigkultur

Die Anzucht von *E. coli* in Flüssigkulturen erfolgte in sterilem LB-Medium das mit einer Impföse entweder aus einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer Platte beimpft wurde. Wenn nötig, enthielt das Medium zur Selektion ein Antibiotikum (jeweils 100 µg/ml Ampicillin oder Kanamycin bzw. 50 µg/ml Tetracyclin). Die Kulturen wurden mindestens sechs Stunden, meist aber über Nacht, bei 37 °C in einem Schüttler (200 Upm) inkubiert. Die Bakteriendichte wurde photometrisch bei 600 nm bestimmt.

$$OD_{600} = 1 \text{ entspricht } 8 \times 10^8 \text{ Zellen/ml}$$

3.1.1.2 Anzucht auf Agarplatten

Bakterien aus einer Glycerin- oder Flüssigkultur wurden mit einem Drygalski-Spatel, Glaskugeln oder einer Impföse auf sterile LB-Platten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dem Medium war nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55 °C das zur Selektion benötigte Antibiotikum zugesetzt worden.

3.1.1.3 Stammhaltung

Zur kurzfristigen Aufbewahrung wurden mit Parafilm verschlossene Platten mit dem Deckel nach unten bei 4 °C für mehrere Tage gelagert. Für Dauerkulturen wurden 5 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (5000 Upm/5 min, Heraeus) und in 1 ml 50 % LB/50 % Glycerin aufgenommen und bei - 80 °C gelagert.

3.1.2 Anzucht von *Trametes versicolor*

3.1.2.1 Anzucht und Stammhaltung auf Festmedium

Das Mycelium von *Trametes versicolor* wurde auf Malz-Agar bzw. MM-Agar Platten aufgebracht und bei 28 °C inkubiert. Nach vier bis sieben Tagen bildete sich eine dichte Myceliumschicht. Die Platte mit dem Mycel wurde mit Parafilm verschlossen und konnte bei 4 °C gelagert werden. Mindestens einmal pro Jahr sollte das Mycel auf frischen Malz-Agar überimpft werden.

3.1.2.2 Standvorkultur

50 ml autoklaviertes Malzmedium wurden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit 3 µg/ml Thiamin versetzt. In dieses Medium wurde ca. 1 cm² Mycel von einer Malz-Agarplatte gegeben und die Standvorkultur sieben Tage bei Raumtemperatur (oder im Brutschrank bei 28 °C) inkubiert, bis sich ein dichter Mycelrasen auf der Oberfläche gebildet hatte.

3.1.2.3 Schüttelvorkultur

Fünf Standvorkulturen wurden in einem 300 ml Erlenmeyerkolben vereinigt (250 ml Gesamtvolumen), mit 3 µg/ml Thiamin versetzt und mit einem Ultra-Turrax 1 min mit 9 500 Upm homogenisiert. Mit 20 ml der homogenisierten Standvorkultur wurden 300 ml steriles Vorkulturmedium angeimpft. Die Vorkultur wurde sieben Tage bei 28 °C und unter Schütteln bei 100 Upm inkubiert. Die nicht benötigte Standvorkultur kann mindestens einen Monat bei 4 °C gelagert werden.

3.1.2.4 Hauptkultur

Drei Schüttelvorkulturen wurden in einem 1 l Erlenmeyerkolben (900 ml Gesamtvolumen) vereinigt, mit 3 µg/ml Thiamin versetzt und mit einem Ultra-Turrax 1 min mit 9 500 Upm homogenisiert. 300 ml steriles Hauptkulturmedium wurden mit 20 ml der homogenisierten Schüttelvorkulturen angeimpft. Die Hauptkultur schüttelt vier Tage bei 28 °C und 100 Upm.

Die restliche Schüttelvorkultur kann mindestens einen Monat bei 4 °C gelagert werden, um weitere Hauptkulturen anzuimpfen.

3.1.3 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

3.1.3.1 Anzucht auf Agarplatten

Aus Glycerin- oder Flüssigkulturen wurden mit einer sterilen Impföse die Hefen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Flüssigkulturen konnten nach geeigneter Verdünnung auch direkt ausplattiert werden. Die Platten wurden im Brutschrank bei 30 °C für 2 bis 10 Tage inkubiert..

3.1.3.2 Vermehrung in Flüssigkultur

Fünf bis 20 ml des entsprechenden Selektionsmediums wurden mit einer Einzelkolonie von einer Kulturplatte angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln (200 Upm) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde in frischem Medium auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt und unter Schütteln weiter bei 30 °C inkubiert. Je nach der weiteren Verwendung der Hefen wurden sie bei unterschiedlichen OD_{600} -Werten geerntet. Für Transformationen sollten sich die Stämme in der frühen logarithmischen Wachstumsphase befinden, d. h. sie wurden bei einer OD_{600} zwischen 0,6 und 0,8 geerntet. Für die Herstellung von Proteinextrakten konnten die Hefezellen bis zu einer OD_{600} von 3 wachsen. Die stationäre Wachstumsphase von Hefen wird erst nach 48 Stunden erreicht.

3.1.3.3 Stammhaltung

Übernachtskulturen der verschiedenen Hefestämme wurden im Verhältnis 1:1 mit 100 % igem Glycerin vermischt und bei -80 °C eingefroren. Glycerinkulturen können auch von Plattenkulturen angelegt werden. Dazu wurden die Hefen auf einer Selektionsplatte dicht ausgestrichen. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 30 °C wurde der Zellrasen abgeschabt, in 50 % igem Glycerin suspendiert und bei -80 °C eingefroren. Glycerinkulturen sind bei -80 °C für mehrere Jahre haltbar.

Plattenkulturen konnten, mit Parafilm umwickelt, bei 4 °C für mehrere Wochen gelagert werden.

3.1.3.4 Tropftitertest

Eine Übernachtskultur der Hefe wurde mit Wasser auf eine OD_{600} von 0,2 eingestellt. Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe in Wasser bis 10^{-5} angelegt. Jede Verdünnungsstufe wurde gut gemischt bevor für die nächste Verdünnungsstufe die Zellsuspension entnommen wurde. Von den Verdünnungsstufen wurden je 5 μ l auf markierte Stellen einer Wachstumsplatte bzw. Testplatte aufgetropft. Nachdem die Zellsuspension eingetrocknet war wurden die Platten bei der 30 °C für 2 – 5 Tage inkubiert.

3.2 Isolation von DNA

3.2.1 Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli*

3.2.1.1 Alkalischer Schnellaufschluss

Das Protokoll von *Birnboim und Doly* [1979] für die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurde folgendermaßen modifiziert.

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (20 000 x g , 2 min , RT). Das Bakterienpellet wurde in 50 μ l TE resuspendiert. Dann wurden 100 μ l Puffer I (200 mM NaOH, 1 % SDS) und nach fünfminütiger Inkubation bei RT 400 μ l Puffer II (1 M NaOAc pH 4,8, 0,5 M NaCl) zugegeben. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde der entstandene Niederschlag abzentrifugiert (20 000 x g , 5 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Plasmid DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 200 μ l 70 % igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 50 μ l TE-Puffer + 100 μ g/ml RNase aufgenommen und die Plasmid-DNA in dieser Form für Restriktionsspaltungen verwendet.

3.2.1.2 Plasmidreinigung über kommerzielle Plasmid Kits

Die Präparation größerer und sauberer Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mittels der Plasmid reinigungs Kits von Qiagen und Macherey-Nagel nach den Protokollen der Hersteller.

3.2.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

3.2.2.1 Zentrifugation durch Glaswolle

Zunächst wurde ein Eppendorfgefäß mit einer Kanüle im Boden durchbohrt und dann mit silikonisierter Glaswolle etwa zu einem Drittel gefüllt. Auf die Glaswolle wurde das Gelstückchen gelegt aus dem die DNA isoliert werden sollte. Dieses Eppendorfgefäß wurde dann auf ein zweites gesteckt und zentrifugiert (6 000 Upm, 5 min, RT, Tischzentrifuge). Im unteren Gefäß befand sich nach der Zentrifugation die wässrige DNA-Lösung, die dann zur weiteren Verwendung phenolisiert und gefällt werden konnte.

3.2.2.2 Extraktion der DNA mit dem „Gel Extraction Kit“ von Qiagen

DNA Fragmente wurden aus Gelstücken mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

3.2.3 Isolation von DNA aus *Trametes versicolor*

Das Protokoll von *Reader und Broda* [1985] zur Schnellpräparation von DNA filamentöser Pilze wurde für die Präparation genomischer DNA aus *T. versicolor* folgendermaßen modifiziert:

Eine Flüssighauptkultur von *T. versicolor* wird durch Gaze filtriert und zwischen Zellstofftüchern ausgedrückt, um so viel Flüssigkeit wie möglich zu entfernen. Acht g des halbtrockenen Myceliums wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, unter flüssigem Stickstoff im Mörser fein zerrieben und in zwei 50 ml Greinerröhrchen überführt. Nach Zugabe jeweils von 25 ml Extraktionspuffer (200 mM, TrisHCl pH 8,5, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 0,5 % SDS) wurden die Zellen unter Rühren und Erwärmen auf 60 °C resuspendiert. Dann wurde die DNA mit einem Volumen eines TE-gesättigten Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) extrahiert und eine Stunde bei 4 500 Upm (Hettich) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit 1 ml RNase A Lösung (20 µg/ml) versetzt und zur Entfernung von Phenolresten einmal mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Anschließend zentrifugierte man noch einmal 10 min bei 4 500 Upm (Hettich). Der wässrige Überstand wurde

abgenommen und zur Fällung der gelösten DNA mit 0,54 Volumen Isopropanol versetzt. Die DNA präzipitierte in Schlieren, wurde auf eine Plastikimpföse aufgewickelt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die restliche DNA wurde durch 5 min zentrifugieren bei 4 500 Upm pelletiert, einmal mit 70 % igem Ethanol gewaschen und kurz getrocknet. Beide Ansätze wurden mit je 1,5 ml TE versetzt und über Nacht bei 65 °C gelöst.

3.2.4 Isolation von Plasmiden aus *Saccharomyces cerevisiae*

Aus 5 ml Übernachtskultur transformierter Hefen konnte genügend Plasmid-DNA isoliert werden, um diese für weitere Analysen in Bakterien zu retransformieren.

Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (4 000 Upm, 10 min, Hettichzentrifuge), mit Wasser gewaschen, in 100 µl Lysispuffer (100 mM, Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA), dem zusätzlich 100 µM β-Mercaptoethanol zugesetzt worden war, aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und in 50 µl Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 100 Units Lyticase (Sigma) wurden die Zellen für 45 bis 60 min bei 37 °C inkubiert. Zwischendurch wurden die Zellen immer wieder gemischt. Sobald die Suspension durch die Lyse der Zellen viskos wurde, wurde der Ansatz mit 1/10 Vol. 10 % igem SDS versetzt, gemischt und für 15 min bei 65 °C inkubiert. Der Ansatz wurde mit 150 µl 5 M KOAc pH 4,8 neutralisiert, und für 30 min auf Eis inkubiert. Dadurch wurde das SDS mit den Proteinen und der genomischen DNA gefällt. Die zähflüssige Suspension wurde abzentrifugiert (20 000 x g, 15 min, RT) und die Plasmid-DNA aus dem klaren Überstand mit 0,7 Vol. Isopropanol gefällt (20 000 x g, 20 min, RT). Die DNA wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 10 µl Wasser gelöst.

3.3 Isolation von RNA aus *Trametes versicolor*

3.3.1 Isolation von Gesamt-RNA

Gesamt-RNA aus *T. versicolor* wurde aus halbtrocknetem, in flüssigem Stickstoff gefrorenem Mycel isoliert. 500 mg des Mycels wurden mit dem Micro-Dismembrator U (Braun Biotech International) aufgebrochen (2 x 2 min bei 2 000 Upm) und die RNA mit 5 ml Trizol nach dem Pflanzenprotokoll des Herstellers (Gibco) extrahiert. Um den Polysaccharidgehalt der

RNA zu minimieren, wurde die RNA durch Fällung mit 1,25 ml Isopropanol und 1,25 ml Hochsalzlösung (laut Protokoll Gibco) bei 20 000 x g (Eppendorf Zentrifuge) präzipitiert. Das Pellet wurde dann mit 75 % igem Ethanol gewaschen und in 100 µl Wasser gelöst.

3.3.2 Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA

Um mRNA aus der Gesamt-RNA anzureichern, wurde der mRNA Purification Kit der Firma Pharmacia verwendet und die Aufreinigung laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

3.4.1 Photometrische Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration

Durch Messung der OD_{260} konnte die Konzentration einer DNA-Lösung in TE bestimmt werden. Es wurden Quarzküvetten verwendet, der Leerwert war reines TE. Dabei gilt folgende Abschätzung:

$$OD_{260} = 1 \text{ entspricht } 50 \mu\text{g/ml DNA.}$$

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte analog. Es wird allerdings gegen Wasser gemessen und es gilt die Abschätzung:

$$OD_{260} = 1 \text{ entspricht } 40 \mu\text{g/ml DNA}$$

3.4.2 DNA-Konzentrationsbestimmung auf Ethidiumbromid-Platten

Um kleine DNA Mengen im Bereich von 1-200 ng/µl abzuschätzen, wurde eine Methode aus dem ZAP-cDNA[®] Synthese Kit, und ZAP-cDNA[®] Gigapack[®] III Gold Cloning Kit, (Stratagene) verwendet. Dabei werden 0,5 µl der zu bestimmende DNA-Probe zusammen mit je 0,5 µl einer Standardreihe bekannter Konzentrationen (10 ng/µl – 200 ng/µl) auf eine Ethidiumbromid-Agarose-Platte (0,8 % ige (w/v) Agarose, 1 x TAE, 10 µg/ml EtBr) aufgetropft und im UV Licht visualisiert. Die Probe enthält soviel DNA wie der in der gleichen Intensität leuchtende Standardpunkt.

3.5 Enzymatische Reaktionen an DNA

3.5.1 Restriktionsspaltung von DNA

Spaltungen von DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen von NEW ENGLAND BIOLABS, MBI Fermenters und Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Meist wurde zu allen Restriktionsansätzen 0,1 µg/µl BSA (New England Biolabs) zugesetzt.

3.5.2 Auffüllen von 5'- und 3'-überhängenden Enden

Durch die Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen können 5'- bzw. 3'-überhängende oder glatte Enden der DNA entstehen. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms, wurden überhängende 5'-Enden aufgefüllt, während 3'-Überhänge durch T4-DNA-Polymerase angedaut wurden. Beide Enzyme wurden nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) verwendet.

3.5.3 Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen, wurde linearisierte Vektor-DNA mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Roche) nach Angaben des Herstellers behandelt,.

3.5.4 Ligation

Für Klonierungen wurde ein DNA-Fragment in einen linearisierten und dephosphorylierten Vektor (50 - 100 ng), der im äquimolaren Verhältnis zum Fragment vorlag, ligiert. Die Ligationen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 10 µl unter Zusatz von 1 µl T4-DNA-Ligase (4 Units) und 1 µl 10 x Ligase-Puffer in einer Styroporbox über Nacht im Kühlraum bei 4 °C.

3.6 PCR-Amplifizierung

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) nach *Saiki et al.* [1988; *Saiki et al.* [1985] und *Mullis* [1990]) ermöglicht die selektive Anreicherung eines DNA-Fragments unter Verwendung von

zwei synthetischen Oligonukleotiden, die spezifisch an je einem Ende der zu untersuchenden DNA-Region hybridisieren („Annealing“) und als Primer für die DNA-Synthese durch thermostabile Polymerase dienen.

Die PCR wurde angewendet, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen oder Fragmente mit spezifischen Restriktions-Schnittstellen für gerichtete Klonierungen zu erhalten.

Als Polymerasen eignen sich Taq-, Pfu- oder Pwo-Polymerase (Roche oder Promega). Die letztere beiden garantierten eine nahezu fehlerfreie Amplifikation des DNA-Fragmentes

Die PCR besteht aus drei Schritten, die als Zyklen 30 bis 40 mal wiederholt werden.

1. Hitzedenaturierung der DNA für 10 s bei 94 °C.
2. Annealing der Primer für 10 s bei der berechneten Schmelztemperatur der Oligonukleotide, die gegebenenfalls variiert wurde (+/- 2 °C).
3. Polymerisationsreaktion („Elongation“) für 1 min pro 1 000 Basen bei 72 °C.

Nach dem letzten Zyklus wurde ein Elongationsschritt von 10 min bei 72 °C durchgeführt, um noch unvollständige DNA-Fragmente aufzufüllen.

Der 20 µl Reaktionsansatz enthielt 50 ng bis 1 µg Template-DNA, 10 pmol jedes Primers, 5 mM je dNTP, 1 x Polymerase-Puffer mit Mg²⁺ und 2,5 Units Polymerase. Die DNA wurde in der Kapillar-PCR vom Reaktionsansatz getrennt denaturiert (94 °C) und erst kurz vor dem ersten Annealing mit diesem gemischt (siehe Anleitung des Thermocyclers, Combat Research).

3.7 Herstellung von cDNA

Zur Herstellung von cDNA aus *T. versicolor* mRNA, wurde der cDNA Synthesis Kit der Firma Stratagene verwendet. Alle Schritte wurden laut Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die entstandenen cDNA Fragmente besitzen eine 3'-EcoR I und eine 5'-Xho I Restriktionsschnittstelle, über die sie direktional in einen Vektor kloniert werden können.

3.8 Radioaktive Markierung von DNA

Für die radioaktive Markierung linearer DNA-Fragmente mit $[\alpha]^{32}\text{P}$ -dATP oder $[\alpha]^{32}\text{P}$ -dCTP wurde das Random Primers DNA Labeling System der Firma Gibco, BRL verwendet, das auf der Zufall Primer Methode nach *Feinberg und Vogelstein* [1983] beruht.

Synthetische Oligonukleotide wurden durch 5'-Phosphorylierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP und T4-Polynukleotidkinase (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers endmarkiert.

Um markierte DNA von freien $[\text{}^{32}\text{P}]$ -dNTPs abzutrennen, wurde der Markierungsansatz durch eine Gelfiltration mit MicroSpinTM G50-Columns (Amersham) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.9 Southern- und Northern-Blot Analysen

3.9.1 Kapillarblot

Über Agarosegelelektrophorese aufgetrennte DNA und RNA-Fragmente, wurden nach einem modifizierten Verfahren von *Sambrook et al.* [1989], *Wahl et al.* [1987] und *Reed und Mann* [1985] auf Hybond-N⁺-Nylonmembranen übertragen..

Für den Southernblot wurde das Gel zunächst zur Depurinierung für 20 Minuten in 0,25 N HCl geschwenkt und dann für 20 Minuten in 0,4 N NaOH denaturiert. Anschließend wurde das Gel auf zwei Lagen 3 MM Whatmanpapier, die mit 0,4 N NaOH getränkt waren, gelegt. Diese befanden sich auf einem Schwamm, der ebenfalls mit 0,4 N NaOH getränkt war. Auf das Gel wurde nun die Membran luftblasenfrei gelegt und nach zwei weiteren Lagen Whatman Papieren wurden ca. 10 cm hoch Papiertücher aufgestapelt, die gleichmäßig beschwert wurden. Um einen „Kurzschluss“ des Schwammes mit den Papiertüchern zu vermeiden, wurde der Rand des Schwammes mit Parafilm abgedeckt.

Die Transferzeit betrug 12 bis 16 Stunden (über Nacht). Danach wurde die Membran kurz in 5 x SSC geschwenkt, um eventuelle Gelrückstände zu entfernen und dann an der Luft getrocknet. Die DNA wurde an die Membran mit UV-Licht (optimal crosslink, Stratalinker) fixiert und konnte anschließend mit einer spezifischen und markierten Sonde durch Hybridisierung detektiert werden.

Für Northernblot-Analysen wurde die RNA ohne weitere Vorbehandlung der Gele mit einem leicht alkalischen Transferpuffer (5 x SSC, 0,1 M NaOH) nach *Low und Rausch* [1994] für

zwei Stunden, analog dem oben genannten Verfahren auf die Membran (Hybond-N⁺TM, Amersham) übertragen.

3.9.2 Hybridisierung nach Church

Nach einem modifizierten Protokoll von *Church und Gilbert* [1984] wurden die angefeuchteten Membranen (TE oder 5 x SSC) eine Stunde mit Church-Puffer (1 mM EDTA, 0,5 M NaH₂PO₄ pH 7,2, 1 % BSA, 7 % SDS) bei 65 °C vorhybridisiert. Anschließend wurde der Puffer durch frischen vorgewärmten Church-Puffer ersetzt und die radioaktiv markierte Sonde nach 10-minütigem Aufkochen bei 95 °C zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C. Am nächsten Tag wurden die Membranen bei Raumtemperatur zweimal 10 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS Puffer und einmal 20 min mit 1 x SSC/0,1 % SDS Puffer bei 65 °C gewaschen. Zur Autoradiographie wurden die Membranen über Nacht auf einen Film oder Phosphorscreen (Kodak) exponiert.

3.10 Untersuchung von RNA durch S1-Nucleaseschutz Analyse

Die Untersuchung von Genexpression durch S1-Nucleaseschutz Analyse wurde nach einem modifizierten Protokoll von *Weaver und Weissmann* [1979] durchgeführt. Hierzu wurden je 2 pmol der zu testenden Primer durch Polynucleotidkinase mit 150 µCi [γ -³²P]-dATP endmarkiert und von diesen 10³ cpm zu 50 µg Gesamt-RNA in 30 µl Hybridisierungspuffer (1 M NaCl, 330 µM EDTA pH 8, 160 mM HEPES pH 7,5) gegeben. Dieser Ansatz wurde dann für 10 min auf 75 °C erhitzt und über Nacht bei 55 °C hybridisiert. Am nächsten Tag wurde die einzelsträngige RNA durch Zugabe von 150 U S1-Nuclease (Amersham) in 270 µl des mitgelieferten Puffers für 30 bis 60 min bei 37 °C abgedaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 µl 0,5 M EDTA gestoppt, die RNA mit 0,7 ml EtOH gefällt und das getrocknete Pellet in 3 µl Auftragspuffer (95 % Formamid, 0,0025 % SDS, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanolblau) resuspendiert. Die Proben wurden dann 2 min bei 90 °C inkubiert, auf einem 8 % igem Harnstoffgel aufgetrennt und die Banden mit Hilfe eines Phosphorscreens (Kodak) detektiert.

3.11 Transformation von *E. coli*-Zellen

3.11.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*-Zellen

10 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie des *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurde 1 l LB-Medium angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C geschüttelt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien abzentrifugiert (4 500 Upm; Hettich, 10 min, 4 °C). Die folgenden drei Waschschrte wurden im Kühlraum auf Eis durchgeführt. Zuerst wurden die Bakterien mit einem Volumen, dann mit 0,5 Volumina und zuletzt mit 50 ml kaltem Wasser gewaschen. Dann wurde das Pellet in 2 bis 3 ml 10 % igem Glycerin aufgenommen, zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die elektrokompenten Bakterien konnten bei –80 °C aufbewahrt werden.

1.1.2 Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen

Die Elektroporationen der Bakterien wurden in 0,2 mm Küvetten bei 2 kV, 800 Ω und 25 µF in einem Gene Pulser (BioRad) durchgeführt.

Zu den 50 µl Aliquots elektrokompenter Zellen wurde 1 – 2 µl DNA pipettiert und dieser Ansatz in kalte Küvetten überführt. Nach dem erfolgten Puls wurde sofort 1 ml eiskaltes SOC-Medium *Sambrook et al.* [1989] zugegeben und der Ansatz wieder in Eppendorf-Gefäße überführt. Nach 1 Stunde schütteln bei 37 °C wurden 10 µl und 100 µl Aliquots auf LB-Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.11.3 Bestimmung der Transformationseffizienz

Es wurden 25 pg bis 10 ng „supercoiled“ Plasmid-DNA in chemisch- oder elektrokompente Zellen transformiert. Von dem 1 ml Transformationsansatz wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1 000 und 1:10 000 auf LB-Platten mit dem gewählten Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, die gewachsenen Einzelkolonien gezählt und die Transformationseffizienz (Anzahl der gewachsenen Einzelkolonien pro 1 µg transformierter DNA) bestimmt.

3.12 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Auf ihrer Homepage (<http://www.umanitoba.ca/medicine/biochem/gietz/methid.htm>) wurde 1996 von *Gietz* und *Schiestl* eine modifizierte Methode der Lithiumacetat-Transformation (*Gietz et al.* [1995]) präsentiert, die eine sehr hohe Effizienz ermöglicht. Die Hefen wurden in Voll- oder Selektionsmedium angeimpft, über Nacht bei 30 °C geschüttelt und am nächsten Tag in 50 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Nach ca. 4 h bei einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,7 wurden die Hefen abzentrifugiert, einmal mit 25 ml sterilem Wasser gewaschen, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen und das Pellet in einem Endvolumen von 500 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Die Hefesuspension wurde zu 50 µl aliquotiert, die Hefezellen abzentrifugiert und diese mit 240 µl 50 % PEG 4000 überschichtet. Darauf wurden 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl Carrier-DNA (2 mg/ml) und 50 µl DNA-Lösung (2-5 µg DNA in Wasser) zupipettiert. Das Pellet wurde auf dem Vortexer für ca. 1 min resuspendiert und die Suspension für 30 min bei 30 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 20 - 25 min bei 42 °C im Wasserbad. Anschließend wurden die Hefen bei maximal 8 000 Upm in der Eppendorffzentrifuge pelletiert, der Transformationsmix gründlich entfernt und die Zellen in 500 µl Wasser aufgenommen. Es wurden jeweils 100 µl und 400 µl auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert. Nach 2 - 4 Tagen Inkubation bei 30 °C konnten Einzelkolonien von den Platten umgestrichen oder verwendet werden.

3.13 Transformation von *Trametes versicolor*

3.13.1 Herstellung der Protoplasten

Aus einer mit *Trametes versicolor* bewachsenen Malzagarplatte wurden zwei bis drei 1 cm² große Mycelstücke entnommen, mit diesen jeweils 100 ml Malzmedium in einer Zellkulturflasche angeimpft und bei 28 °C mehrere Tage als Standkultur inkubiert. Wenn die Oberfläche des Mediums völlig mit Luftmycel zugewachsen war, wurde der Mycelrasen mit einem Ultraturrax (Heidolph) für 1 min bei 9 000 Upm zerkleinert. 100 ml Malzmedium wurden nun mit 10 – 25 ml dieser Zellsuspension angeimpft und vier Tage bei 28 °C als Standkultur angezogen. Dabei bildete sich eine Matte aus Substratmycel, die auch zerkleinert

(Ultraturrax 1 min 9 000 Upm) und dann über Nacht bei 28 °C mit 100 Upm in einer Zellkulturflasche geschüttelt wurde. Diese Zellen wurden zur Herstellung der Protoplasten verwendet.

Das Mycel wurde vom Medium durch Zentrifugation (RT, 5 500 Upm, Heraeus) getrennt und so oft (3 – 4 mal) mit 50 ml Protoplastierungspuffer (0,6 M Saccharose, 25 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 5,8) gewaschen, bis keine Verfärbung durch das Malzmedium erkennbar war. Dann wurden die Zellen in dem fünffachen Zellvolumen Protoplastierungspuffer aufgenommen, 8 mg/ml Lysing Enzyme (Sigma) zugegeben und 3 h bei 28 °C mit 100 Upm geschüttelt, um die Zellwände abzdauen.

Die entstandenen Protoplasten wurden dann mit den Mycelresten zusammen abzentrifugiert (5 500 Upm, 10 min, 4 °C; Heraeus) und der Überstand entfernt.

Das Sediment wurde in eiskaltem Waschpuffer (0,6 M Saccharose, 0,1 M Tris/HCL pH 7,5) mit zwei Wattestäbchen und etwas Glaswolle kräftig resuspendiert, um die im Restmycel hängenden Protoplasten herauszulösen. Die ganze Suspension wurde dann zusammen mit der Glaswolle abzentrifugiert (3 000 Upm, 10 min, 4 °C; Heraeus). Der Überstand, der nun die Protoplasten als erkennbare Trübung enthält, wird dann über einen Glasfilter (Größe 2, Brandt) gegeben, um die restlichen Mycelstücke abzutrennen. Dieser Waschvorgang wurde bis zu vier mal wiederholt.

Die Protoplasten in dem gesammelten Filtrat wurden dann mittels Zentrifugation bei 15 000 x g sedimentiert (Sorvall, SS34, 15 min, 4 °C) und in CaCl₂-Puffer (0,6 M Saccharose, 50 mM CaCl₂, 0,1 M Tris/HCL pH 7,5) in einer Konzentration von ca. 10⁸ Protoplasten pro 100 µl aufgenommen.

3.13.2 Transformation der Protoplasten

Je 100 µl Protoplastensuspension (ca. 10⁷ – 10⁸ Zellen) wurden mit 20 µg (in 10 µl H₂O) zu transformierender DNA versetzt und 25 min auf Eis inkubiert. Dann wurde zuerst 500 µl und danach 800 µl PEG-Lösung (60 % PEG 4000, 50 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HCL pH 7,5,) tropfenweise zugegeben, gemischt, 20 min bei RT inkubiert und der gesamte Ansatz nach Zugabe von 7 ml MMS-Topagar (42 °C) auf MMS- Platten ausplattiert.

Nach 10 – 20 Tagen, wurden die gewachsenen Klone auf MM-plattem überimpft.

3.14 Durchmusterung einer Phagenbank

Die genomische *T. versicolor* Genbank in Lambda Zap Express™ sowie der ExAssist Helper Phage und der Stamm XL0LR wurden von der Firma Consortium für elektrochemische Industrie GmbH zur Verfügung gestellt. Die Durchmusterung mit dem ZAP Express™ Vector Kit (Stratagene) wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.14.1 Identifizierung von positiven Phagen durch Hybridisierung

Zum Durchmustern der Genbank wurden eine bestimmte Anzahl von Phagen auf Agarplatten ausplattiert. Anschließend kann die Phagen-DNA, die neben den Phagenpartikeln unverpackt in den Phagenplaques vorliegt durch direkten Kontakt auf Nitrocellulose- oder Hybond-N⁺-Filter übertragen werden. Die Filter werden anschließend mit der entsprechenden Gensonde hybridisiert.

5×10^4 pfu wurden mit 600 μ l einer frischen phagenkompetenten Wirtsbakteriensuspension (XL1-blue MRF') 15 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 8 ml NZY-Topagar, der auf 48 °C vorgewärmt war, auf NZY-Platten (\varnothing 150 mm) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurden jeweils 12 Platten hergestellt. Die Platten enthielten einen einheitlichen Plaquerasen, auf dem einzelne Plaques kaum zu unterscheiden waren. Die Platten wurden zur Erhärtung des Agars mindestens eine Stunde bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden von jeder Platte zwei Filterabzüge (Hybond-N⁺™, Amersham) gemacht. Die Filter wurden luftblasenfrei auf die NZY-Platten gelegt, nummeriert und markiert. Platten und Filter wurden zusätzlich noch asymmetrisch mit Nadelstichen gekennzeichnet. Die Filter wurden 2 min auf mit Denaturierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) getränktem Whatman 3MM Papier (DNA-Seite der Filter nach oben) und anschließend 4 min auf mit Neutralisierungspuffer (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 8) getränktem Whatman 3MM Papier gelegt. Zum Entfernen von eventuell anhaftenden bakteriellen Debris wurden die Filter 5 min in 2 x SSC geschwenkt. Nach Lufttrocknung wurden die Filter 2 h bei 80 °C zur Fixierung der DNA gebacken. Die Filter wurden anschließend wie in 3.9.2. beschrieben hybridisiert und auf einem Röntgenfilm (Biomax, Kodak) exponiert.

Es wurde nur mit Phagen weitergearbeitet, die auf beiden Filterabzügen nach der Hybridisierung ein positives Signal gaben. Die Position des Signals auf dem Autoradiogramm wurde mit Hilfe der Markierung einem bestimmten Plaque auf der NZY-Platte zugeordnet. Mit einer abgeschnittenen 1 000 µl Gilson Pipettenspitze wurde der entsprechende Bereich großzügig aus dem Agar ausgestochen. Der Agaroseblock wurde in 1 ml SM-Puffer (5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄•7 H₂O, 50 ml 1 M TrisCl pH 7,5, 5 ml 2 % ige Gelatine ad 1 l H₂O) + 20 µl Chloroform bei 4 °C über Nacht eluiert. Zur Reinigung der Phagen wurde eine 10⁻³ Verdünnungsstufe der Phagensuspension ausplattiert und erneut Filterabzüge von den Platten hergestellt. Nach Hybridisierung konnten die positiven Phagen identifiziert und isoliert werden. Waren in dieser Vereinzlungsrunde noch keine einzelnen, deutlich von anderen Plaques abgesetzte, positive Plaques vorhanden, so wurden die vorgereinigten Plaques erneut gereinigt.

Der Phagenklon wurde dann durch *In Vivo*-Excision im *E. coli* Stamm XL0LR unter der Verwendung eine ExAssist HelperPhagen in ein Plasmid (PBK-CMV) nach der Vorschrift des ZAP Express™ Vector Kit (Stratagene) überführt.

3.15 Gelelektrophorese

1.1.1 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden durch horizontale Gelelektrophorese in 1 x TBE-Puffer oder 1 x TAE-Puffer Agarosegelen *Sambrook et al.* [1989] (mit Zusatz von 1/20000 Ethidiumbromid) aufgetrennt.

Abhängig von der Größe der Fragmente wurde eine Agarosekonzentration zwischen 0,8 % und 2 % gewählt. Die DNA wurde mit 0,2 Vol. Auftragspuffer (20 % Glycerin, 0,1 % SDS, 10 mM TrisCl pH 7,5, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei Spannungen von 5 – 10 V/cm (Gellänge) zusammen mit einem Größenstandard durchgeführt. Die DNA konnte anschließend durch die Absorption des interkalierten Ethidiumbromids im UV-Durchlicht bei 312 – 366 nm sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.15.2 Auftrennung von DNA-Fragmenten in denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Kleine DNA-Fragmente, wie zum Beispiel Primer aus S1-Nucleaseschutzexperimenten, wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) analysiert. Der Lauf wurde in vertikalen Gelen bei 150 V für 1 – 2 h durchgeführt. Das Gel enthielt 8 % Polyacrylamid und 8 M Harnstoff. Der Laufpuffer und das Gel enthielten 1 x TBE-Puffer und 8 M Harnstoff *Sambrook et al.* [1989].

3.15.3 Auftrennung von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte nach der Methode von *Laemmli* [1970]. Es wurden 10 – 15 % ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte vertikal in Miniprotean II-Gelkammern von BioRad bei einer Spannung von 15 Volt/cm in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS). Die Proben wurden mit 1/5 Vol. 5 x SDS-Auftragspuffer (10 % SDS, 25 % β -Mercaptoethanol, 30 % Glycerin, 312,5 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,01 % Bromphenolblau, 0,01 % Xylencyanol) versetzt, vor dem Auftragen 5 min auf 95 °C erhitzt und in die gespülten Taschen des Gels pipettiert.

Um sehr kleine Proteine zu trennen, wurde ein modifiziertes Tricin-SDS-Gelsystem nach *Schagger und von Jagow* [1987] verwendet. Hierbei werden zwei unterschiedliche Laufpuffer verwendet. Der Anoden Puffer (0,2 M TrisBase) und der Kathodenpuffer (0,1 M TrisBase, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS) werden nur über das Gel (siehe unten) elektrisch verbunden. Die Probe wurde mit 1 Vol. Tricin-Auftragspuffer (0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 24 % Glycerin, 8 % SDS, 0,2 M DTT, 0,02 % Comassie Blau G 250) für 3 min auf 100 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf wurde unter den gleichen Bedingungen wie oben beschrieben durchgeführt.

Sammegel:

0,81 ml Acrylamidlösung (30:0,8 %), BioRad
1,55 ml 1 M Tris/HCl (pH 8,45)
50 μ l 10 % SDS
3,9 ml H₂O
0 ml Glycerin
70 μ l 10 % APS
5 μ l TEMED

Trenngel:

5,5 ml Acrylamidlösung (30:0,8 %),
3,3 ml 3 M Tris/HCl (pH 8,45)
100 μ l 10 % SDS
0 ml H₂O
1,05 ml Glycerin
50 μ l 10 % APS
7 μ l TEMED

3.15.4 Auftrennung von Proteinen in nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (Nativ-Gele)

Die Auftrennung von Proteinen unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte in 6 – 8% igen Polyacrylamidgelen. Die Konzentration von Tris/HCl pH 8,9 im Trenngel betrug im Gegensatz zur denaturierenden-SDS-PAGE 750 mM. Die Konzentration von Tris/HCl pH 6,8 im Sammelgel betrug 150 mM. Um das Verschmieren der Proteinbanden zu reduzieren, wurde dem Trenn- und Sammelgel 0.05 % NP40 zugesetzt.

3.16 Proteinextrakte aus *Trametes versicolor* oder *Saccharomyces cerevisiae*

Um Proteine aus *T. versicolor* Mycel zu isolieren, wurden die Zellen vom Medium durch Abfiltrieren und Trocknen zwischen Filterpapieren getrennt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Zellen wurden dann mit dem Micro Dismembrator U (Braun Biotech International) aufgebrochen (2 x 2 min bei 2 000 Upm) und in einem Zellvolumen Proteinextraktionspuffer (0,02 % NP40; 0,025 Triton X-100, 200 µM PSMF, 150 mM NaCl, 5 mM DTT, 20 mM TrisHCl pH 7,5) aufgenommen. Nach dem Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile (15 min, 20 000 x g, 4 °C) wurde der Überstand für die Analyse der Proteine verwendet.

Die Herstellung eines *S. cerevisiae* Proteinextrakts erfolgte analog, nur wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium separiert und das Pellet in flüssigem Stickstoff gefroren.

3.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mit dem Biorad-Assay bestimmt. Dieser Test beruht auf der Beobachtung von *Bradford* [1976], wonach das Absorptionsmaximum einer sauren Lösung von Coomassie Brilliant Blau G-250 nach Ausbildung von Proteinkomplexen von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. Zuerst wurde eine Eichkurve mit 1 – 20 µg Rinderserumalbumin (BSA) erstellt, indem zu 800 µl Proteinlösung 200 µl der Biorad-Farbstofflösung zugegeben wurden. Nach gründlichem Mischen wurde der Extinktionswert bei 595 nm gegen den Leerwert (800 µl Wasser + 200 µl Farbstoff) gemessen und die

Absorptionswerte gegen die Proteinkonzentration aufgetragen. Aus der Eichgeraden konnte dann direkt aus den gemessenen Werten bei 595 nm die Proteinkonzentration der Proben abgelesen werden.

3.18 Western-Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine durch Antikörper wurden die Proteine auf Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und anschließend auf PVDF-Membranen transferiert, um sie dann mit dem entsprechenden Antikörper zu inkubieren. Der entstandene Protein-Antikörper-Komplex wurde dann mit einem zweiten Antikörper, der an Peroxidase gekoppelt war, inkubiert. Durch eine enzymatische Lichtreaktion (Chemolumineszenz) der Peroxidase konnten die Komplexe auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht werden.

Die Proteine wurden durch eine PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Elektroblot auf die PVDF Membran übertragen. Es wurde die Mini Trans-Blot Apparatur von BioRad nach Angaben des Herstellers verwendet. Geblottet wurde in Blot-Puffer (10 mM NaHCO₃, 3 mM Na₂CO₃) über Nacht bei 4 °C und 150 mA. Anschließend wurde die trockene Membran in TBST-Puffer (150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl pH 8,0) dem 2 % Milchpulver zugesetzt war, für 60 min geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Die Bindung der Antikörper an die Proteine erfolgte durch einstündiges Schwenken der Membran in TBST-Milch (1 %), der der gewünschte Antikörper zugesetzt war. Nach jedem Antikörper wurde die Membran drei mal 5 min in TBST gewaschen. Die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe erfolgte mit dem Western LightningTM Chemilumineszenz-Kit von Perkin Elmer nach Angaben des Herstellers.

3.19 Laccase – Aktivitätstest (ABTS – Test)

Bei diesem Test oxidiert die Laccase das Substrat ABTS, wobei ein grün-blau gefärbtes, stabiles Radikal entsteht, dessen Extinktion photometrisch bei 420 nm gemessen wurde.

Für den Test wurden x µl Laccaselösung zu 990 – x µl Mac Illvaine Puffer gegeben und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl 10 mM ABTS gestartet. Der Ansatz wurde auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C für 5 – 30 min, je nach Enzymmenge, inkubiert und mit 200 µl

5 M NaCl gestoppt. Nach Messung der Extinktion bei 420 nm, die sich zwischen 0,4 und 1,2 im linearen Bereich befindet, wurde die Volumenaktivität in der Laccase-Lösung über die Beziehung

$$C(U/ml) = (\Delta E \cdot (1200 \div x)) \div (36 \cdot t)$$

berechnet. Wobei $\Delta E = E_{\text{Probe}} - E_{\text{blind}}$, $x = \mu\text{l}$ Laccaselösung und $t = \text{min}$ Testdauer war.

3.20 Reinigung von Laccase bzw. Apo-Laccase

Der Überstand einer *T. versicolor* Laccase-Expressionskultur wurde mit etwa einem Viertel Volumen 20 mM BisTris pH 6,5 versetzt und auf eine mit 20 mM BisTris pH 6,5 equilibrierte DEAE–Sephacel-Säule (Pharmacia) geladen (150 ml Bettvolumen). Die Säule wurde dann mit 5 x Bettvolumen 20 mM BisTris pH 6,5 gespült und danach die gebundene Laccase mit 250 mM NaCl 20 mM BisTris pH 6,5 eluiert. Die Fraktionen wurden dann im Falle von Holo-Laccase durch einen Aktivitätstest (ABTS-Test), im Falle der inaktiven Apo-Laccase durch einen Westernblot auf den Enzymgehalt getestet. Alle Laccase enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Proteine durch 100 % Ammoniumsulfat gefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert, dann in möglichst wenig 20 mM BisTris pH 6,5 gelöst und auf eine mit 20 mM BisTris pH 6,5 equilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex 200TM HighLoadTM 26/60, Pharmacia) geladen und mit 20 mM BisTris pH 6,5 eluiert. Die Laccase enthaltenden Fraktionen wurden wiederum vereinigt und durch Ultrazentrifugation aufkonzentriert. Die so gereinigte Laccase war bis zu 95 % rein und wurde dann für weiter Analysen verwendet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Grundlegende Beobachtung und Strategie

4.1.1 Die Expression der Laccase ist kupferabhängig

Dass die Kupferkonzentration im Medium einen großen Einfluss auf die Menge der exprimierten Laccase hat, zeigte sich bei Tests für die Optimierung der Laccase-Expression in *Trametes versicolor*. Sehr hohe Kupferkonzentrationen sind allerdings für ihre antimikrobielle Wirkung bekannt (*Lin et al.* [1989]). Deshalb wurde untersucht, bei welcher Kupferkonzentration das Optimum für die Laccase-Expression liegt. Dazu wurden jeweils 300 ml Hauptkulturmedium mit 0, 12, 50, 200, 500 und 800 μM CuSO_4 versetzt und mit je 30 ml einer *Trametes versicolor* Vorkultur angeimpft. Nach vier Tagen Inkubation bei 28 °C und 110 Upm wurden die Kulturen mit je 40 $\mu\text{g/ml}$ DABA induziert. Aus jeder Kultur wurde vor, sowie ein Tag bzw. zwei Tage nach der Induktion jeweils eine Probe entnommen und die Laccase-Aktivität von je 1 μl Kulturüberstand durch einen ABTS-Test bestimmt (Abb. 4-1).

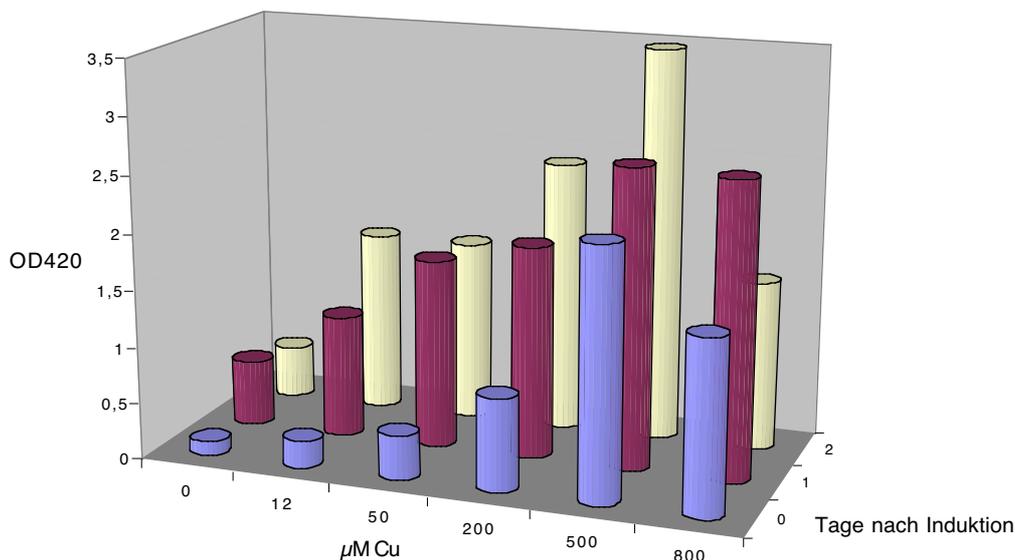


Abb. 4-1: Kupfer-abhängige Laccase-Expression von *Trametes versicolor* Kulturen. Die Laccase-Aktivität wurde durch einen ABTS-Test vor, sowie einen Tag bzw. zwei Tage nach der Induktion mit 40 $\mu\text{g/ml}$ DABA bestimmt und als OD_{420} -Wert angegeben.

Deutlich ist zu erkennen, dass die Laccase-Expression an die Kupfermenge im Medium gekoppelt ist und deren Optimum bei etwa 500 μM CuSO_4 liegt. Dies ist auch der Fall, wenn die Laccase-Produktion nicht durch die Zugabe von DABA aktiviert wurde, wobei die Laccase-Ausbeute dann geringer ist. Wie Northernblot-Untersuchungen zeigten, wird die Transkription des Laccase III Gens durch Kupfer nicht beeinflusst (*Rupert Pfaller, Consortium für elektrochemische Industrie*). Um die Allgemeingültigkeit der Aussage, dass die Laccase-Expression nicht nur transkriptions- sondern vor allem kupferabhängig ist, zu überprüfen, wurde in die zwei *S. cerevisiae* Stämme AH22 und CM3260 das Laccase exprimierende Konstrukt pLacP2 (Anhang Abb. 7-5) transformiert. Hefe hat keine endogene Laccase, deshalb musste die *T. versicolor* Laccase III heterolog exprimiert werden. In diesem Plasmid steht das Laccase-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *PGK*-Promotors. Diese Stämme wurden fünf Tage in His^- -Medium (SC-Medium 2.10.2) angezogen, das 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800 und 1 000 μM CuSO_4 enthielt. Mit 50 μl Überstand aus diesen Kulturen wurde ein ABTS-Test über Nacht bei 37 °C durchgeführt (Abb. 4-2). Das Ergebnis entspricht auch in Hefe dem oben für *Trametes versicolor* beschriebenen. Die Expression der Laccase ist dabei jedoch um mindestens den Faktor 1 000 schlechter als bei *T. versicolor*. Die optimale Kupferkonzentration für die Laccase-Expression liegt in Hefe zwischen 800 und 1 000 μM .

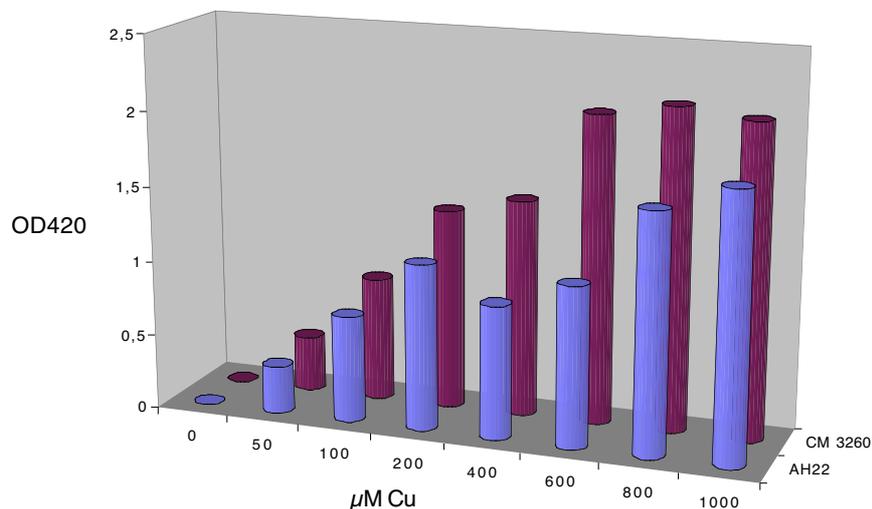


Abb. 4-2: Kupferabhängige Laccase-Aktivität von zwei Laccase exprimierenden *S. cerevisiae* Stämmen, AH22 und CM3260. Die Kulturen wurden unter verschiedenen hohen Kupferkonzentrationen in Selektionsmedium angezogen. Die Laccase-Aktivität wurde durch einen ABTS-Test fünf Tage nach dem Animpfen bestimmt und als OD_{420} -Wert angegeben. In beiden Stämmen ist deutlich die Abhängigkeit der Laccase-Expression von der Kupferversorgung zu erkennen. Das Optimum liegt bei etwa 800 μM .

4.1.2 Strategie

Es konnte zuvor (4.1.1) gezeigt werden, dass die Versorgung der Zellen mit Kupferionen eine essentielle Rolle bei der Laccase-Expression spielt. Hieraus ergaben sich zwei Strategien, um den Weg der Beladung der *T. versicolor* Laccase III mit Kupfer aufzuklären und genetisch veränderte Stämme mit erhöhter Laccase-Expression herzustellen. Der erste molekularbiologische Ansatz verfolgte die Isolierung von Genen, die homolog zu den aus *S. cerevisiae* bekannten Kupferhomeostasegenen sind. Dazu zählen vor allem die Gene, die an der Versorgung des sekretorischen Systems beteiligt sind, wie z. B. Kupferaufnahme-systeme, Kupferchaperone und Kupfer-ATPasen.

Der zweite biochemische Ansatz beschäftigte sich mit der Insertion des Kupfers in das aktive Zentrum der Laccase. Hierbei wurde untersucht, welche Faktoren bzw. welche Bedingungen benötigt werden, damit alle vier Kupferzentren der Laccase effektiv mit Kupfer beladen werden.

4.2 Isolierung und Charakterisierung von *Trametes versicolor* Kupferhomeostase-Genen

4.2.1 Herstellung von *T. versicolor* cDNA Banken

Um für die Isolierung von *T. versicolor* Genen durch PCR und Komplementationsanalysen geeignete cDNA-Banken zur Verfügung zu haben, wurde aus mit 25 μM CuSO_4 und 40 $\mu\text{g/ml}$ DABA induziertem *T. versicolor* Mycel mRNA (3.3) isoliert. Die aus dieser mRNA synthetisierte cDNA (3.7) wurde direktional über ihre EcoR I und Xho I „Linker“ in die Vektoren pJG4-5, pAH und pAT kloniert (Anhang Abb. 7-10). Da pAH und pAT keine Xho I Schnittstelle im Polylinker besitzen, wurden sie mit Sal I geschnitten, das ein passendes Ende zu mit Xho I geschnittener DNA erzeugt. In den Hefeexpressionsplasmiden pAH und pAT steht das Insert unter der Kontrolle eines *ADHI*-Promotors, was zu einer starken konstitutiven Transkription der cDNA führt. Die cDNA-Bank im Vektor pJG4-5 wurde ursprünglich für eine „Two Hybrid“ Untersuchung konzipiert. Deshalb sind die cDNAs mit dem Gen einer *GAL4* Aktivierungsdomäne fusioniert und stehen unter der Kontrolle des *GALI*-Promotors.

Zu je 50 ng Vektor wurden 25 ng cDNA gegeben, über Nacht ligiert (3.5.4) und am nächsten Tag in *E. coli* XL1blueMRF' elektroporiert (3.11.2). Die so transformierten Zellen wurden auf LB-amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden ausgezählt (siehe Tabelle 1), von den Platten abgeschwemmt und gut gemischt. Von der pJG4-5-Bank wurden 60 000 Klone, von der pAH-Bank 100 000 und von der pAT-Bank 160 000 Klone erhalten. Aus je einer Hälfte der Zellen wurden die Plasmide isoliert. Die anderen Hälften wurden als Glycerin-Kulturen (3.1.1.3) eingefroren.

Tabelle 1 : Zusammenstellung der Qualität der *T. versicolor* cDNA-Banken. Die Genbanken basieren auf drei unterschiedlichen Vektoren, pJG4-5, pAH und pAT. Von den erhaltenen Klonen wurden je 40 über Restriktionsanalysen auf ihre Komplexität hin untersucht und der Anteil der Leervektoren ermittelt (siehe auch Abb. 4-3)

Genbank im Vektor	erhaltene Klone	% Leervektor
pJG4-5	60 000	< 30 %
pAH	100 000	< 20 %
pAT	160 000	< 20 %

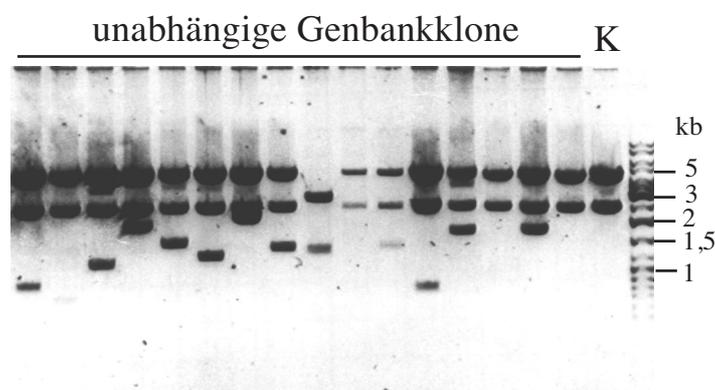


Abb. 4-3: Analyse der Genbank-Qualität mittels Restriktionsanalyse am Beispiel der *Trametes* pAT-Genbank. Aus 16 unabhängigen Klonen der in pAT klonierten Genbank wurde das Plasmid isoliert, mit Hind III geschnitten und auf einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle (K) wurde der mit Hind III geschnittene Leervektor aufgetragen. Die verschieden großen Banden repräsentieren die unterschiedlichen cDNA Fragmente.

Um einen Eindruck über die Komplexität der cDNA-Fragmente und der Anzahl der Leerplasmide in den Genbanken zu bekommen (Tabelle 1), wurden die Plasmide aus 40 Klonen je Genbank durch einen Restriktionsverdau analysiert. Die durchschnittliche Insertgröße betrug 1,5 - 2 kb, wobei auch cDNA-Fragmente von 0,2 bis 3 kb in einem

analytischen Agarosegel gefunden wurden. In Abb. 4-3 sind als Beispiel 16 Restriktionsanalysen von pAT-Genbank-Klonen dargestellt.

4.2.2 Isolierung des Gens eines Kupferchaperones (*tahA*) aus *T. versicolor*

Die cDNA und der genomische Klon von *tahA* (= *Trametes Atx Homolog*) wurden im Rahmen einer Diplomarbeit, die in unserer Arbeitsgruppe von Engel [1999] durchgeführt wurde, aus *Trametes versicolor* isoliert. Dabei kam folgende Strategie zum Tragen:

Sequenzvergleiche zwischen den bereits bekannten cytoplasmatischen Kupferchaperonen, die das Golgi-Netzwerk mit Kupfer versorgen, Atx1 aus *S. cerevisiae*, CUC1 aus *C. elegans*, HAH1 aus *H. sapiens* und CCH aus *Arabidopsis* zeigten zwei kurze konservierte Regionen (Abb. 4-4). Diese Sequenzabschnitte dienten als Vorlage für die Herstellung der degenerierten Primer ATX-Ord und ATX-Revco (2.12) die an den hohen GC Gehalt von *T. versicolor* so angepasst wurden, dass Kodons mit hohem GC Gehalt bevorzugt wurden. Bei der PCR mit diesen Primern und der in pJG4-5 inserierten *T. versicolor* cDNA-Bank wurde ein 170 bp großes Produkt erhalten, dessen abgeleitete Peptidsequenz deutliche Homologie zu den oben genannten Proteinen hatte. Deshalb wird das Gen im Folgenden als *tahA* für *Trametes Atx Homolog* bezeichnet.

```

CONSENSUS MAQTVVxKHxYxVxGxMTCxGCAGAVNxVLGKLGxDGVKIDDLExxKVTVxTxLPxDxVLETLKKTGKEVRSYxGKQLEAEPKA
Atx1       MAE---IKHYQFNVMTCxSGCSGAVNKVLTkLEPDVSKID-ISLEKQLVDVYTTLPYDFILEKIKKTGKEVRS--GKQL-----
HAH       MP-----KH-EFSVDMTCGGCAEAVSRVLNKLG--GVKYD-IDLPNKKVCI ESEHSMDTL LATLKTGKTV-SYLG--LE-----
CCH       MAQTVVLK-----VGMSCQGCVGAVNRVLGKM--EGVESFDIDIKEQKVTVKGNVEPEAVFQTVSKTGKKT-SYWPVEAEAEPKA
CUC-1     MTQ-----YVFEMGMTcNGCANAARKVLGKLGEDKIKIDDINVETKKITVTTDL PASDVLEALKKTGKEI-----KQLQ-----
PRIMER    VxMTC                                     KTGK

```

Abb. 4-4: Vergleich der Proteinsequenzen homologer Kupferchaperone. Der Vergleich von Atx1 aus *S. cerevisiae* mit HAH aus *H. sapiens*, CCH aus *A. thaliana* und CUC-1 aus *C. elegans* wurde mit dem Programm Gene InspectorTM 1.5 erstellt. Die Kupferbindestelle MTCxxC und die lysinreiche Region KKTGK sind in allen Proteinen konserviert. Die in der Abbildung rot unterlegten Bereiche dienten als Vorlage für die degenerierten Primer mit denen ein *tahA*-Fragment isoliert wurde.

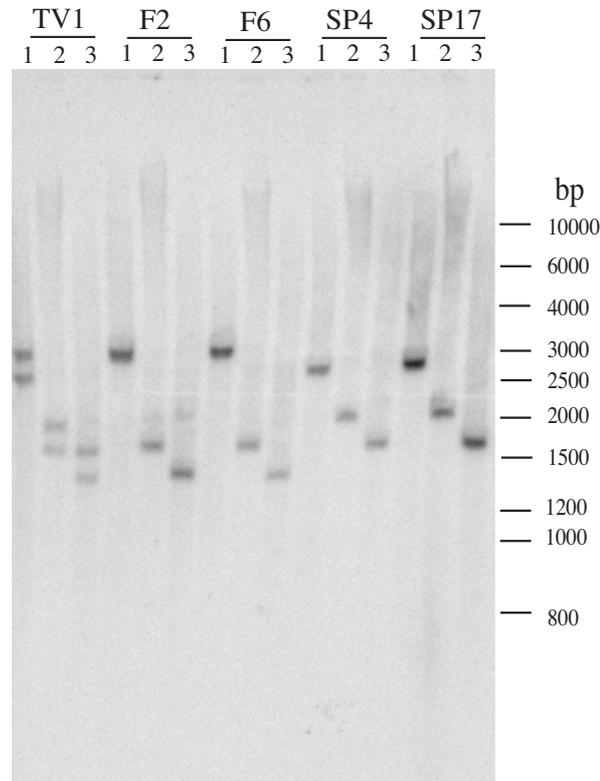
Um auch den 3'- und 5'-Bereich der cDNA-Sequenz zu erhalten, wurden zwei neue Primer TCC1-Ord und TCC1-Revco hergestellt und jeweils mit vektorspezifischen Primern kombiniert, die entweder im *GALI* Promotor (pJG4-5Forw) oder im *ADHI* Terminator (pJG4-5Rev) hybridisierten. Aus der PCR mit diesen Primern wurden zwei sich überlappende Sequenzen erhalten, welche die gesamte cDNA des *tahA* Gens darstellten (Abb. 4-6). In einer

nachfolgenden PCR wurde dann die gesamte cDNA von *tahA* mit den Primern cTAH-FW und cTAH-RV (2.12) amplifiziert und in pZero kloniert. Die aus der Sequenz der kompletten *tahA*-cDNA abgeleitete Peptidsequenz zeigte eine bis zu 76 % ige Homologie und 56 % ige Identität zu Atx1 (siehe auch Anhang Abb. 7-1).

Aus der Durchmusterung einer genomischen *T. versicolor* Phagenbank (siehe 3.14) mit dem *tahA* cDNA Fragment als Sonde wurden zwei unterschiedliche genomische Sequenzen von *tahA* mit ihren 3'- und 5'- regulatorischen Bereichen erhalten. Um ein vollständiges genomisches *tahA* Strukturgen zu erhalten, wurde eine PCR mit den Primern gTAH-FW und gTAH-RV-Not auf genomischer *T. versicolor* DNA mit Pwo-Polymerase durchgeführt. Das erhaltene 590 bp Fragment wurde über ein Agarosegel gereinigt, geleluert und in pZero kloniert. Der entstandene Vektor wurde als pZgTAH-N bezeichnet (Anhang Abb. 7-14).

In darauf aufbauenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob es sich bei den zwei unterschiedlichen Sequenzen von *tahA* um verschiedene Gene oder um Allele handelt. Dazu wurde eine Southernblot-Untersuchung (3.9) von genomischer DNA aus dem Dikaryon TV1 und den Monokaryen F2, F6, Sp4 und Sp17 durchgeführt. Pro Stamm wurden 10 µg genomische DNA, die jeweils mit 10 U der Enzyme Xho I und Xba I und deren Kombination verdaut wurden, eingesetzt. Der Blot dieser DNA wurde mit einer mit ³²P markierten Sonde der cDNA des *tahA* Gens hybridisiert (3.9.2). In Abb. 4-5 ist deutlich zu erkennen, dass vom Dikaryon TV1 zwei Banden mit der Sonde hybridisierten, während in den monokaryontischen *T. versicolor* Stämmen jeweils nur eine dieser Banden pro Verdau zu erkennen ist. Bei den unterschiedlichen Sequenzen handelt es sich folglich um Allele und nicht um zwei unterschiedliche Gene. Im Folgenden wird das Allel, welches in SP4 und SP17 enthalten ist, als *tahA-1* und das, welches in F2 und F6 enthalten ist, als *tahA-2* bezeichnet.

A:



B:

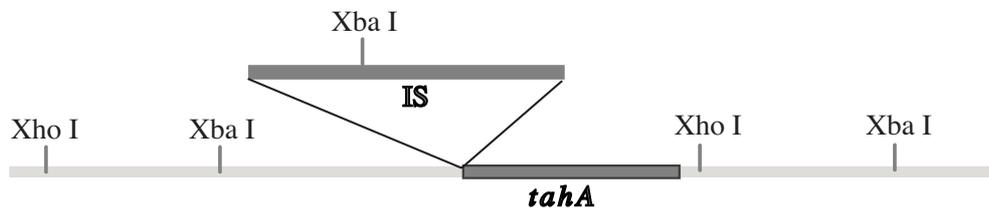


Abb. 4-5: Southernblot-Analyse der *tahA* Allele; **A:** Je 10 μ g genomische DNA des Dikaryons TV1 und der Monokaryen F2, F6, Sp4 und Sp17 wurden mit je 10 U der Restriktionsendonukleasen 1= Xho I, 2= Xba I und 3= Xba I +Xho I geschnitten und auf einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt. Als Sonde wurde die cDNA des *tahA* Gens radioaktiv markiert und mit dem Blot hybridisiert. Im Dikaryon sind pro Spur zwei Banden zu erkennen, die in den Monokaryen entweder in der einen oder der anderen Form auftauchen. Somit handelt es sich bei den zwei *tahA*-Sequenzen um Allele. **B:** Schematische Darstellung der Restriktionsschnittstellen. Das IS-Element ist nur im Allel *tahA-2* vorhanden.

4.2.3 Strukturelle Charakterisierung des *tahA* Gens

Die DNA Sequenzen der beiden Allele (siehe auch Anhang Abb. 7-2) unterscheiden sich zwischen dem Start-ATG und dem Stoppkodon TGA in neun Nukleotiden. Ein Nukleotidaustausch, der zu keinem Aminosäureaustausch führt, da beide Kodons (ACG und

ACA) für Threonin kodieren, befindet sich in Exon III, die restlichen acht in den Introns (Abb. 4-6). Somit kodieren die beiden Allele für eine identische Aminosäuresequenz. Wie der Vergleich mit der cDNA zeigt (Abb. 4-6), sind die fünf Introns in beiden Allelen an den gleichen Positionen. Ihre Größe ist mit 57 bis 66 Nukleotiden typisch für filamentöse Pilze. Die für Pilze von *Ballance* [1986] beschriebenen Konsensus Sequenzen für Introns Spleiß-Stellen wurden auch in *tahA* gefunden. Die aus allen fünf Introns ermittelte Konsensus-Sequenz für *T. versicolor* lautet 5'-GTRVKK-N(50-60)-YAG-3'. Das erste Intron liegt in der 5'-UTR (Untranslated Region) und unterscheidet sich in acht Nukleotiden bei den beiden Allelen.

tahA-1	1	CTTCTGCCTCCGCACCCCTGCGCGTTCGATCCGTAAGTGTGCAGCTCGCAAGG-CGTGGAGGCG TTTC-
tahA-2	1	CTTCTGCCTCCGCACCCCTGCGTTCGATCCGTAAGTGTGCACCTCGAAAGGGCGTAGG GGCA TGTCG
tahA-1 cDNA	1	CTTCTGCCTCCGCACCCCTGCGCGTTCGATCC-----
tahA-1	69	TTAACGATCGATCTCCGCCGAGCCCGCCTCTTGAACCGATATACACCATGGTGGGTCCGCTTGCTTCTG
tahA-2	71	TTGACGATCGATCTTCGCCGAGCCCGCCTCTTGAACCGATATACACCATGGTGGGTCCGCTTGCTTCTG
tahA-1 cDNA	34	-----CCCGCCTCTTGAACCGATATACACCATG-----
tahA-1	139	AGGAACAAGAGAGCGCGACTGACGGTCCGAATGCTGACAACCAGTCCGAGCACACTTACAAGTTCAACGT
tahA-2	141	AGGAACAAGAGAGCA CGACTGACGGTCCGAGTGTCTGACAACCAGTCCGAGCACACTTACAAGTTCAACGT
tahA-1 cDNA	62	-----TCCGAGCACACTTACAAGTTCAACGT
tahA-1	209	CAAGGTGATGACGAGTGATCAGAAGCAGCCGAGGGAGGATGACTGAGCGGGGGGAATTATAGATGACCTG
tahA-2	211	CAAGGTGATGACGAGTGATCAGACTCAGCCGAGGGCGGATGACTGAGCGGGGGGAATTATAGATGACCTG
tahA-1 cDNA	88	CAAG-----ATGACCTG
tahA-1	279	CACCGGATGCTCAGGCGCGATTGATCGCGTGTGAAGAAGACGGACGGTGCCTATCTTTATCGAGCTTCG
tahA-2	281	CACCGGATGCTCAGGCGCGATTGATCGCGTGTGAAGAAGACTGACGGTGCCTATCTTTATCGAGCTTCG
tahA-1 cDNA	100	CACCGGATGCTCAGGCGCGATTGATCGCGTGTGAAGAAGACGGACG-----
tahA-1	349	GGAGGTTTCAGGATGGGAGGTGACCGGCGAACCAGGGGGAGGACAGGTGTTCGCGGAGTACGACATTAGCCTGG
tahA-2	351	GGAGGTTTCAGGATGGG-GGTGACCGGCGAACCAGGGGGAGGACAGGTGTTCGCGGAGTACGACATTAGCCTGG
tahA-1 cDNA	147	-----GTGTTCGCGGAGTACGACATTAGCCTGG
tahA-1	419	AGAAGCAGGAGGTGCTCGTCAAGGGCACGATTCCGTACGACGACCTTCACGCGAAGATCGCAAAGACCGG
tahA-2	420	AGAAGCAGGAGGTGCTCGTCAAGGGCACGATTCCGTACGACGACCTTCACGCGAAGATCGCAAAGACCGG
tahA-1 cDNA	174	AGAAGCAGGAGGTGCTCGTCAAGGGCACGATTCCGTACGACGACCTTCACGCGAAGATCGCAAAGACCGG
tahA-1	489	CAAGCAGGTGGGTGTTCTTGGATAAGGCGGCGCGGCTCGCCGAGGCTCACGCAGACTCACTTAGATCCTC
tahA-2	490	CAAGCAGGTGGGTGTTCTTGGATAAGGCGGCGCGGCTCGCCGAGGCTCACGCAGACTCACTCAGATCCTC
tahA-1 cDNA	244	CAAGCAG-----ATCCTC
tahA-1	559	TCTGGAGAGACGGTGGTATGATCGTGCGCGGT
tahA-2	560	TCTGGAGAGACGGTGGTATGATCGTGCGCGGT
tahA-1 cDNA	257	TCTGGAGAGACGGTGGTATGA-----

Abb. 4-6: Vergleich der genomischen Sequenzen von *tahA-1* und *tahA-2* und der cDNA von *tahA-1*. Der Vergleich wurde mit dem Programm Gene InspektorTM 1.5 erstellt. Die Introns sind hellblau, die Exons schwarz und die 3'- und 5'-UTR pink dargestellt. Das Start-ATG ist grün und das Stoppkodon rot markiert. Die Sequenzunterschiede wurden dunkelblau gekennzeichnet.

Der Promotor-Bereich der beiden Allele unterscheidet sich vor allem durch eine 425 bp große Insertion (IS-Element) im Allel *tahA-2*. Diese Insertion ist von einem 29 nt langen invertierten Sequenzmotiv flankiert. Ein weiteres Paar invertierter Sequenzen, die 16 nt lang sind, befindet sich zwischen Position 150 und 173. Sie werden durch kein Nukleotid getrennt. Das IS-Element, das 183 nt stromaufwärts des Transkriptionsstarts und 129 nt stromaufwärts der putativen TATA-Box lokalisiert ist, kodiert für kein Polypeptid und besitzt einige Homologien zu Bindestellen für Transkriptionsfaktoren aus Hefe, wie GCN4, GCR1 und GAL4. Ob diese Sequenzen als regulatorische Elemente dienen können, muss noch untersucht werden. Weitere Homologie wurde zu dem „Stelth Virus“ gefunden, der ein sehr weites Wirtsspektrum zu haben scheint (Martin [1998]).

Die Promotor-Region der beiden Allele unterscheidet sich außer durch das IS-Element noch durch 67 Nukleotidaustausche innerhalb von 693 Nukleotiden. Er weist mehrere Motive auf, die homolog zu aus *S. cerevisiae* bekannten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren sind (Abb. 4-7).

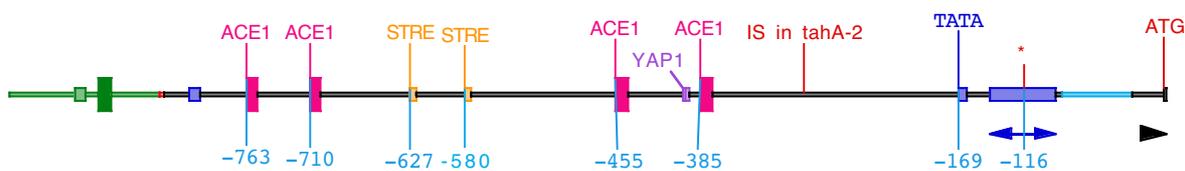


Abb. 4-7: Graphische Darstellung der Promotorregion des *tahA-1* Gens. Die Homologien zu putativen Bindestellen aus *S. cerevisiae* sind mit dem entsprechenden Bindeproteinen ACE1, STRE und YAP1 gekennzeichnet. Die TATA-Box ist in dunkelblau und der putative Transkriptionsstart, der in einer pyrimidinreichen, ebenfalls dunkelblau markierten Sequenz liegt, ist durch einen roten Stern markiert (Abbildung nach Karin Marbach).

Dazu zählen vier Sequenzen, die Homologie zu dem „Metal-Responsive Element“ (MRE) zeigen, das in *S. cerevisiae* von dem Transkriptionsfaktor Ace1 erkannt wird (Macreadie et al. [1994]). Dieses Motiv mit der Konsensussequenz VTVBVGCTGW tritt in der *tahA* Promotorregion zu zwei Paaren mit einem Abstand von ca. 250 bp an den Positionen -763, -710, -455 und -385 auf. Der Abstand der Motive im ersten Paar beträgt 52 bp der im zweiten 69 bp. Die beiden näher am Transkriptionsstart liegenden MRE ähnlichen Sequenzen sind in Allel *tahA-2* mutiert. Darüber hinaus wurden zwei Sequenzen mit Homologie zu „Stress

Response Elements“ (STRE) gefunden, die ebenfalls in einer Paarung mit einem Abstand von ca. 46 bp gruppiert sind, und sich an den Positionen -627 und -580 befinden. Außerdem wurde noch eine putative Bindestelle für YAP1 gefunden, das ein Regulator für die Abwehr von oxidativem Stress ist (Gasch *et al.* [2000]; Toone *et al.* [2001]). Welche Rolle diese Sequenzen tatsächlich in der Regulation von *tahA* spielen kann nur durch weitere Untersuchungen bestimmt werden. An der Position -169 befindet sich die putative TATA-Box, gefolgt von einer um die Position -116 gelegenen pyrimidinreichen Sequenz, an der die Transkription startet. Vor dem Start ATG befindet sich das erste Intron.

4.2.4 Funktionelle Analyse des *tahA* Gens

Das *ATX1* Gen wurde ursprünglich durch Komplementation einer $\Delta sod1 \Delta sod2$ Hefemutante isoliert und deshalb als Anti-oxidant bezeichnet (Culotta *et al.* [1995]). Diese Mutante wächst weder auf Paraquat-haltigen noch auf Methionin- oder Lysin-Mangelmedien (Liu *et al.* [1992]). Deshalb wurde untersucht, ob *tahA* das Wachstum dieser Hefemutante unter oxidativem Stress wiederherstellen kann.

Dazu wurden jeweils die cDNA von *tahA* und das *ATX1* Gen aus Hefe in den Expressionsvektor pAH kloniert, der die Gene unter die Regulation des starken *ADHI*-Promotors stellt. Auch eine bei der PCR erhaltene Zufallsmutante von *ATX1* (ATX* Arg68Lys) wurde in den gleichen Vektor kloniert und mit in den Test eingesetzt. Diese Konstrukte wurden jeweils in den $\Delta atx1 \Delta sod1 \Delta sod2$ Stamm SL133 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor in SL 133 transformiert. Mit den drei Stämmen wurde dann ein Tropftiterest (3.1.3.4) auf His⁻-Platten, die zusätzlich 50 μ M Paraquat enthielten, bzw. auf Methionin-Mangelmedium durchgeführt. Um zu testen, ob die SOD-Aktivität kupferabhängig ist, wurden einer Paraquat-Platte zusätzlich 50 μ M des Kupferchelators BCS zugesetzt. Als Kontrolle wurden die Stämme auf His⁻-Platten anaerob angezogen, da unter diesen Bedingungen die SOD-Aktivität mangels Sauerstoff nicht benötigt wird und alle Stämme gleich wachsen (Abb. 4-8). Nur die *Atx1* und *TahA* überexprimierenden Stämme konnten aerob auf den Met⁻-Platten wachsen. Der ATX* exprimierende Stamm zeigte kein Wachstum. Auf den Paraquat-Platten komplementierten *tahA* und *ATX1* den SOD-Defekt. Auf der BCS-haltigen Platte wurde kein Wachstum festgestellt, was die Abhängigkeit von verfügbarem Kupfer im Medium zeigt.

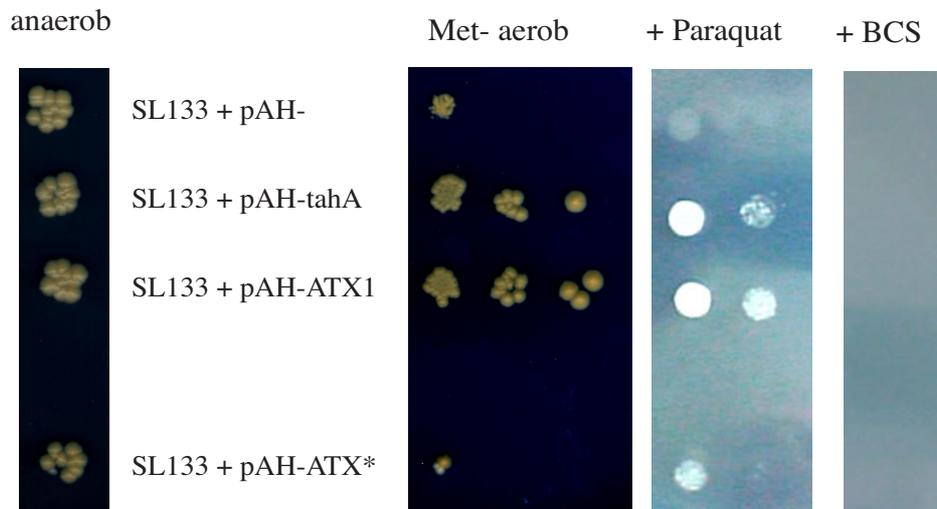


Abb. 4-8: Funktionelle Komplementation eines $\Delta atx1 \Delta sod1 \Delta sod2$ Hefestammes (SL133) mit *ATX1* bzw. *tahA*: SL133 wurde mit den *tahA* bzw. *ATX1*-Expressionsvektoren pAH-*tahA*, pAH-*ATX1* und pAH-*ATX** (Arg68Lys) transformiert und auf Methionin-Mangelmedium, 50 μ M Paraquat und 50 μ M Paraquat + 50 μ M BCS Platten in Verdünnungen von 1 bis 10^{-3} aufgetropft. Als Negativkontrolle wurde SL133 mit dem Leerplasmid (pAH) transformiert. Als Positivkontrolle wurden die Stämme auf His⁻-Platten unter anaeroben Bedingungen angezogen. Sowohl *tahA* als auch *ATX1* können den Δsod -Phänotyp komplementieren, allerdings nur in der kupferbeladenen Form, wie die Anzucht auf dem Kupferchelator BCS zeigt. *ATX** kann die Mutante nicht komplementieren.

In Hefe dient das Kupferchaperon Atx1 als Kupfertransportprotein von der Zellmembran zum sekretorischen System, in dem die Eisenreduktase Fet3 mit Kupfer beladen wird. Letztere ist essentiell für die hoch-affine Eisenaufnahme (*Pufahl et al.* [1997]). In einer Hefe $\Delta atx1$ Mutante kann folglich Fet3 nicht mit Kupfer beladen werden, und infolgedessen kann diese Mutante nicht auf Eisenmangelmedium wachsen (*Lin et al.* [1997]). Um zu testen, ob *tahA* in der Lage ist, diese Funktion von *ATX1* in der Hefe zu übernehmen, wurden die oben beschriebenen *tahA* und *ATX1* Expressionskonstrukte in den $\Delta atx1$ Hefestamm SL103 transformiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pAH in SL103 und als Positivkontrolle in den Wildtyp-Stamm Hintergrund EG130 eingebracht. Zusätzlich wurde die Zufallsmutante *ATX** (Arg68Lys) kloniert und getestet. Mit diesen Stämmen wurde ein Tropftiterstest auf Histidin-Mangelmedium durchgeführt, dem 1,5 mM des Eisenchelators Ferrozin zugesetzt worden war. Als Kontrolle wurde der Test auch auf eisenhaltigem (350 μ M) Medium durchgeführt (Abb. 4-9). Sowohl der *tahA* als auch der *ATX1* bzw. *ATX** exprimierende Stamm konnte auf dem ferrozinhaltigen Eisenmangelmedium wachsen, während die $\Delta atx1$ Mutante ein stark vermindertes Wachstum zeigte. Der Wildtyp EG103

wächst auch unter Eisenmangel. Auf der Kontrollplatte ist zu erkennen, dass alle Stämme gleichmäßig verdünnt und aufgetropft wurden.

Es wurde in diesen Experimenten somit gezeigt, dass TahA dieselben zwei Funktionen ausüben kann wie Atx1. Beide sind in der Lage, durch Überexpression eine SOD-negative Hefemutante vor oxidativer Schädigung zu bewahren und den Kupfertransport an die P-Typ-ATPase Ccc2 zu vermitteln. Die *ATX1** Mutante unterstützt nur noch die letztgenannte Funktion und kann nicht mehr mit Superoxidradikalen reagieren.

Somit ist TahA im Vergleich zu Atx1 nicht nur ein strukturell, sondern auch ein funktionell gleichwertiges Protein mit den gleichen physiologischen Eigenschaften.

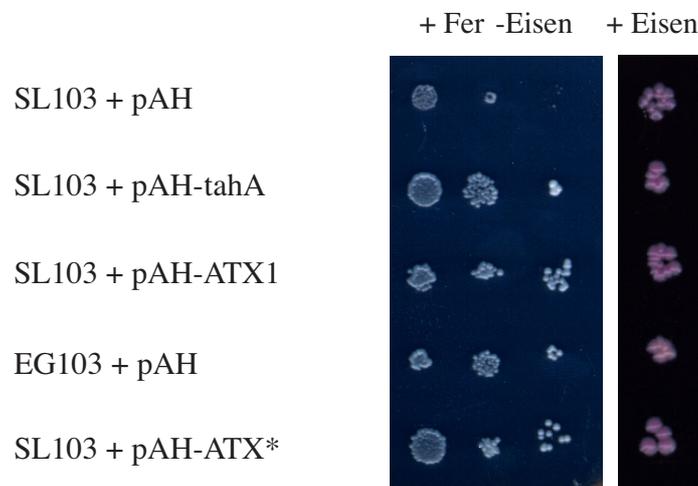


Abb. 4-9: Komplementation einer $\Delta atx1$ Mutante mit *tahA* bzw. *ATX1*. Der $\Delta atx1$ Stamm SL103 wurde mit einem *tahA* bzw. *ATX1* Expressionsplasmid transformiert und auf Platten, die 1,5 mM des Eisenchelators Ferrozin (Fer) enthielten, in den Verdünnungen 1 bis 10^{-3} aufgetropft. Als Kontrollen wurden SL103 und der Wildtyp-Stamm EG103 mit dem Leerplasmid transformiert. Als Wachstumskontrolle wurden die Stämme auch auf einer mit 350 μ M Eisen supplementierten Platte aufgetropft. Zusätzlich wurde die Zufallsmutante *ATX** transformiert. Alle Gene, sowohl *tahA* als auch *ATX1* und *ATX**, komplementierten die $\Delta atx1$ Mutante.

4.2.5 Isolierung des Gens einer Kupfer-P-Typ-ATPase (*ctaA*) aus *T. versicolor*

4.2.5.1 Komplementation einer *S. cerevisiae ccc2* Deletionsmutante

Das *ctaA*-Gen aus *T. versicolor* wurde durch funktionelle Komplementation eines Hefe $\Delta ccc2$ Stammes (Strain 3) mit einer in den Hefeexpressionsvektor pAH klonierten *T. versicolor* cDNA-Bank (siehe 4.1.1) isoliert. Diese Hefemutante, bei der das Gen der P-Typ-Kupfer-

ATPase *CCC2* deletiert worden war, kann kein Kupfer in ihr Golgi-Kompartement pumpen und ist daher nicht in der Lage, die kupferabhängige Eisenoxidase Fet3 zu aktivieren, die mit Fre1 das „High Affinity“ Eisenaufnahmesystem bildet (siehe auch 1.6). Daher ist dieser Stamm unter Eisenlimitation nicht lebensfähig (*Yuan et al.* [1995] und *Eide* [1997]). Die Hefezellen wurden mit der in pAH inserierten cDNA-Bank transformiert und auf His⁻ Selektionsplatten ausplattiert. Die entstandenen 2×10^6 Hefeklone wurden von den Platten abgeschwemmt, vereinigt und gründlich gemischt. Diese Zellsuspension wurde dann auf Selektionsplatten, denen zur Erzeugung von Eisenmangel 1 mM Ferrozin zugesetzt wurde, aufgebracht und drei Tage bei 30 °C inkubiert.

Von den 1 000 Kolonien, die auf den Selektionsplatten wuchsen, wurden 70 auf neue His⁻ Platten umgestrichen. Die aus ihnen isolierten Plasmide wurden durch Rücktransformation in *E. coli* amplifiziert und einer Restriktionsanalyse mit Hind III unterzogen. 62 der 70 getesteten Plasmide enthielten ein 3 kb großes cDNA Fragment, die anderen acht waren Leervektoren. Dies zeigte, dass die Komplementation der $\Delta ccc2$ Mutante sehr spezifisch war und dass wahrscheinlich nur ein Gen erhalten wurde (Abb. 4-10).

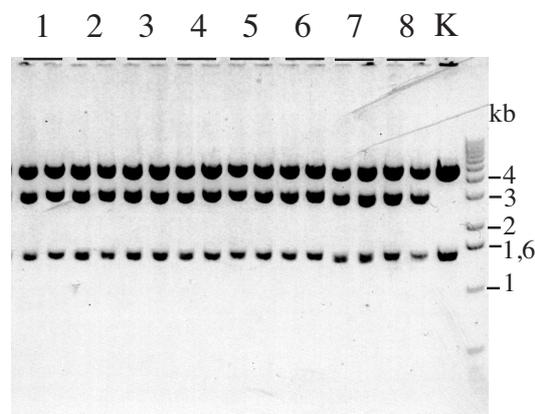


Abb. 4-10: Hind III Verdau von acht Klonen aus der *S. cerevisiae* $\Delta ccc2$ Komplementation. Pro Komplementationsklon wurde nach der Rücktransformation in *E. coli* Plasmid DNA aus zwei unabhängigen Transformanten isoliert, mit Hind III gespalten und auf einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde der mit Hind III gespaltene Leervektor pAH aufgetragen. In allen Isolaten ist ein DNA Fragment mit einer Größe von etwa 3 kb enthalten.

Um zu bestätigen, dass nur ein Gen durch die Komplementation isoliert wurde, wurden mehrere der erhaltenen cDNA Klone vom Vektorrückgrad aus ansequenziert und eine Datenbanksuche mit den erhaltenen Sequenzen gestartet. Alle Klone zeigten deutliche

Homologie zu den aus Hefe, Mensch und Pflanzen bekannten P-Typ-Kupfer-ATPasen Ccc2, Menkes und RAN1.

Die Sequenzen der Klone 21, 34 und 36 unterschieden sich deutlich voneinander, Klon 21 und 34 hatten mehrere Basenaustausche, während Klon 36 die gleiche Sequenz wie 34 hatte, jedoch sehr viel länger als die anderen beiden war. Letzteres stellte sich als Klonierungsartefakt heraus, da innerhalb des Fragments eine Poly-A-Sequenz gefunden wurde. Somit waren zwei cDNA-Fragmente in dem Vektor miteinander fusioniert.

Um die Komplementation zu bestätigen, wurden die Plasmide aus den drei Klonen in Strain 3 rücktransformiert. Mit den erhaltenen Transformanden wurde ein Tropftiterest auf Eisenmangelmedium (1 mM Ferrozin) durchgeführt, dem etwas Eisen (150 μ M) zugesetzt war, um ein besseres Wachstum des Wildtyps zu erhalten. Als Negativ- und Positivkontrollen wurden der Stamm Strain 3 und der dazugehörige isogene Wildtyp-Stamm YPH250 mit dem Leerplasmid pAH transformiert und ebenfalls in den Tropftiterest eingesetzt (Abb. 4-11). Deutlich war zu erkennen, dass der $\Delta ccc2$ Stamm Strain 3 auf der Selektionsplatte (1 mM Ferrozin, 150 μ M Eisen) keinerlei Wachstum zeigt, während die mit den Konstrukten pAHcta21, pAHcta34 bzw. pAHcta36 transformierten Stämme - ebenso wie der Wildtyp-Stamm - gut wachsen. Die Komplementation durch die aus *T. versicolor* stammenden cDNAs ist folglich sehr gut.

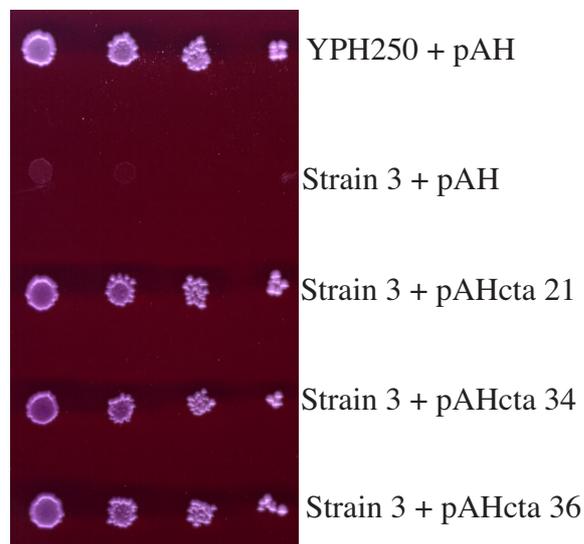


Abb. 4-11: Komplementation einer $\Delta ccc2$ Hefemutante mit *ctaA*. Der Stamm Strain 3 ($\Delta ccc2$ -Mutante) wurde mit den Plasmiden aus den Komplementationsklonen *cta21*, *cta34* bzw. *cta36* transformiert und auf eine 1 mM Ferrozin + 150 μ M $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ Selektionsplatte in Verdünnungen von 1 bis 10⁻³ aufgespottet. Als Positivkontrolle wurde der wt-Stamm YPH250 und als Negativkontrolle die $\Delta ccc2$ Mutante mit dem Leervektor pAH transformiert und aufgespottet.

4.2.5.2 Sequenzierung der cDNA der *ctaA* Klone

Die cDNA der Klone 21 und 34 wurden durch einen „Primer Walk“ sequenziert. Dabei wurde aufgrund der zuletzt erhaltenen Sequenz ein neuer Primer hergestellt (siehe 2.12), mit dem der darauf folgende Sequenzabschnitt sequenziert wurde. Dieses Verfahren wurde bei beiden Genen vom Vektorgerüst ausgehend jeweils vom 3'- und vom 5'-Ende durchgeführt, bis wieder in den Vektor sequenziert wurde. Die entstandenen überlappenden Sequenzen wurden durch die Programme ANALYSE und COMPLINE (Mac Molly Tetra Software Paket, Soft Gene Berlin) zu einer kompletten Sequenz zusammengesetzt (Anhang Abb. 7-4).

Der Vergleich beider vollständig sequenzierten Sequenzen der Klone 21 und 34 zeigte insgesamt 152 Nukleotid-Unterschiede, die in 11 Aminosäureaustauschen resultieren. (Anhang Abb. 7-4).

4.2.5.3 Southernblot-Analyse der *ctaA*-Sequenzen

Wegen der hohen Anzahl an Nukleotid- und Aminosäureaustauschen der cDNA Sequenzen von den Klonen 34 und 21 wurde auch für *ctaA* getestet, ob es sich um Allele oder zwei unterschiedliche Gene handelt.

Hierzu wurden je 10 µg der genomischen DNA von TV1 (Dikaryon) und F2-100 (Monokaryon) mit 10 U der Restriktionsenzyme BamH I, Not I, Hind III, Kpn I, EcoR I, Nsi I, Hind III + Not I, BamH I + Nsi I, EcoR I + BamH I und BamH I + Not I geschnitten und eine Southernblot-Analyse durchgeführt (Abb. 4-12). Als Sonde wurde ein 2096 bp großes PCR Fragment mit den Primern 34-Nb und 34-Cb aus dem genomischen Klon (4.2.5.4) amplifiziert und radioaktiv markiert (3.8). Das Fragment beginnt 250 bp nach dem zweiten Intron und endet ca. 330 bp vor dem Stoppkodon.

In den Spuren 1, 3, 7, und 8 ist deutlich zu erkennen, dass im Dikaryon TV1 zwei Fragmente hybridisieren, während im Monokaryon F2-100 nur jeweils eine Bande zu detektieren ist. Folglich handelt es sich bei den *ctaA* Klonen 34 und 21 um Allele. Diese werden im Folgenden als *ctaA-1* (*cta* 34) und *ctaA-2* (*cta* 21) bezeichnet.

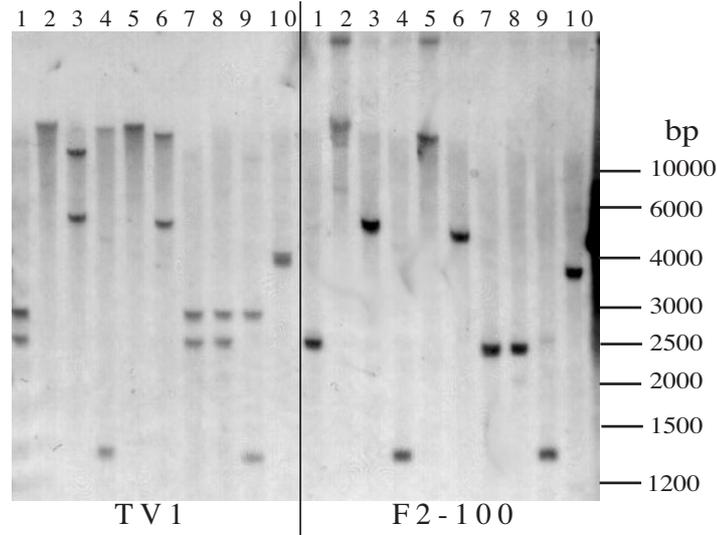


Abb. 4-12: Southernblot-Analyse der *ctaA* Allele. Es wurden pro Spur 10 µg genomische DNA des Dikaryons TV1 bzw. des Monokaryons F2-100 mit 1 = BamH I, 2 = Not I, 3 = Hind III, 4 = Kpn I, 5 = EcoR I, 6 = Nsi I, 7 = Hind III + Not I, 8 = BamH I + Nsi I, 9 = EcoR I + BamH I und 10 = BamH I + Not I geschnitten. Als *ctaA*-Sonde diente ein PCR Fragment, das mit den Primern 34-Nb und 34-Cb aus dem genomischen Klon (4.2.5.4) amplifiziert und dann radioaktiv markiert wurde. In den Spuren, in denen bei TV1 zwei Banden vorhanden sind, wurde bei F2-100 nur eine Bande detektiert. *T. versicolor* hat somit zwei *ctaA* Allele.

4.2.5.4 Isolierung eines genomischen *ctaA*-Gens

Eine genomische Sequenz des *ctaA*-Gens wurde durch die Durchmusterung einer genomischen *T. versicolor* Phagenbank (siehe 3.14) isoliert. Dabei wurden fünf mit der *ctaA* cDNA kreuzhybridisierende Phagen isoliert. Diese wurden zuerst aus dem Vektorrückgrad heraus mit T7- und T3-Primer und dann - soweit möglich - mit den für die Sequenzierung der *ctaA* cDNA-Sequenzen entworfenen Primern sequenziert. Für die Schließung von Sequenzlücken, die durch die Introns hervorgerufen wurden, wurden neue Primer hergestellt. Eine graphische Darstellung der genomischen Sequenz mit eingezeichneten Primern befindet sich im Anhang (Abb. 7-3). Aus den erhaltenen zwei Teilsequenzen konnte jedoch keine komplette Sequenz zusammengesetzt werden. Deshalb wurde die Lücke in der genomischen Sequenz durch eine PCR mit den Primern *cta-fw* und *cta-rv* (2.12), die aufgrund der flankierenden bekannten Sequenzen erstellt wurden, und mit Pfu-Polymerase geschlossen. Das erhaltene PCR Fragment wurde in pZerO kloniert und sequenziert. Aus allen Einzelsequenzen konnte dann eine Gesamtsequenz erstellt werden (Anhang Abb. 7-4), die über einen Sequenzvergleich dem Allel *ctaA-1* zugeordnet wurde. Vom Allel *ctaA-2* konnten nur 2200 bp des 5'- Bereichs erhalten werden, von denen 850 bp Promotorsequenz sind.

Ein komplettes genomisches Strukturgen von *ctaA-1* wurde durch PCR erhalten. Dazu wurden die Primer gcta-fw und gcta-rv (2.12) mit 500 ng genomischer DNA aus *T. versicolor* in einer PCR mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet. Die Bedingungen für die PCR waren: 3 min bei 94 °C, gefolgt vom 30 Zyklen von 10 s bei 94 °C, 10 s bei 60 °C und 4 min bei 68 °C. Die erhaltene etwa 4,9 kb große Bande wurde über ein 1 % iges Agarosegel gereinigt, mit dem Gel-Extraktion Kit (Qiagen) aus dem Gel extrahiert, in den Vektor pCR2.1 ligiert und in *E. coli* XL1-blue transformiert. Aus den erhaltenen Transformanten wurde das Plasmid isoliert und durch eine Analyse mit Restriktionsendonukleasen die positive Klone identifiziert (pCR2.1gcta, siehe Anhang Abb. 7-11). Einer von diesen wurde dann vollständig sequenziert. Er entsprach der Sequenz des *ctaA-1* Allels.

4.2.6 Charakterisierung des *ctaA*-Gens

Das isolierte Strukturgen von Allel *ctaA-1* wird, wie der Vergleich mit der cDNA zeigt (Anhang Abb. 7-4), vom Start-ATG bis zum doppel-Stoppkodon TGA TAG durch drei Introns unterbrochen, wobei das Intron II mit 643 Nukleotiden für Pilze ungewöhnlich lang ist. Ein viertes und alternativ gespleißtes Intron befindet sich zwischen dem Stoppkodon und den beiden putativen Polyadenylierungssignalen AATATT und ATAATT. Intron I ist 50 nt lang, Intron III besteht aus 53 nt, und Intron IV ist 100 nt lang. Die Konsensussequenz für die Spleißstellen entspricht der bei *tahA* (4.2.3) und der für Pilze beschriebenen (Ballance [1986]). Der isolierte 5'-Bereich von Allel *ctaA-2* reicht vom Promotorbereich bis knapp hinter das Intron II. Dieses ist auch, wie das Intron II aus dem Allel *ctaA-1*, ungewöhnlich groß. Mit 284 nt ist es aber um mehr als die Hälfte kleiner als das Intron II von *ctaA-1*. Die Analyse der beiden „Riesen“-Introns brachte allerdings keine ungewöhnlichen Sequenzhomologien zutage, die z.B. auf ein Insertionselement hinweisen würden. Die Sequenzen der 5'- und 3'-Spleißstellen der Introns entsprechen denen für *tahA* (4.2.3) und für Pilze beschriebenen (Ballance [1986]). Der Vergleich der Promotorregionen der beiden Allele zeigte, dass die ersten 430 nt stromaufwärts des Start ATG sehr konserviert sind. Es wurden sehr viele Sequenzen mit Homologien zu beschriebenen Elementen, die eine Rolle in der transkriptionellen Regulation spielen könnten, in beiden Allelen gefunden. Darunter sind Homologien zu Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren NIT2, GATA-1, PEA3, NF1, GCN4, GCR1 und Sp1. Inwieweit diese Elemente Einfluss auf die Transkription von *ctaA*

haben, muss noch geklärt werden. Eine TATA-Box wurde nicht gefunden, dafür wurde aber eine pyrimidinreiche Sequenz unmittelbar vor dem Start ATG detektiert.

4.2.7 Charakterisierung der Proteinsequenz von *ctaA*

Die cDNA von *ctaA* kodiert für ein Protein von 983 Aminosäuren, dessen Vergleich mit anderen P-Typ-Kupfer-ATPasen bis zu 40 % Identität und bis zu 60 % Homologie zeigte. Wie für Hefe Ccc2 und das humane Menkes Protein konnten auch für CtaA acht Transmembrandomänen prognostiziert werden (Abb. 4-13), deren Sequenzen stark konserviert sind.

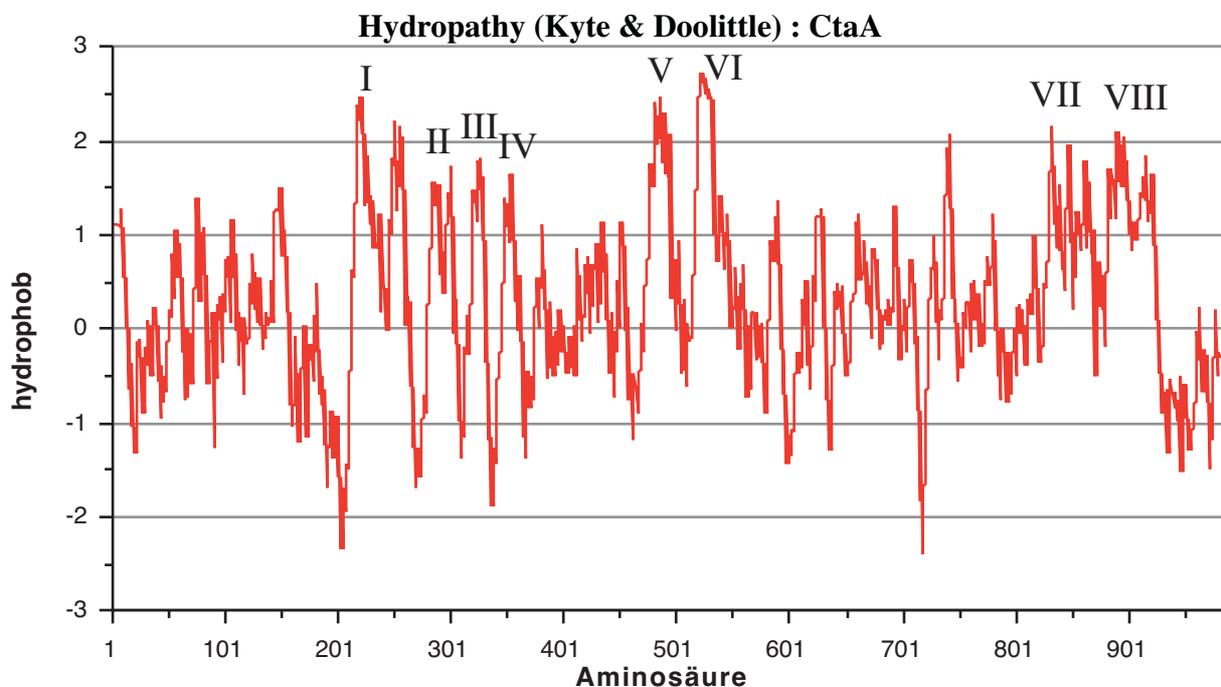


Abb. 4-13: Hydropathy-Analyse von CtaA: Die Hydropathy-Analyse von CtaA wurde mit dem Programm Gene InspectorTM nach dem Algorithmus von *Kyte und Doolittle* [1982] berechnet. Die putativen Transmembrandomänen sind mit 1 bis 8 gekennzeichnet.

Die bei allen Kupfer-P-Typ-ATPasen hoch konservierten und für die Funktion des Proteins essentiellen Motive wurden auch in CtaA gefunden (Abb. 4-14). So wurden im N-Terminus an den Positionen 50 und 124 zwei Kupferbindestellen mit den Peptidsequenzen GMTCGAC und GMTCCSSC lokalisiert, die der Konsensussequenz GMTCxxC für Kupferbindestellen in Proteinen entsprechen. Eine Phosphatasestelle, TGEP, befindet sich an Position 407 und das

CONSENSUS	1	MAGLSAAFNL	TxLLGTPRTP	TSGKLELPVL	DSYHNEGxHE	PLAAAGGPAS	EKCELRxxxx	xxEGMTCGAC	VxSTIEGMLRT
RAN1	1	MAPSRRDLQL	TPVTGGSSSQ	ISDMEEVGLL	DSYHNEANAD	DILTKIEEGR	DVSGLRKIQV	GVTGMTCAAC	SNSVEAALMN
Ccc2	1	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	AVHGMTCSAC	TNTINTQLRA
CtaA-1	1	MAGLSAAFN-	-GLLGTPTPT	TSGKLELPV-	-----GEHE	PLAAAGGPAS	EKCELR----	-TEGMTCSAC	VESIEGMLRT
CtaA-2	1	MAGLSAAFN-	-SLLGTPTPT	TSGKLELPV-	-----GKHE	PLAAAGGPAS	EKCELR----	-TEGMTCSAC	VESIEGMLRT
CONSENSUS	81	QPGxQxKVKA	LLAxRGVVEY	DPAVWDADKI	xxEIxDIGFD	AxxxPPTRAD	AIxxKEGTLR	YGMTCSSCx	STVETQLGAM
RAN1	81	VNGVFKAQVA	LLQNRADVVF	DPNLVKEEDI	KEAIEDAGFE	AEILAAEEQIQ	ATLV--GQFT	IGGMTCAACV	NSVEGILRDL
Ccc2	27	LKGVTKCDIS	LVTNECQVTY	DNEV-TADSI	KEIIEDCGFD	CEILRDSEIT	AISTKEGLLS	VQGMTGCSCT	STVTKQVGI
CtaA-1	67	QPGIQSVKVA	LLAERGVEY	DPAVWDADKI	IGEISDIGFD	ATLIPPTRAD	AI-----TLR	YGMTCSSCV	STVETQLGAM
CtaA-2	67	QPGIQSVKVA	LLAERGVEY	DPAVWDADKI	IGEISDIGFD	ATLIPPTRAD	TI-----TLR	YGMTCSSCT	STVETELGAM
CONSENSUS	161	PGVTSVxVSL	ATETCKVExD	xTMVGPREL	ERIExMGFDA	MVxxSDQEDA	TQLRSxxILx	xxxAxxxExP	LILTRTKEIQ
RAN1	161	PGVKRAVVL	STSLGEVEYD	PNVINKDDIV	NAIEDAGFEG	SLVQSNQDQK	LVLRVGDGILN	ELDAQVLEG-	-ILTRLNQVR
Ccc2	106	EGVESVVVSL	VTEECHVIYE	PSKTTLETAR	EMIEDCGFDS	NIIMDGNGNA	DMTEKTVILK	VTKAFEDESP	LILSSSERF
CtaA-1	142	PGVTSVAVSL	ATETCKVEFD	RTMVGPRELV	ERIEEMGFDA	MV--SDQEDA	TQLRS-----	-----	-LTRTKEIQ
CtaA-2	142	PGVTSVAVSL	ATETCKVEFD	RTMVGPRELV	ERIEEMGFDA	MV--SDHEDA	TQLRS-----	-----	-LTRTKEIQ
CONSENSUS	241	xxRLDLGVKS	IxISxxxxxx	TIKxxxxxxx	xRXLxxxEx	xGYKFxxFxx	xxxxxxxRLx	SKxxxxxxx	xSRFQxSLAF
RAN1	237	QFRLD-----	-RISGELEVV	---FDPEVVS	SRLVDGIEE	DG--FGFKFL	RVMSPYERLS	SKDGTGEASNM	FRRFISLVL
Ccc2	186	QFLDLGVKS	IEISDDMHTL	TIKCCNELG	IRDLRLHLER	TGYKFTVFSN	LDNNTQLRLL	SKEDERFNM	KRSKSTLLA
CtaA-1	203	EWR-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-SRFQWSLAF
CtaA-2	203	EWR-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-SRFQWSLAF
CONSENSUS	321	xIPVFxxTMI	APKIPFLVQx	PIVxYQETSL	CRGIYVRDVx	AxILTxxPxxF	WLGQKFYRxA	xKSLKHGSAT	MDVLxAIGTS
RAN1	321	SGYPLFFIQVI	CPHIALF--D	ALLVWR----	CGPFMMGDWL	KWALVSVIQF	WIGKRFYVAA	WRALRNGSTN	TEGKVGKLVG
Ccc2	266	IICMLLYMIV	PMMWPTIVQD	RIFPYKETSF	VRGLFYRDIL	GVILASVYIQF	SVGFYFYKAA	WASLKHGSAT	MDTLVVCVST
CtaA-1	215	AIPVFFVTMI	APKIPFL--A	PIVYQY---L	CRGIYVSDVV	AFILTTPALF	WLGQKFYRNA	YKSLKHGSAT	MDVLIAGTTS
CtaA-2	215	AIPVFFVTMI	APKIPFL--A	PIVYQY---L	CRGIYVSDVV	AFILTTPALF	WLGQKFYRNA	YKSLKHGSAT	MDVLIAGTTS
CONSENSUS	401	SAYIYSxGx	CFAAYNRESL	xYHPMFFD	STMLIMFVSL	GxYLENxAKG	KTSAALTxLM	xLxPSMATIY	TDAPACTQxx
RAN1	380	ASYFYSVGL	LYGAVT----	GFWSPTYFDA	SAMLITFVLL	GKYLESLAKG	KTSDAMKLVG	QLTPATAILL	TEGKVAIGLV
Ccc2	346	CAYTFVFSL	VHNMFHPSST	GKLPRIVFD	SIMIISYISI	GKYLETLAKS	QTSTALSKLI	QLTPSVCSII	SDVE---RNE
CtaA-1	290	SAYISSIGAM	CFAAYNRE-L	DYHPMFFD	STMLIMFVSL	GRYLENRAK	KTSAALTDLM	ALAPSMATIY	TDAPACTQ--
CtaA-2	290	SAYISSIGAM	CFAAYNRE-L	DYHPMFFD	STMLIMFVSL	GRYLENRAK	KTSAALTDLM	ALAPSMATIY	TDAPACTQ--
CONSENSUS	481	EKxIPTELVQ	VGDTVKLVP	DkxPADGTVL	RGTSTVDESA	VTGExVPVLK	QIGDxVIGGT	VNGLGTFDMV	VTRxGKDTAL
RAN1	456	EREIDALLIQ	PGDTLKVHPG	AKPADGTVV	WGSSYVNESM	VTGSEVPVSK	EVDSPVIGGT	INMHGALHMK	ATKVGSDAVL
Ccc2	423	TKEIPIELLQ	VNDIVEIKPG	AKPADGTVV	RGESEIDESL	MTGESILVLPK	KTGFPIVAGS	VNGPGRHYFR	TTTVGSETKL
CtaA-1	367	EKKIATELV	VGDTVKLVP	DKVPADGTVL	RGTSTVDESA	VTGEPVPLK	QIGDSVIGGT	VNGLGTFDMV	VTRAGKDTAL
CtaA-2	367	EKKIATELV	VGDTVKLVP	DKVPADGTVL	RGTSTVDESA	VTGEPVPLK	QIGDSVIGGT	VNGLGTFDMV	VTRAGKDTAL
CONSENSUS	561	AQIXKLVEDA	QTSKAPITQEF	ADxVxVxVFP	MVISLxLITF	AVMMVISHVV	DENALPALFH	KHGASKxAIC	LQLCISVVVV
RAN1	536	SOIISLVETA	QMSKAPIQKF	ADYVASIFVP	VVITLALFTL	VGWSIGGAV-	--GAYPDEWL	PENGTHVFVS	LMFISVVVI
Ccc2	503	ANIKVKMEA	QLSKAPITQY	ADYLASIFVP	GILLAVLFT	FIWCFILNI-	SANPPVAFVA	NTKADNFIC	LQTATSVVIV
CtaA-1	447	AQIVKLVEDA	QTSKAPITQEF	ADKAVGYFVP	MVISLITFT	AVMMVISHVV	DENALPALFH	KHGASKLAIC	LQLCISVVVV
CtaA-2	447	AQIVKLVEDA	QTSKAPITQEF	ADKAVGYFVP	MVISLITFT	AVMMVISHVV	DENALPALFH	KHGASKLAIC	LQLCISVVVV
CONSENSUS	641	ACPCALGLxT	PTAIMVGTGx	GAKNGxLIGK	GRALExSRFI	KRIAxDKTGT	xTEGLTVAA	LxWAPSSDHS	DLHSYATDGD
RAN1	613	ACPCALGLAT	PTAVMVATGV	GATNGVLIKG	GDALAKAHK	KYVIFDKTGT	LTQGKATVT-	-----	-----
Ccc2	582	ACPCALGLAT	PTAIMVGTGV	GAQNGVLIKG	GEVLEKFNSI	TTVFVDKGT	LTTGMFVVK	FLKDSNW--	-----
CtaA-1	527	ACPCALGLST	PTAIMVGTGM	GAKNGLILK	GRALEASRFI	KRIALDKTGT	VTEGKLVAA	LWAPSSDHS	DLHSYATDGD
CtaA-2	527	ACPCALGLST	PTAIMVGTGM	GAKNGLILK	GRALEASRFI	KRIALDKTGT	VTEGKLVAA	LWAPSSDHS	DLHSYATDGD
CONSENSUS	721	VPLTTKCVGN	AxRaxVxAMV	AATEARSEHP	LAKAxAVxGK	ELxLNKSMVP	IPEVVIxTFE	SVTGAGVKA	IxxLPGGKGQ
RAN1	672	---TTKFSE	MDRGEFLTLV	ASAEASSEHP	LAKAIVAYAR	HFHFDFEEST	DGETNNKDLQ	NSGWLLDTS	FSALPGKGQ
Ccc2	649	-----VGN	VDEDEVLACT	KATESIDHP	VSKAIIRYCD	GLNCNKALNA	V--VLESEYV	LNKGGIVSKCQ	VNG--NTYDI
CtaA-1	607	VPLTTKCVGN	ATRADVIAMV	AATEARSEHP	LAKAVAVHGK	EL-LNKSMVP	IPEVVIHTEF	SVTGAGVKA	I-LPGGKGQ
CtaA-2	607	VPLTTKCVGN	ATRADVIAMV	AATEARSEHP	LAKAVAVHGK	EL-LNKSMVP	IPEVVIQTFE	SVTGAGVKA	I-ALPGGKGQ
CONSENSUS	801	CxxNETLxxG	NARFILQTDG	AQLPSALAAF	DSEESHGRGT	SIFVSIxTSG	KPPVPILAIA	LADAPxPSSI	HaxRALQxMG
RAN1	749	CLVNEKMILV	GNRKLMSENA	INIPDHVEKF	VEDLEECSGT	GVIVAYN--G	KL-VGVMGIA	--DPLKREAA	LVVEGLLRMG
Ccc2	718	CIGNAELILE	DA---LKKSG	-----F	INSNVQDQNT	VSYVSVNG--	--HVFL-FE	INDEVKHDSS	ATVOYLQRNG
CtaA-1	685	C---TLFVG	NARFILQTDG	AQLPSALAAF	DSEESHGRGT	SIFVSIxTSG	KPPVPILAIA	LADAPRPSI	HAIRALQNMG
CtaA-2	685	C---TLFVG	NARFILQTDG	AQLPSALAAF	DSEESHGRGT	SIFVSIxTSG	KPPVPILAIA	LADAPRPSI	HAIRALQNMG
CONSENSUS	881	IEVNMLTGDx	KATALAVAKx	VGIKPENVWA	SxSPKGAxV	VTELMEKYGG	GKVAMVGDGI	NDSPxLxAAX	VGIAXSSGTS
RAN1	824	VRPIMVTGDN	WRTARAVAKE	VGI--EDVRA	EVMPAGKADV	IRSL-QKDG	T-VAMVGDGI	NDSPALAAAD	VGMIAIGATD
Ccc2	781	YETYMITGDN	NSAAKRVARE	VGISFENVYS	DVSPGTGKCDL	VKKIQDKEGN	NKVAVVGDGI	NDAPALALSD	LGIAISTGTE
CtaA-1	761	IEVNMLTGD	KATALAVAKQ	VGIKPENVWA	SMSPKGASV	VTELMEKYGG	G-VAMVGDGI	NDSPALVADS	VGIALSSGTS
CtaA-2	761	IEVNMLTGD	KATALAVAKQ	VGIKPENVWA	SMSPKGASV	VTELMEKYGG	G-VAMVGDGI	NDSPSLVAAS	VGIALSSGTS
CONSENSUS	961	VAIEAADIVL	MCGNDLNRxD	LLDVVxAXxL	SRxxFTxIRx	NLWVACLXNV	LGIPxAMGVF	FLPLGVSLPP	MGAXAAMAFS
RAN1	900	VAIEAADIVL	M-----RNN	LEDVITAIDL	SRKTLTRIL	NYVCFAMAYN	VSIPIAAGVF	FPVLRVQLPP	WAAGACMALS
Ccc2	861	IAIEAADIVL	LCGNDLNTNS	LRGLANAIDI	SLKTFKRIKL	NLFWALCYNI	FMIPIAMGVF	I-PWGITLPP	MLAGLAMAFS
CtaA-1	840	VAIEAADIVL	M-----RSD	LLDVVPALHL	SRAIFITIRR	NLWVACLXNV	LGIPLAMG-F	FLPLGVSLPP	MGAAAAAMAFS
CtaA-2	840	VAIEAADIVL	M-----RSD	LLDVVPALHL	SRAIFITIRR	NLWVACLXNV	LGIPLAMG-F	FLPLGVSLPP	MGAAAAAMAFS
CONSENSUS	1041	SVSVVTSSLA	LKWWVRPxE	LMPGESVQHE	TMFDxARExV	RDAXxSVRGL	VGSRRDVS	SQLPVEMSEA	V
RAN1	974	SVSVVCSSLL	LRRYKPKRLT	-----	TVLKITTE--	-----	-----	-----	-
Ccc2	940	SVSVVLSSLM	LKKWTPPDIE	--SHGISDFK	SKFSIGN--F	WSRLFSTRAI	AGEQ-DIE	AGL-MSNEEV	-
CtaA-1	913	SVSVVTSSLA	LKWWVRPAES	LMPGESVQHE	TMFDSAREAV	RDAMESVRGL	VGSRRDVS	SQLPVEMSEA	V
CtaA-2	913	SVSVVTSSLA	LKWWVRPQES	LMPGESVQHE	TMFDSARETV	RDADWSVRGL	VGSRRDVS	SQLPVEMSEA	V

Abb. 4-14: Vergleich der CtaA Allele mit Hefe Ccc2 und Arabidopsis RAN1: Der Vergleich wurde mit dem Programm Gene InspectorTM berechnet. Die in allen P-Typ-Kupfer-ATPasen konservierten Motive sind grün markiert. Diese sind die zwei Kupferbindestellen GMTCCxC, das Phosphatase-motiv TGEF, das Kupfer-Transduktions-Motiv ACPC, die Phosphorylierungsstelle DKTGT, die Dephosphorylierungsstelle TGEF, das ATP-Bindemotiv GDGIN und das noch nicht genauer definierte SEHPL-Motiv. Ein in allen P-Typ-Kupfer-ATPasen konserviertes Methionin ist in Pink dargestellt. Die 11 Aminosäureunterschiede der allelischen Proteine CtaA-1 und CtaA-2 sind rot gekennzeichnet.

für die Kupfertransduktion wichtige APCPxLG-Motiv in der Membrandomäne V auf Position 527, gefolgt von einer Phosphorylierungsstelle, DKTGT (572), und einer ATP-Binde-Domäne, GDGIND (816). Das in seiner Funktion noch nicht genauer charakterisierte SEHPL-Motiv befindet sich in CtaA an Position 633. Ein an der Kupfertransduktion beteiligtes, in Membrandomäne VIII lokalisiertes Methionin, ist auch in CtaA konserviert. Auf Proteinebene unterscheiden sich die beiden CtaA Allele durch elf Aminosäureaustausche, die allerdings in keinem dieser Motive liegen.

4.2.8 Isolierung der Gene von zwei putativen Kupfer-Permeasen (*cupA* und *cupB*) aus *T. versicolor*

4.2.8.1 Isolierung des Gens der Kupfer-Permease *cupA* durch Komplementation einer *S. cerevisiae* $\Delta ctr1$ -Mutante

Die *S. cerevisiae* $\Delta ctr1$ -Mutante (BY4741 $\Delta YPR124w$) ist eigentlich eine $\Delta ctr1$ - $\Delta ctr3$ Doppelmutante, da das *CTR3* Gen in den meisten Laborstämmen durch ein Transposon zerstört wurde (Knight et al. [1996]). Dies trifft auch auf den hier verwendeten Stamm zu. Er ist aufgrund des totalen Verlustes seiner hoch-affinen Kupferaufnahme-proteine nicht mehr in der Lage, seine kupferhaltigen Proteine unter Kupfermangelbedingungen zu aktivieren. Dazu gehören Proteine der Atmungskette (Cytochrom-C-Oxidase) ebenso wie Proteine für die hoch-affine Eisenaufnahme wie z. B. Fet3 (siehe 1.5.1). Solch eine Mutante kann also auf einem Selektionsmedium, das sowohl Eisenmangel induziert als auch ausschließlich veratembare C-Quellen zur Verfügung stellt (2 % Glycerin, 2 % EtOH, 1 mM Ferrozin), nicht wachsen. Der $\Delta ctr1$ Stamm wurde mit der pAH-cDNA-Bank (4.2.1 Tabelle 1) transformiert und die ca. 3×10^5 Kolonien der Transformanten von den Platten abgekratzt, vereinigt, gemischt. Je 100 μ l einer 10^{-4} -Verdünnung wurden dann auf dem Selektionsmedium ausplattiert. Die auf diesen Platten wachsenden Klone sollten eine *T. versicolor* cDNA enthalten, die den Kupfermangel der Zellen kompensieren kann. Um dies zu überprüfen, wurde aus 30 Komplementationsklonen das Plasmid isoliert und in *E. coli* rücktransformiert. Pro Rücktransformation wurde aus zwei *E. coli* Klonen das Plasmid isoliert, mit der Restriktionsendonuclease Hind III geschnitten und anschließend durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 4-15). Es konnten in dem

Agarosegel zwei verschieden große cDNA-Fragmente nachgewiesen werden. Das ca. 730 bp große Fragment 1 trat 18 mal auf, das etwa 1 000 bp große Fragment 2 wurde 12 mal dedektiert.

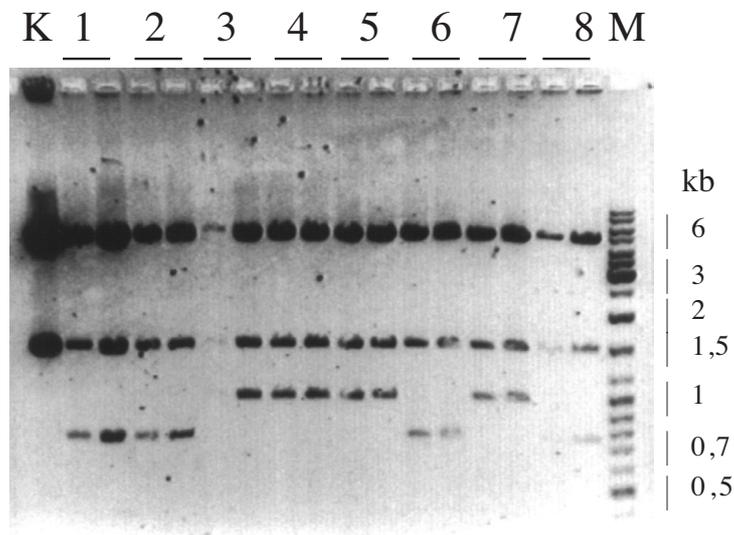


Abb. 4-15: Restriktionsverdau der Plasmide, die aus der Komplementation einer $\Delta ctr1$ Hefemutante (Selektion auf Eisenmangel) mit einer *T. versicolor* cDNA-Bank isoliert wurden. Pro Komplementationsklon 1-8 wurden zwei Plasmide isoliert und mit Hind III gespalten. Als Kontrolle (K) wurde der Leervektor mit Hind III gespalten. Es konnten zwei verschieden große cDNA-Fragmente (ca. 730 und 1 000 bp) aus der Komplementation auf Selektionsmedium mit 2 % Glycerin, 2 % EtOH, 1 mM Ferrozin isoliert werden.

Die beiden Fragmente wurden vom Vektorgerüst ausgehend mit den Primern ADH-L und ADH-R sequenziert und eine BLAST-Datenbanksuche (NCBI) mit der aus den cDNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen durchgeführt. Dies ergab für das Fragment 1 eine 28 % ige Identität zu Ctr1 aus *S. cerevisiae* (Abb. 4-16) und für Fragment 2 eine 37 % ige Identität zu Msf1 aus *S. cerevisiae*. Für Msf1 ist in Hefe keine genauere Funktion bekannt, möglicherweise ist es an der inner- oder intramitochondrialen Sortierung beteiligt und wurde deshalb als „Mitochondrial Sorting Faktor 1“ bezeichnet. Die Homologie von Fragment 1 zu Ctr1 hingegen legte eine Beteiligung an der Kupferaufnahme nahe. Deshalb wurde dieses cDNA-Gen als *cupA* (Copper Uptake Permease A) bezeichnet. Diese Isolierung wurde in unserem Labor von der Praktikumsstudentin *Karolin Meixenberger* [2000] durchgeführt.

```

gi|6325380|ref|NP_015449.1| (NC_001148) High affinity copper transporter into the cell,
probable integral membrane protein; Ctr1p [Saccharomyces
cerevisiae]
gi|1345859|sp|P49573|CTR1_YEAST COPPER TRANSPORT PROTEIN CTR1 (COPPER TRANSPORTER 1)
gi|629978|pir|A53010 copper transport protein - yeast (Saccharomyces cerevisiae)
gi|407948|gb|AAA17369.1| (U02511) copper transport protein [Saccharomyces cerevisiae]
gi|1066470|gb|AAB68064.1| (U40828) P9642.3 gene product [Saccharomyces cerevisiae]
Length = 406

Score = 35.4 bits (80), Expect = 0.30
Identities = 28/97 (28%), Positives = 38/97 (38%), Gaps = 15/97 (15%)

Query: 81 PSASAEPKSGSVEE--LKISGLPXXXXXXXXXXXXXXXXLPPFIPS-----HDIPRGVLYA 133
PSA+++ +G E +I GLP F+PS HDI R L
Sbjct: 195 PSANSKDEGKHYDTENNFEIQGLPKLPNLLSDI-----FVPSLMDLFHDIIRAFLVF 246

Query: 134 FQALLTYALMLAVMTFQAAFXXXXXXXXXXXXXEVLFGR 170
++ Y LMLA M+F + EV F R
Sbjct: 247 TSTMIIYMLMLATMSFVLTYVFAVITGLALSEVFFNR 283

```

Abb. 4-16: Ergebnis einer Blast Datenbanksuche (NCBI) mit der von *cupA* abgeleiteten Proteinsequenz. Es wurde eine 38 % ige Homologie zu Ctr1 aus *S. cerevisiae* gefunden.

Um das Ergebnis noch einmal zu überprüfen und um sicherzustellen, dass *MSF1* wirklich mit der Kupferaufnahme in Verbindung steht, wurde der Komplementationstest noch ein mal auf einem leicht modifizierten Selektionsmedium mit 2 % Glycerin, 2 % EtOH und 10 μ M BCS wiederholt. Bei diesem Medium beruht die Selektion nicht auf durch Kupfermangel induzierten Eisenmangel sondern auf reinem Kupfermangel. Die hieraus isolierten Plasmide wurden auch mit Hind III geschnitten und auf einem 1 % igen Agarosegel analysiert (Abb. 4-17). Alle enthielten ein ca. 750 bp großes cDNA-Fragment, deren abgeleitete Proteinsequenzen die gleiche Homologie zu Ctr1 wie das oben isolierte Gen *cupA* zeigten (Abb. 4-16). Ein homologes Gen zu *MSF1* konnte bei dieser Selektion nicht isoliert werden.

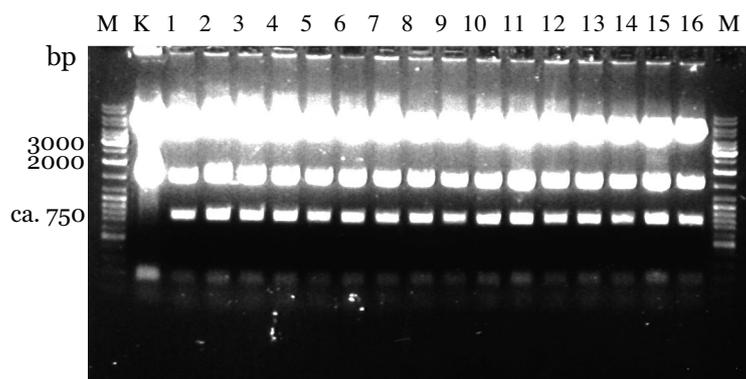


Abb. 4-17: Restriktionsverdau der Plasmide, die aus der Komplementation einer BY4741 Δ *ctr1* Hefemutante (Selektion auf Kupfermangel) mit einer *T. versicolor* cDNA-Bank isoliert wurden. Pro Komplementationsklon 1-18 wurde ein Plasmid isoliert und mit Hind III gespalten. Als Kontrolle (K) wurde der Leervektor mit Hind III gespalten. Es konnte ein ca. 750 bp großes cDNA-Fragment aus der Komplementation auf 2 % Glycerin, 2 % EtOH, 10 μ M BCS Selektionsmedium isoliert werden.

4.2.8.2 Isolierung des Gens einer putativen Kupfer-Permease aus *T. versicolor* durch Komplementation einer $\Delta cup5$ Hefemutante

Die *S. cerevisiae* BY4741 $\Delta cup5$ Mutante wurde in einer essentiellen Untereinheit der Protonen-transportierenden V-Typ-ATPase, die im Golgi-Kompartiment lokalisiert ist, deletiert (Nelson *et al.* [1989]). Diese Mutation führt, wie die oben beschriebenen Gendisruptionen, ebenfalls zu einem Defekt in der hoch-affinen Eisenaufnahme, da auch hier Fet3 nicht mehr mit Kupfer beladen werden kann (Eide *et al.* [1993]). Diese Mutante wächst daher nicht auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen unter Eisenmangelbedingungen. Deshalb wurden die mit der *T. versicolor* cDNA-Bank (in dem Vektor pAH) transformierten BY4741 $\Delta cup5$ Zellen auf Selektionsplatten ausplattiert, die 2 % Glycerin, 2 % EtOH und 1 mM Ferrozin enthielten. Von den wachsenden Hefekolonien wurden 25 gepickt, die Plasmide isoliert und in *E. coli* transformiert. Von jeder Transformation wurde das Plasmid aus zwei unabhängigen *E. coli*-Klonen gereinigt, mit Hind III geschnitten und durch eine Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 4-18). Aus einem Klon konnte ein ca. 800 bp großes cDNA-Fragment isoliert werden, dessen abgeleitete Peptidsequenz deutliche Homologie zu den Kupfer-Permeasen Ctr1, Ctr2 und Ctr3 aus *S. cerevisiae* aufwies (Abb. 4-19). Das gesamte cDNA-Gen wird im Folgenden als *cupB* bezeichnet. Die anderen cDNA-Isolate waren weder zu Kupferhomeostase-Genen noch zu *CUP5* homolog.

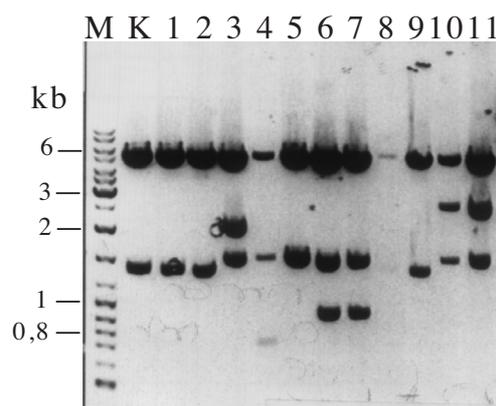


Abb. 4-18: Restriktionsverdau der Plasmide, die aus der Komplementation einer BY4741 $\Delta cup5$ Hefemutante mit *Trametes* cDNA isoliert wurden. Die mit Hind III verdauten Plasmide 1 bis 11 zeigen verschieden große Fragmente. Das ca. 800 bp große Fragment in Spur 4 zeigt Homologie zu den Hefe Kupfer-Permeasen Ctr1, Ctr2 und Ctr3. In der Kontrollspur K wurde der mit Hind III verdaute Leervektor aufgetragen.

```

ref|NP_015449.1| Copper transport protein; Ctr1p [Saccharomyces cerevisiae]
Score = 44.9 bits (104), Expect = 7e-04
Identities = 42/181 (23%), Positives = 76/181 (41%), Gaps = 18/181 (9%)
Query: 21  TSVKAHNSGMDMTDGMLEAGQMLTYLHFTPGDIVLFYGWVSSKGMVGTICIGLFLF 80
      +S + S+GMDM M M+ TY ++ VLF+ ++ G G + +
Sbjct: 110 SSDNSSSSGMDMDSMGMNYLTP--TYKNYP----VLFHHLHANN SGKAFGIFLLFVVA 163
Query: 81  ALVERWIAACRGVMEAHWRKRAQIAQADRINLPTTTSSEKA----TLTSTRVRDVTTLRN 136
      A V + + +E HW K+ Q LP+ S ++ T + ++ L N
Sbjct: 164 AFVYKLLLFVSWCLEVHWFKKWD-KQNKYSTLPSANSKDEGKHYDTENNFEIQGLPKLPN 222
Query: 137 APPFSWA-----HDVARGLLHTVQVAIQFIFMLIVMTFQVSFIISLVIGLVGETMFG 189
      + HD+ R L I ++ ML M+F +++++ +++ GL + E F
Sbjct: 223 LLSDFIVPSLMDLFDHDIIRAFLVFTSTMIYMLMLATMSFVLTYVFAVITGLALSEVFFN 282
Query: 190 R 190
      R
Sbjct: 283 R 283

```

```

>ref|NP_012045.1| copper transporter; Ctr2p [Saccharomyces cerevisiae]
Score = 34.0 bits (76), Expect = 1.3
Identities = 37/176 (21%), Positives = 71/176 (40%), Gaps = 47/176 (26%)
Query: 21  TSVKAHNSGMDMTDGMLEAGQMLTYLHFTPGD-----IVLFYGWV 64
      +S+ +S MD +M+ M+ AG + +H GD V+F W
Sbjct: 21  SSLIGYSKKMD-SMNHKMEGNAGHDHSDMHMGDDTCSMMLFSWSYKNTCVVFEWWHI 79
Query: 65  SSKGAMVGTICIGLFLFALVERWIAACRGVMEAHWRKRAQIAQADRINLPTTTSSEKATLT 124
      + ++ +C+ +F A + ++ C H R+ +Q R+ LP
Sbjct: 80  KTLPLGLILSCLAIFGLAYLYEYLYKCY-----VHKRQLSQ-----RVLLPN----- 119
Query: 125 STRVRDVTTLRNAPPFSWAHDVARGLLHTVQVAIQFIFMLIVMTFQVSFIISLVIG 180
      R+ + A V+ +L+ +QV F+ ML+ MT+ +++++V G
Sbjct: 120 -----RSLTKINQADKVSNSILYGLQVGFMSFMLMLVFMTYNGWMLAVVCG 165

```

```

>ref|NP_013515.1| Copper Transporter; Ctr3p [Saccharomyces cerevisiae]
Score = 31.3 bits (69), Expect = 8.8
Identities = 13/43 (30%), Positives = 20/43 (46%)
Query: 62  WVPSSKGMVGTICIGLFLFALVERWIAACRGVMEAHWRKRAQI 104
      W +KG G+CIG F +V +W+ + KR +I
Sbjct: 36  WRNDTKGKFAGSCIGCFALVVVAQWLTRFSRQFDVELLKRQKI 78

```

Abb. 4-19: Blast-Analyse der aus *cupB* abgeleiteten Aminosäuresequenz. Es wurden Homologien zu den Hefeproteinen Ctr1, Ctr2 und Ctr3 gefunden.

4.2.9 Southernblot-Analyse von *cupA* und *cupB*

Um zu untersuchen, ob beide Gene nur einmal pro Kern vorhanden sind, wurden je 10 µg genomische DNA des Dikaryons TV1 und der Monokaryen F6-79 und SP4 mit den Enzymen BamH I, Cla I, Pvu I, Sph I, Xho I, und Sph I + Xho I geschnitten und auf einem 1 % igem Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wurde dann auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham) transferiert und mit Sonden, die aus der cDNA von *cupA* und *cupB* hergestellt worden waren, hybridisiert. Für alle drei Stämme wurden die gleichen, mit den eingesetzten

cDNAs kreuzhybridisierenden Banden, gefunden (Abb. 4-20 und Abb. 4-21). Dies bedeutet, dass *cupA* und *cupB* pro Genom nur einmal vorkommen, und dass sich die in diesen Stämmen eventuell vorhandenen Allele nicht besonders stark unterscheiden.

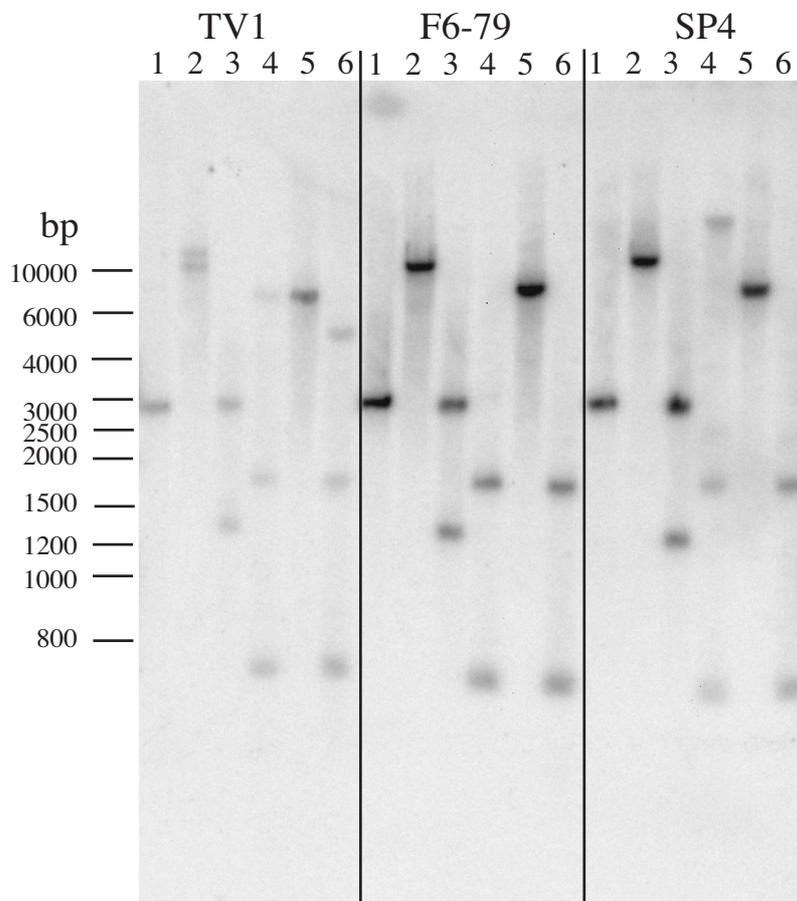


Abb. 4-20: Southernblot-Analyse von *cupA* in den *T. versicolor* Stämmen TV1, F6-79 und Sp4: Die genomische DNA wurde mit den Enzymen 1 = BamH I, 2 = Cla I, 3 = Pvu I, 4 = Sph I, 5 = Xho I, und 6 = Sph I + Xho I geschnitten und mit einer ^{32}P markierten *cupA*-Sonde hybridisiert. Es wurde jeweils nur ein *cupA*-Gen pro Kern detektiert.

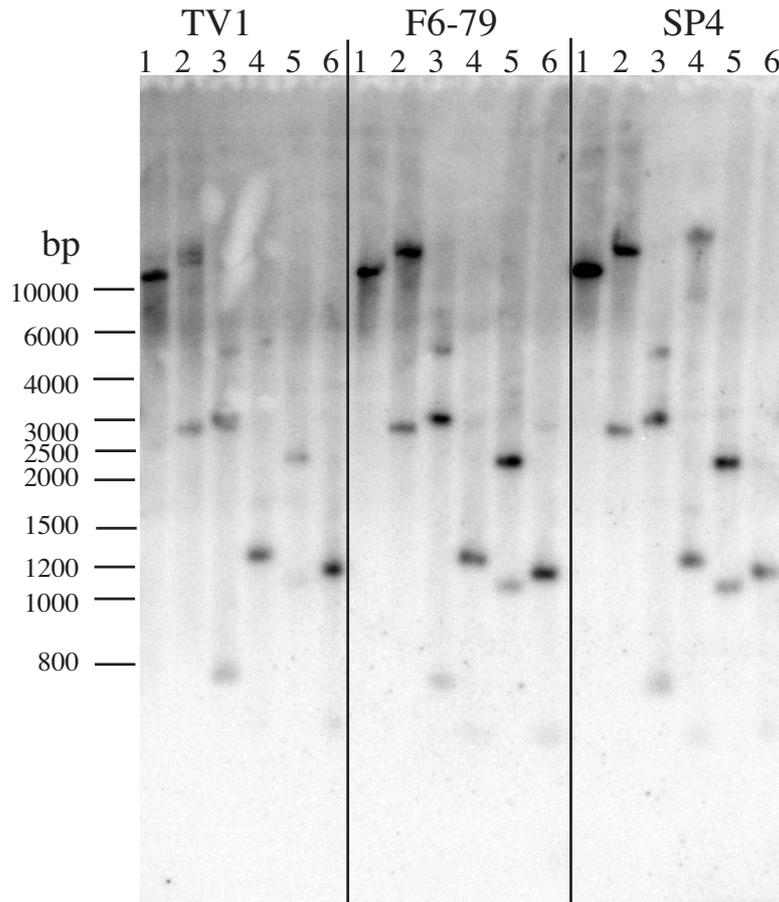


Abb. 4-21: Southernblot-Analyse von *cupB* in den *T. versicolor* Stämmen TV1, F6-79 und Sp4: Die genomische DNA wurde mit den Enzymen 1 = BamH I, 2 = Cla I, 3 = Pvu I, 4 = Sph I, 5 = Xho I, und 6 = Sph I + Xho I geschnitten und mit einer ^{32}P markierten *cupB*-Sonde hybridisiert. Es wurde jeweils nur ein *cupB*-Gen pro Kern detektiert.

4.2.10 Charakterisierung von *cupA* und *cupB* auf Proteinebene.

Die vollständige cDNA von *cupA* kodiert für ein 180 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 19 kD, die cDNA von *cupB* für ein Protein mit 198 AS und einem Molekulargewicht von 24,7 kD. Der Vergleich mit den homologen Proteinen hCtr1 aus dem Menschen und COPT1 aus *A. thaliana* (Abb. 4-22), sowie die BLAST-Analysen (Abb. 4-19 und Abb. 4-16) zeigen gleichermaßen, dass die Homologie der beiden Proteine zu den anderen bekannten „High Affinity“ Kupferaufnahme-transportern nicht sehr hoch ist ($\leq 40\%$). Diese Proteingruppe ist aber im allgemeinen sehr heterogen. Allen gemeinsam ist ein MLxxM Motiv, das in der ersten der beiden putativen C-terminalen Membrandomäne liegt (siehe hierzu auch Abb. 4-23). Eine potentielle Kupferbindedomäne mit Histidin- und / oder Cysteinresten ist am C-Terminus lokalisiert. Dieser Bereich scheint allerdings nur funktionell konserviert zu sein, da die Motive mit HxxH, HxxxH, CxC und CH sehr variieren. Dies trifft

auch auf den N-Terminus zu, der bei allen homologen Proteinen der Ctr-Familie methionin- und histidinreich ist (siehe auch 1.6). Dieser Bereich ist bei CupA sehr viel kürzer als z.B. bei Ctr1, hCtr1 oder COPT1. Bei CupB befindet sich dort eine putative Membrandomäne gefolgt von der methionin- und histidinreichen Sequenz .

hCTR1	1	MDHSHHTGMS	CMSDN-----S	TMQRPHHH--	-PTTSASHSR	GGGDSNMMMM
COPT1	1	MDHDHMHGMP	-RPSS-----S	SSSSPSS---	-MMNNGSMDE	GGGHHHMKMM
CupB	1	MSFRQFFLIP	LLAALLAVLA	TSVKAHSNGM	DMTMDGAMDL	EAGQ-----M
CupA	1	MT-----	-----S	TA-----	DM-----	-----M
hCTR1	44	MPMTFYFGFK	NVE-LLFSSL	VINTAGEM-A	GAFVAVILLA	VFYEGLD-SP
COPT1	42	MHMTFFWG-K	NTE-VLFSGW	P-GTSSGMYA	LCLIFVFFLA	VLTEWLAHSS
CupB	46	LT---YLHFT	PGDIVLFYGW	VPSSKGAMVG	TC-IGLFLFA	-LVERWIAAC
CupA	9	VP---WLHFT	GGDNLFFATW	HPSSKGAIAG	AC-IGLALLA	-FFERWVNGM
hCTR1	91	REPAVTKW--	-----	-----NHPYV	DTQNCWAADA	--EL-----
COPT1	89	LLRGST----	-----	-----G	DSAN-RAAG-	---L-----
CupB	91	RGVMEAHWRK	RAQ--IAQAD	---RINLP-T	TTSSEKAT--	-----LT
CupA	54	RGAAEAYWGR	RALALISDTE	PEPSCHSP-S	ASAEPKGSGS	VEELKISGLP
hCTR1	116	-----	---SSPPAN-	-----MLH	IIQVVISYLL	MLIFMTYNG-
COPT1	105	-----	---IQTAVY-	-----TLR	I---GLAYLV	MLAVMSFNAG
CupB	125	S---TRVRDTV	TLRNAPPFSW	AHDVARGLLH	TVQVAIQFIF	MLIVMTFQVS
CupA	103	SQDSTSRQRR	SRRTLPPFIP	SHDIPRGVLY	AFQALLTYAL	MLAVMTFQAA
hCTR1	144	-YLCIAVTAG	AGTRYFLFSW	K--KAVVVDI	-TEY-----C	H-
COPT1	131	VFL-VAL-AG	HAVGFMLFGS	QTFRNTSDDR	KTNVPPSGC	AC
CupB	173	-FI-ISLVIG	LGVGETMFGR	-----FA--	-SHAAMH---	--
CupA	153	-FI-ISIIVG	SGIGEVLFGR	-----VGGA	KSHL-LH---	--

Abb. 4-22: Vergleich zwischen CupA, CupB und den homologen Proteinen aus *Arabidopsis* (COPT1) und Mensch (hCtr1): Der mit dem Programm Gene InspektorTM berechnete Vergleich zeigt, dass die Proteine nicht sehr homolog sind, und dass nur ein konserviertes Motiv MLxxM (rot) auftritt. Putative Kupferbindestellen wurden im N- und C-Terminus gefunden und sind blau markiert

Der Vergleich der Hydropathy-Analysen (*Kyte und Doolittle* [1982]) der vier Proteine hCtr1, COPT1, CupA und CupB zeigt, dass eine strukturelle Ähnlichkeit dieser homologen Proteine zu finden ist. So wurden bei allen Proteinen drei Transmembrandomänen prognostiziert (Abb. 4-23), die von ihrer Lage her sehr ähnlich gruppiert sind. Die beiden Membrandomänen 2 und 3 sind eng beieinander im C-Terminus lokalisiert. Die Membrandomäne 1 liegt eher in der Mitte der Proteine. Bei CupA liegt sie mehr zum N-Terminus hin verschoben, was im Verhältnis zu hCtr1, COPT1 und CupB zu einer längeren Aminosäuresequenz zwischen Membrandomäne 1 und 2 führt. Zusätzlich ist der N-terminale Bereich vor der ersten Membrandomäne bei CupA viel kürzer als bei den Homologen (siehe auch Abb. 4-22). Bei CupB wurde im Gegensatz zu den anderen homologen Proteinen zusätzlich noch eine vierte Membrandomäne direkt am N-Terminus prognostiziert. In der Membrandomäne 3 liegt das für alle konservierte MLxxM Motiv.

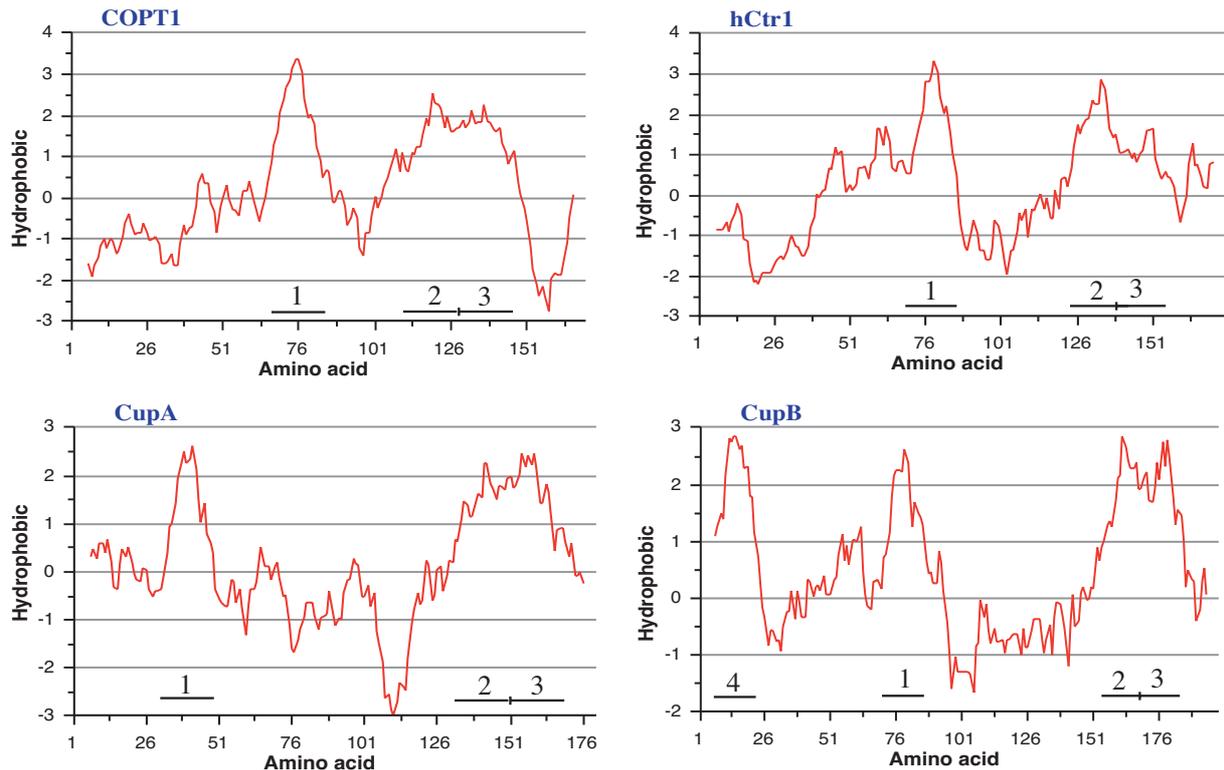


Abb. 4-23: Hydropathy-Analyse nach *Kyte und Doolittle* [1982] mit den Proteinen COPT1 (*A. thaliana*), hCtr1 (*H. sapiens*), CupA und CupB. Die vier Proteine zeigen alle eine ähnliche Anordnung der Transmembrandomänen 1, 2 und 3. Nur für CupB wurde noch eine vierte Transmembrandomäne am N-Terminus prognostiziert.

4.2.11 Funktionelle Charakterisierung von *cupA* und *cupB*

Da *cupB* nicht durch eine Komplementation einer Kupferaufnahmemutante, sondern einer $\Delta cup5$ Hefemutante isoliert wurde (siehe 4.2.8.2), musste für dieses Gen die Beteiligung an der Kupferaufnahme noch gezeigt werden. Dazu wurde die vollständige cDNA von *cupB* in den Hefeexpressionsvektor pAL und die vollständige cDNA von *cupA* in den Vektor pAU inseriert (siehe Anhang Abb. 7-8 Abb. 7-9). Diese Konstrukte wurden dann in die $\Delta ctr1$ Hefemutante bzw. in den isogenen Wildtyp-Stamm BY4741 transformiert und zwar so, dass je Stamm die beiden Leervektoren (pAU + pAL), die Einzelkonstrukte mit dem korrespondierenden Leervektor (pAL + pAUCupA, pALcupB + pAU) und beide Konstrukte gleichzeitig (pALcupB + pAUCupA) eingebracht wurden.

Um nun zu überprüfen, ob die beiden Gene wirklich an der Kupferaufnahme beteiligt sind, wurde die Toxizität hoher Kupferkonzentrationen in der Zelle ausgenutzt. Da *cupA* und *cupB* durch den *ADHI*-Promotor der Plasmide dereguliert überexprimiert werden, sollten die

Stämme, wenn sie ein in Hefe funktionsfähiges Kupferaufnahmeprotein überexprimieren, nicht unter erhöhten Kupferkonzentrationen wachsen können. Für diesen Test wurden die oben konstruierten Stämme auf Selektionsplatten (2.10.2), die 100 μM CuSO_4 enthielten, in den Verdünnungen von 1 bis 10^{-3} aufgetropft (Abb. 4-24). Deutlich ist zu erkennen, dass auf der kupferhaltigen Platte die *cupA* überexprimierenden Stämme im Vergleich zu den Kontrollstämmen stark vermindertes Wachstum zeigen. Dieser Effekt tritt bei den *cupB* überexprimierenden Stämme dagegen nicht auf. Die *cupA* und *cupB* koexprimierenden Stämme sind gegenüber Kupfer empfindlicher als *cupA* exprimierende Stämme, was auf eine Beteiligung des *cupB* Gens am Kupferstoffwechsel der Zellen hinweisen könnte. Auf der Kontrollplatte ohne zusätzliches Kupfer wachsen alle Stämme gleich gut.

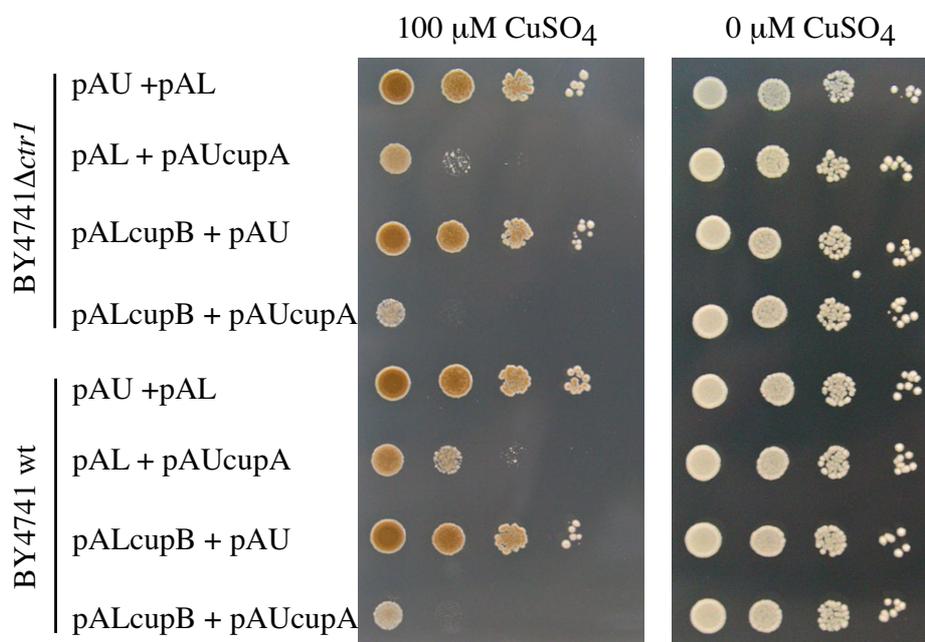


Abb. 4-24: Kupferaufnahme test von *cupA* und *cupB* überexprimierenden Hefestämmen: Die Hefestämme BY4741 und BY4741 $\Delta ctr1$ wurden mit den Konstrukten pALcupB oder pAUpupA bzw. mit beiden transformiert und in Verdünnungen von 1 bis 10^{-3} auf Selektionsmedium (2.10.2), dem 100 μM CuSO_4 bzw. 0 μM CuSO_4 zugesetzt wurde, aufgetropft. Als Kontrolle wurden beide Stämme mit den Leerplasmiden transformiert. Die *cupA* exprimierenden Stämme zeigen eindeutige Wachstumsprobleme auf Kupfer, während die *cupB* exprimierenden Stämme normales Wachstum aufwiesen. Die *cupA* und *cupB* koexprimierenden Stämme zeigen das geringste Wachstum aller Stämme auf 100 μM Kupfer. Auf der Kontrollplatte ohne zusätzliches Kupfer wachsen alle Stämme gleich.

Eine Hefe $\Delta ctr1$ Mutante ist nicht mehr in der Lage, Kupfer-Zink-SOD mit Kupfer zu beladen und kann daher nicht auf Kupfermangelmedium (50 μM BCS) wachsen, dem zusätzlich 100 μM der ROS (reaktiv oxygene species) bildenden Chemikalie Paraquat zugesetzt wurde.

In einem weiteren Experiment wurde die Komplementation dieser Mutante durch *cupA* und *cupB* auf BCS und Paraquat getestet. Dazu wurden die oben hergestellten rekombinanten $\Delta ctr1$ Hefestämme auf Selektionsplatten mit 50 μM BCS und 100 μM Paraquat aufgetropft. Als Kontrolle wurde eine Platte ohne BCS und Paraquat verwendet. In Abb. 4-25 ist deutlich zu erkennen, dass sowohl *cupA* als auch *cupB* diesen Phänotyp der $\Delta ctr1$ Mutante komplementieren können. Die Koexpression der beiden Gene zeigt hier keine signifikante Verbesserung der Komplementation im Vergleich zu den Einzelexpressionen. Die Komplementation an sich erreicht aber nie das Wildtyp-Niveau. Auf der Kontrollplatte wachsen alle Stämme etwa gleich, nur die $\Delta ctr1$ -Mutante wächst etwas schlechter, da das Selektionsmedium wahrscheinlich zu wenig Kupfer enthält.

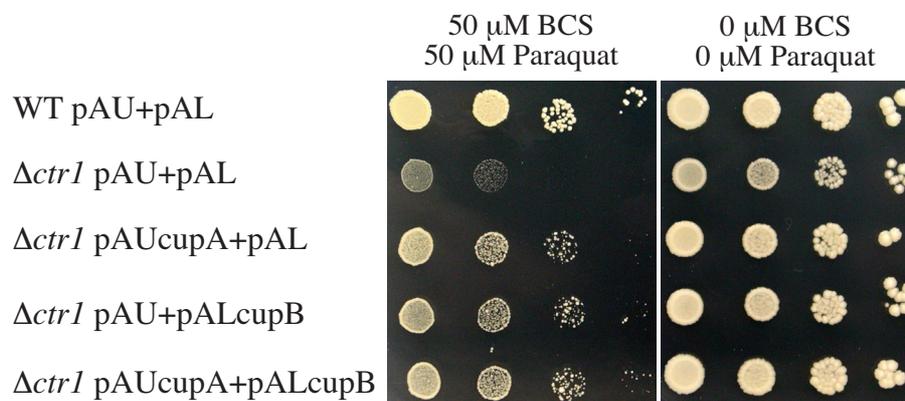


Abb. 4-25: Komplementation einer $\Delta ctr1$ Mutante durch *cupA* und *cupB* unter oxidativem Stress. Der Hefestamm BY4741 $\Delta ctr1$ wurde mit den Konstrukten pALcupB oder pAUcupA bzw. mit beiden transformiert und in den Verdünnungen $1 \cdot 10^{-3}$ auf Selektionsmedium (2.10.2), dem 50 μM BCS und 50 μM Paraquat zugesetzt war, aufgetropft. Als Kontrolle wurden BY4741 $\Delta ctr1$ und der korrespondierende Wildtyp (WT) mit den Leerplasmiden transformiert und mit aufgetropft. Als Wachstumskontrolle wurden alle Stämme auf Medium ohne BCS und ohne Paraquat aufgetropft. Sowohl *cupA* als auch *cupB* und deren Kombination können den $\Delta ctr1$ -Phänotyp bei oxidativem Stress komplementieren.

4.3 Transkriptionelle Regulation der aus *T. versicolor* isolierten Gene

4.3.1 Transkriptionelle Regulation von *tahA* in *T. versicolor*

Wie schon bei der Betrachtung der genomischen Sequenz beschrieben, wurden verschiedene Sequenzen mit Homologie zu regulativen Elementen in der Promotorregion von *tahA* gefunden. Die auffälligsten waren dabei die vier Sequenzen, die stark der Konsensussequenz

von MREs (metal-responsive elements) glichen und die in Hefe von Ace1 erkannt werden. Der Transkriptionsfaktor Ace1 ist in *S. cerevisiae* für die kupferabhängige Aktivierung von z.B. Metallothionein verantwortlich (Thiele [1988]). Um zu überprüfen, ob auch *tahA* kupferabhängig reguliert sein könnte, wurde eine TV1-Kultur in MM-Medium ohne Zugabe von Kupfer vier Tage angezogen und dann für 90 min mit 0 / 2 / 5 / 10 / 100 bzw. 500 μM CuSO_4 induziert. Als Kontrolle wurde eine TV1-Kultur mit 100 μM BCS angezogen, geteilt und eine Hälfte mit 200 μM CuSO_4 induziert. Aus allen Kulturen wurde die Gesamt-RNA isoliert (3.3.1) und ein S1-Nuclease-Schutzexperiment (3.10) mit den ^{32}P markierten Oligonukleotiden S1-*tahA* und S1-*gapDH* (2.12) durchgeführt (Abb. 4-26). Beide Primer sind reverskomplementär zu dem 5'-Bereich der beiden mRNAs von *tahA* bzw. *gapDH*. Der Primer S1-*gapDH* trägt am 3'-Ende einen 10 bp langen, nicht komplementären Bereich, der als interne S1-Verdau-Kontrolle dient.

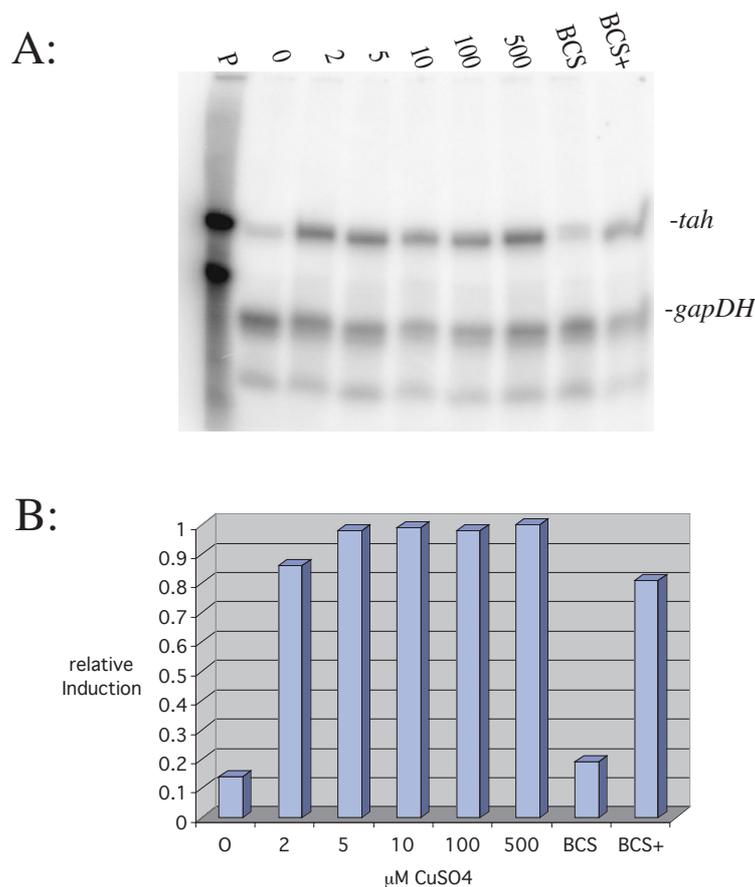


Abb. 4-26: S1 Nuclease-Schutzexperiment mit Gesamt-RNA von TV1 nach Kupferinduktion: A: Das Dikaryon TV1 wurde mit 0 bis 500 μM CuSO_4 induziert. Als Kontrolle wurde einer Kultur 100 μM BCS zugesetzt einer anderen 100 μM BCS und 200 μM CuSO_4 (BCS+). In der ersten Spur (P) wurde als Kontrolle der unverdaute Primermix aufgetragen. **B:** Graphische Auswertung des Gels; das *tahA*-Signal wurde auf das *gapDH*-Signal normiert.

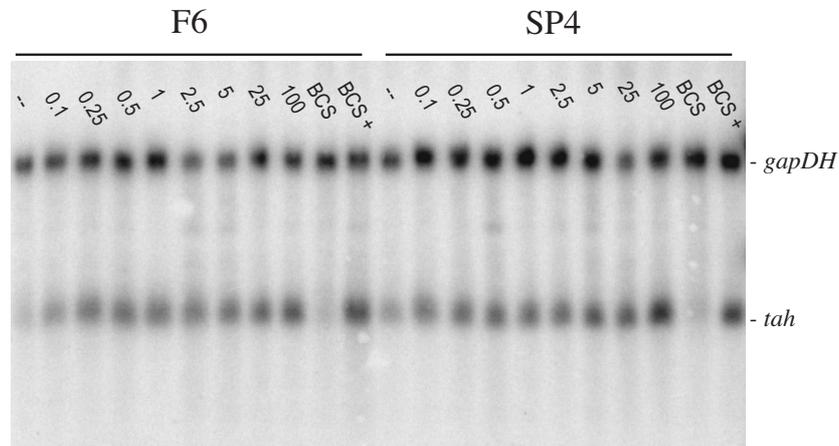
In der graphischen Auswertung des Gels (Abb. 4-26 B) sieht man, dass *tahA* schon ab 2 μM CuSO_4 fast maximal transkribiert wird, und dass in Kulturen ohne Kupfer ebenso wie bei Kulturen mit Kupfermangel durch BCS deutlich weniger *tahA*- mRNA zu detektieren ist. Setzt man der BCS Kultur ausreichend Kupfer zu, erhält man wieder die maximale Transkriptmenge von *tahA*. Der Unterschied zwischen den mit Kupfer induzierten Kulturen und den Kontrollkulturen bewegt sich dabei um den Faktor acht bis zehn.

Dieses Experiment lieferte aber keine Daten darüber, in wie weit das IS-Element im Promotor von Allel *tahA-2* die Transkription beeinflusst, und bei welcher Kupferkonzentration der Schwellenwert für die Induktion von *tahA* liegt. Deshalb wurde eine Northernblot-Analyse (3.9) mit Gesamt-RNA aus den *T. versicolor* Monokaryen F6 und SP4 durchgeführt, wobei SP4 Allel *tahA-1* und F6 Allel *tahA-2* trägt. Die beiden Stämme wurden vier Tage in MM-Medium angezogen und je Stamm 90 min mit 0 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 bzw. 100 μM CuSO_4 induziert. Als Kontrolle wurde je Stamm noch eine Kultur für einen Tag mit 50 μM BCS angezogen, geteilt und die Hälfte für 90 min mit 100 μM CuSO_4 induziert. Dann wurde aus allen Kulturen die RNA isoliert und 5 μg auf einem 1,4 % igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde geblottet und die Membran mit ^{32}P markierten Sonden der *tahA* cDNA und des *gapDH*-Gens als Referenzgen hybridisiert (Abb. 4-27). Deutlich ist zu erkennen, dass die beiden Allele, trotz des IS-Elements in Allel 2, nicht signifikant unterschiedlich transkribiert werden. Die Transkriptmenge von *tahA* ist bereits ab etwa 0,1 μM CuSO_4 leicht erhöht und verstärkt sich mit zunehmender Kupferkonzentration. Die Kontrollkulturen ohne Kupfer bzw. mit BCS zeigen kaum *tahA* Transkripte, wobei der Wert mit 0 μM Kupferzugabe bei SP4 im Vergleich zu den anderen Kupfermangelwerten etwas hoch ausfällt. Dies ist aber experimentell bedingt und wurde bei anderen Kupferinduktions-Experimenten nicht gefunden.

In den BCS-Kulturen sind die beiden *tahA* Allele etwa gleich stark transkribiert. Im Stamm SP4 ist die *tahA* Transkriptmenge ab 25 μM CuSO_4 doppelt so hoch wie der Nullwert. Bei F6 wird dieser Wert schon ab 2,5 μM CuSO_4 überschritten. Dieser Unterschied war aber bei zwei Wiederholungen dieses Experiments nicht so ausgeprägt, so dass es sich um Messfehler oder experimentelle Schwankungen handeln könnte. Der Rückgang der Transkription zwischen 1 und 10 μM CuSO_4 könnte auch durch Schwankungen in der Messung bzw. durch Schwankungen bei der Kulturführung erklärt werden. Bei den mit Kupfer induzierten BCS

Kulturen ist die Transkription von *tahA* in beiden Stämmen fünf bis sieben mal höher als in der BCS Kupfermangelkultur. Somit setzt Kupfermangel die Transkription von *tahA* herab.

A:



B:

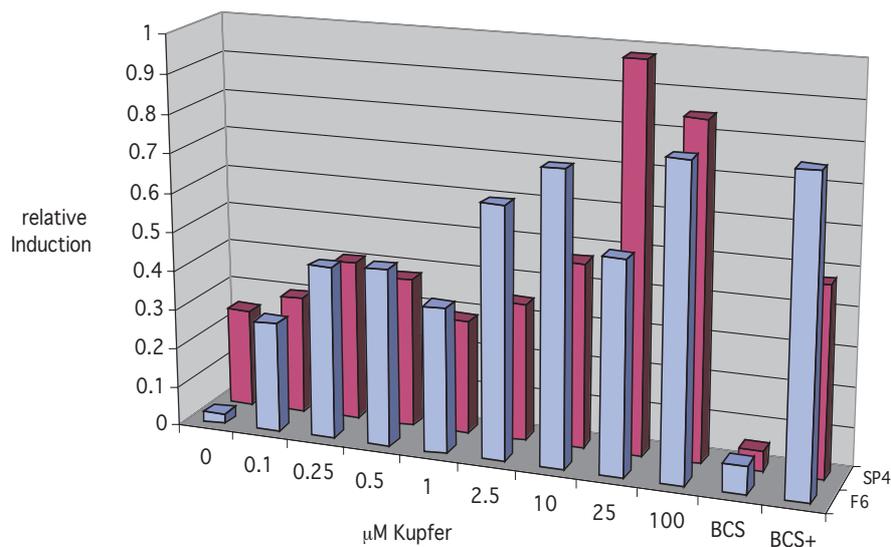


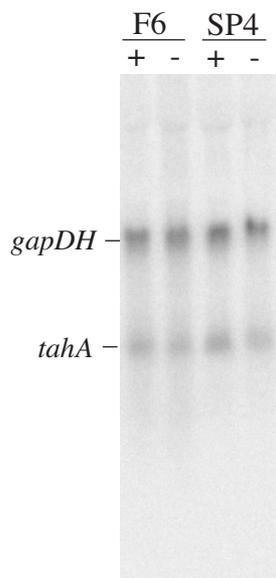
Abb. 4-27: Northernblot-Analyse der Kupferinduktion von *tahA* in den *T. versicolor* Stämmen F6 und SP4:

Die beiden Monokaryen, welche die beiden unterschiedlichen Allele *tahA-1* (Sp4) und *tahA-2* (F6) tragen, wurden mit 0 (--) bis 100 μM CuSO₄ für 1,5 h induziert. Als Kontrolle wurden die Stämme mit 50 μM BCS (BCS) bzw. 50 μM BCS plus 100 μM CuSO₄ (BCS+) angezogen. Der Northernblot aus den Kulturen wurde mit einer *tahA* und einer *gapDH* Sonde hybridisiert A: Das Autoradiogramm des Northernblots zeigt, dass *tahA* schon ab sehr geringen Kupferkonzentrationen transkribiert wird. Der deutlichste Unterschied ist bei den „BCS“-Kulturen zu erkennen. B: Graphische Auswertung des Gels: Das *tahA* Signal wurde mit dem Programm Image Quant auf das *gapDH* Signal normiert.

Für *ATX1* aus *S. cerevisiae* wurde gezeigt, dass es unter Eisenlimitation induziert wird (Lin et al. [1997]). Dies hängt damit zusammen, dass die Eisenoxidase Fet3 unter diesen

Bedingungen vermehrt gebildet wird, und somit mehr Kupfer im Golgi-Kompartement benötigt wird. Da TahA das gleiche Zellorganell mit Kupfer versorgt wie Atx1, wurde untersucht, ob auch *tahA* durch Eisenmangel induziert wird. Dazu wurden die Stämme SP4 und F6 für vier Tage in MM-Medium angezogen und dann je 2,5 mM des Eisenchelators Ferrozin zugesetzt. Nach 90 min wurde das Mycel geerntet, die RNA isoliert und ein Northernblot angefertigt. Dieser zeigte, dass *tahA* unter Eisenmangel nicht induziert wird (Abb. 4-28).

A:



B:

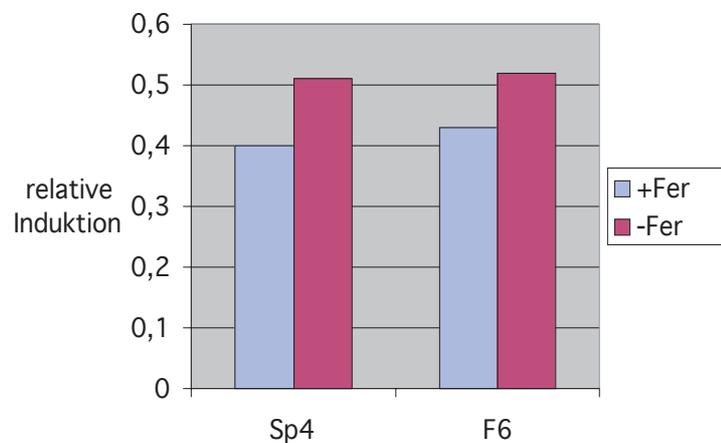


Abb. 4-28: Northernblot-Analyse der Eisenmangelinduktion von *tahA* in den Stämmen F6 und SP4: Die beiden Monokaryen, welche die beiden unterschiedlichen Allele *tahA-1* (Sp4) und *tahA-2* (F6) tragen, wurden mit 2,5 mM Ferrozin (Fer) induziert. Als Kontrolle wurden die Stämme ohne Ferrozin angezogen. Der Northernblot aus den Kulturen wurde mit einer *tahA* und einer *gapDH* Sonde hybridisiert A: Das Autoradiogramm des Northernblots zeigt, dass *tahA* nicht durch Eisenmangel induziert wird B: Graphische Auswertung des Gels: Das *tahA* Signal wurde mit dem Programm Image Quant auf das *gapDH* Signal normiert.

Das gleiche Experiment wurde auch noch mit 40 µg/ml DABA und 50 µM Paraquat durchgeführt. Beide Bedingungen führten nicht zu einer Erhöhung der Transkription von *tahA* (Daten nicht gezeigt).

Es konnte in obigen Experimenten somit gezeigt werden, dass *tahA* im Vergleich zu *ATX1* grundsätzlich anders reguliert wird. *ATX1* wird bei Eisenmangel und unter oxidativem Stress induziert, während die Transkription von *tahA* davon unbeeinflusst bleibt. Dagegen wird *tahA* durch Kupferzugabe verstärkt transkribiert und bei Kupfermangel reprimiert, während *ATX1* nicht durch Kupfer induziert wird.

4.3.2 Transkriptionelle Regulation von *ctaA*

Für *ctaA* konnte bei Northernblot-Untersuchungen weder bei Kupferinduktion noch bei Aminosäuremangel ein Transkript nachgewiesen werden. Dies traf auch für die uninduzierten Kontrollen zu (Daten nicht gezeigt).

4.3.3 Transkriptionelle Regulation von *cupA* und *cupB*

Da *cupA* und *cupB* für putative Kupferaufnahmeporinen kodieren, wurde die Regulation dieser Gene in Bezug auf die Kupfermenge im Medium untersucht. Dazu wurde SP4 vier Tage in MM-Medium ohne Kupfer angezogen und dann für 90 min mit 0 / 0,1 / 0,25 / 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 bzw. 100 μM CuSO_4 induziert. Als Kontrolle wurde eine Kultur für einen Tag mit 50 μM BCS angezogen, geteilt, und die Hälfte für 90 min mit 100 μM CuSO_4 induziert.

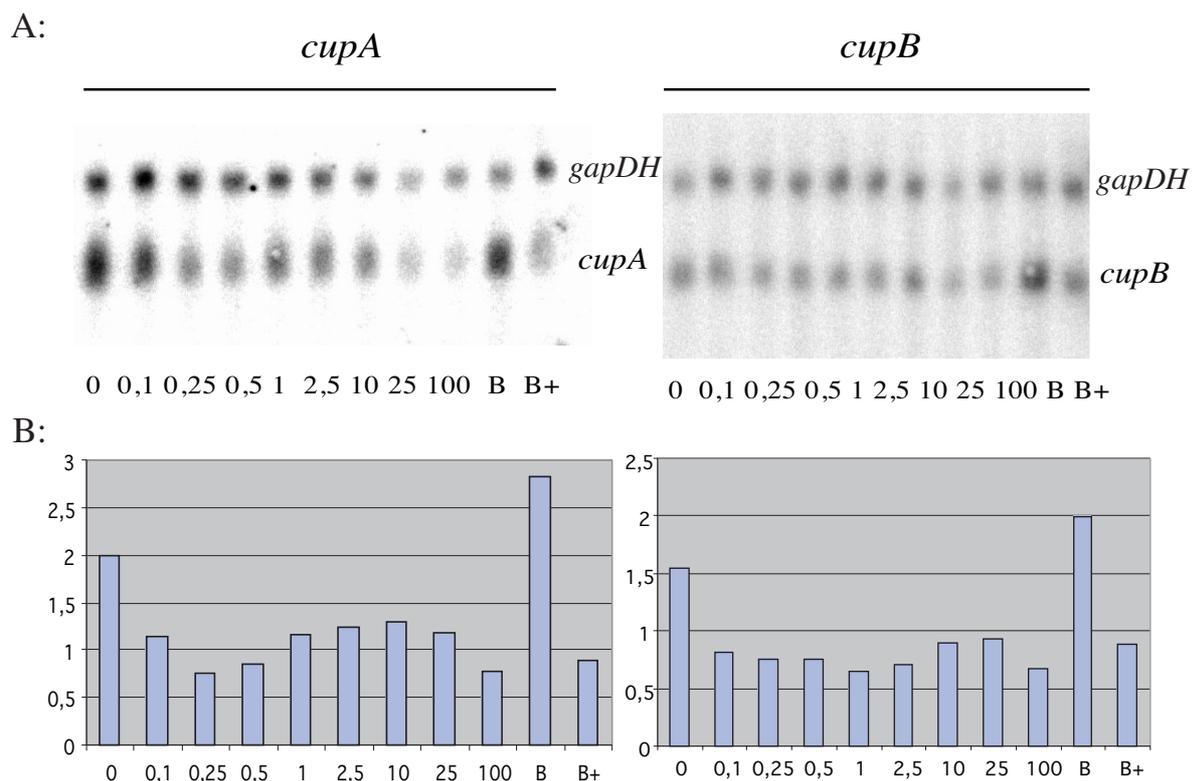


Abb. 4-29: Northernblot-Analyse der von *cupA* und *cupB* im *T. versicolor* Stamm SP4. Dazu wurde SP4 mit 0 bis 100 μM CuSO_4 für 1,5 h induziert. Als Kontrolle wurde der Stamm mit 50 μM BCS (B) bzw. 50 μM BCS plus 100 μM CuSO_4 (B+) angezogen. Der Northernblot aus den Kulturen wurde mit einer *cupA* bzw. *cupB* und einer *gapDH* Sonde hybridisiert A: Die Autoradiogramme der Northernblots zeigen, dass beide Gene gleich reguliert sind und dass sie bei Kupfermangel induziert werden. In den BCS-Kulturen konnte die höchste *cupA* und *cupB* Induktion gemessen werden. B: Graphische Auswertung der Gele. Das *cupA* bzw. *cupB* Signal wurde auf das *gapDH* Signal normalisiert.

In Abb. 4-29 ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Gene *cupA* und *cupB* gleich reguliert sind. Besonders am Beispiel der BCS-Kulturen wird deutlich, dass beide Gene unter Kupfermangel verstärkt exprimiert werden. Bei ausreichender Kupferversorgung werden die Gene reprimiert.

4.4 Koexpression von *tahA* und *ctaA* in *S. cerevisiae* und *T. versicolor*

4.4.1 Koexpression von *lacIII*, *tahA* und *ctaA* in *S. cerevisiae*

Um den Effekt der deregulierten Expression der beiden Gene *tahA* und *ctaA* auf die Laccase-Expression zu untersuchen, wurde das *Laccase-III*-Gen (*lacIII*) aus *T. versicolor* zusammen mit *tahA* bzw. *ctaA* oder mit beiden gleichzeitig im *S. cerevisiae* Stamm CM3260 exprimiert. Dazu wurde der Stamm CM3260, der bereits das Konstrukt pLacP2 trug (siehe 4.1.1), jeweils zusätzlich mit pAH + pAT, pAH + pAT*tahA*, pAH*ctaA* + pAT und pAH*ctaA* + pAT*tahA* transformiert. Die Plasmidkarten der Konstrukte finden sich im Anhang (Abb. 7-5 - Abb. 7-7). Das *Laccase-III*-Gen befindet sich unter der Kontrolle des *PGK*-Promotors, *ctaA* und *tahA* hingegen unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors. Die vier Stämme wurden in je 200 μ l YNB-Selektionsmedium (His^- , Trp^- , Ura^-), dem zusätzlich 0 / 10 / 100 / 200 / 400 / 600 / 800 bzw. 1 000 μ M CuSO_4 zugesetzt worden war, in Mikrotiterplatten über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Thermoschüttler (Eppendorf) angezogen. Aus diesen Kulturen wurden dann 90 μ l entnommen, mit 10 μ l ABTS versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Laccase-Aktivität durch Messung der OD_{420} bestimmt (Abb. 4-30).

Wie die graphische Auswertung des Experiments zeigt, hat sowohl die Überexpression von *tahA* als auch die Überexpression von *ctaA* einen positiven Einfluss auf die heterologe Laccase-Expression in Hefe. Bei der Überexpression von *tahA* wurde der größte Effekt zwischen 200 und 400 μ M CuSO_4 detektiert, wo bis zu drei mal so viel Laccase produziert wurde wie im Vergleichsstamm. Die Überexpression von *ctaA* zeigte, mit einer bis zu 15-fachen Steigerung der Laccase-Expression im Vergleich zum Kontrollstamm, den größten Effekt bei 10 μ M CuSO_4 . Die Koexpression von *ctaA* und *tahA* zeigte vor allem bei sehr niedrigen Kupferkonzentrationen ($\leq 10 \mu\text{M}$) einen synergistischen Effekt. So konnte hier eine bis zu 20 mal höhere Laccase-Expression detektiert werden als im Kontrollstamm.

Eine Überexpression der *T. versicolor* Gene *tahA* und *ctaA* konnte die heterologe Expression von Laccase III in Hefe deutlich (20-fach) steigern.

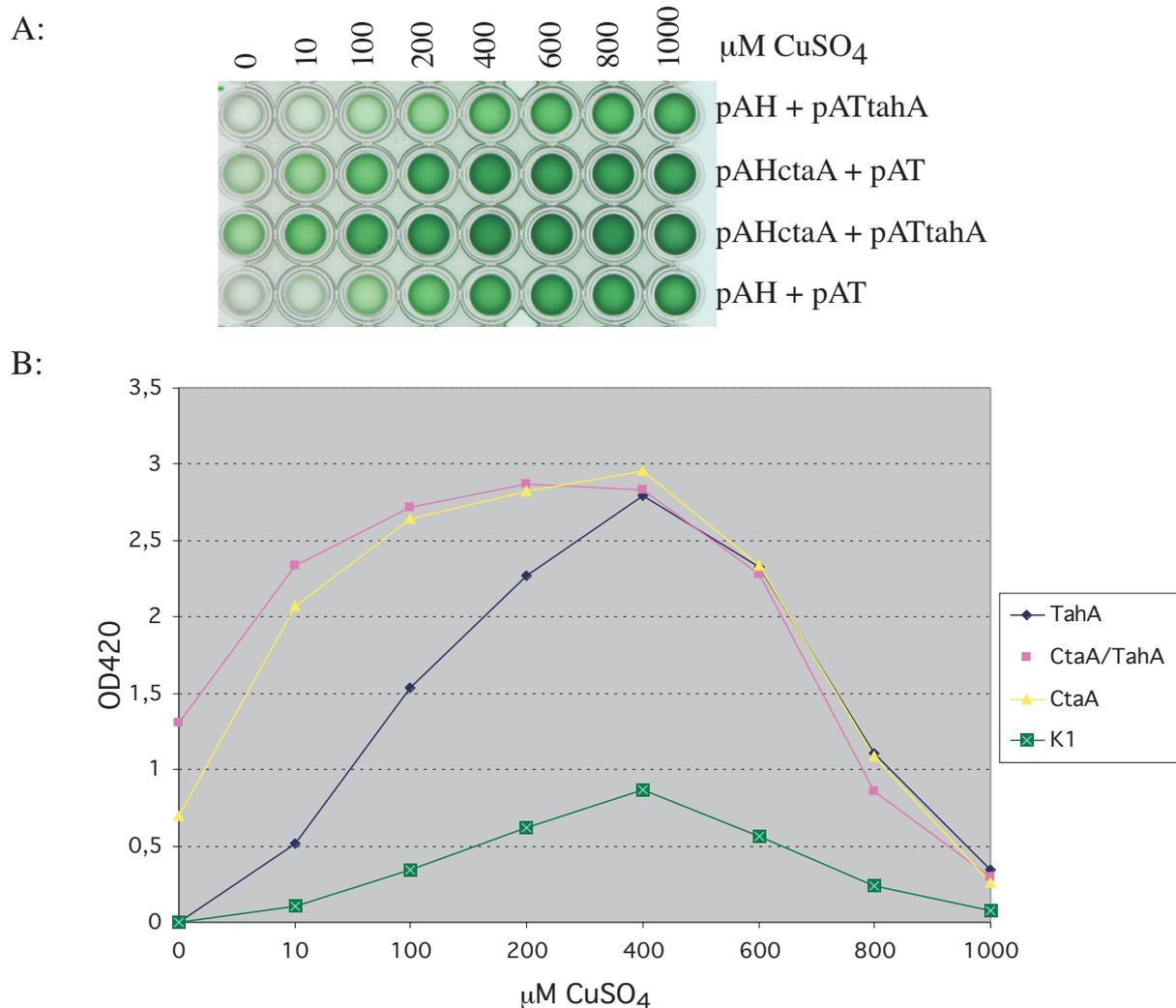


Abb. 4-30: Heterologe Koexpression von *T. versicolor lacIII*, *tahA* und *ctaA* in *S. cerevisiae*: Der Laccase exprimierende *S. cerevisiae* Stamm CM3260 + pLacP2 wurde mit den Konstrukten pAH + pAT, pAH + pATtahA, pAHctaA + pAT bzw. pAHctaA + pATtahA transformiert und in Medien mit 0 bis 1 000 μM Kupfer angezogen. Die Laccase-Aktivität wurde dann mit einem ABTS-Test als OD_{420} bestimmt. **A:** ABTS-Test in einer Mikrotiterplatte. Die Koexpression von *ctaA* und *tahA* zeigt die stärkste Grünfärbung (Laccase-Aktivität), gefolgt von den Einzelexpressionen von *ctaA* und *tahA* **B:** Graphische Auswertung einer Versuchsreihe aus drei Parallelexperimenten. Vor allem bei niedrigen Kupferkonzentrationen ist der synergistische Effekt der Koexpression von *tahA* und *ctaA* auf die Laccase-Aktivität gut zu erkennen. Bei 10 μM CuSO_4 erfolgte eine Steigerung der Laccase-Aktivität auf das bis zu 20-fache. Die Einzelexpressionen von *ctaA* und *tahA* zeigen, dass *ctaA* den größeren Effekt auf die Steigerung der Laccase-Expression hat.

4.4.2 Koexpression von *tahA* und *ctaA* in *T. versicolor*

4.4.2.1 Konstruktion von *tahA* und *ctaA* Expressionsplasmiden

Um den Einfluss der Kupferhomeostasefaktoren *tahA* und *ctaA* auf die Laccase-Expression in *T. versicolor* zu testen, mussten geeignete Überexpressionskonstrukte hergestellt werden. Dazu wurden die beiden genomischen Strukturgene *tahA-1* und *ctaA-1* ab dem Start-ATG jeweils hinter einen *T. versicolor gapDH*-Promotor kloniert, der zu einer erhöhten konstitutiven Transkription der Gene in *T. versicolor* führen sollte. Da beide Gene kotransformiert werden sollten, wurde nur der kleinere *tahA* Expressionsvektor mit einem *PyrG* Selektionsmarker aus *Schizophyllum commune* versehen. Für die Konstruktion der Vektoren wurde zuerst aus dem Vektor pUC19 eine störende, singuläre BspLU11 I Restriktionsschnittstelle entfernt, indem das Plasmid mit diesem Enzym geschnitten, die überhängenden Enden mit Klenow-Fragment aufgefüllt, und der Vektor dann wieder ligiert wurde. Dann wurde ein ca. 1 kb großes Sph I Fragment des *gapDH*-Promotors in die Sph I Schnittstelle der MCS dieses Vektors kloniert. Dabei entstanden zwei Vektoren (pUC-Pgap⁻ und pUC-Pgap⁺), die den Promotor in unterschiedlichen Orientierungen trugen (Anhang Abb. 7-12).

Für die Herstellung des *tahA*-Expressionsplasmids wurde der *gapDH*-Promotor aus pUC-Pgap⁻ mit EcoR I und BspLU11 I herausgeschnitten und vor das *tahA*-Gen in den mit EcoR I und Nco I restringierten Vektor pZ-gTAH-N inseriert, wodurch der Vektor pZ-gTAH-Pgap entstand (4.2.2 und Anhang Abb. 7-14). Anschließend wurde der *gapDH*-Promotor zusammen mit dem *tahA*-Gen mit EcoR I und Not I herausgespalten, die Enden aufgefüllt und dieses Fragment in das mit Sma I geschnittene Plasmid gPura kloniert (gPuragapTAH). Die gesamte Klonierungsstrategie ist im Anhang Abb. 7-14 graphisch dargestellt.

Das *ctaA*-Expressionsplasmid wurde folgendermaßen kloniert: Um vor dem Start-ATG eine Nco I Schnittstelle einzuführen, wurde auf dem Plasmid pCR2.1gcta eine PCR mit den Primern gcta-ATG und gCta-rv (2.12) mit Hilfe des „High Fidelity PCR System“ (Roche) durchgeführt. Der Primer gcta-ATG wurde so gewählt, dass durch eine Fehlpaarung (C statt T) an der zweiten Nukleotidposition bei der PCR eine Nco I Schnittstelle entstand. Das PCR-Fragment wurde dann in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert und das neu entstandene Plasmid als pATGcta bezeichnet. Aus diesem Vektor wurde der 1 236 bp große 5'-Bereich des *ctaA-1* Gens mit Nco I herausgeschnitten und in die Nco I kompatible BspLU11 I Schnittstelle von pUC-Pgap⁺ inseriert (pgapCTA-A). Der 3 421 bp große 3'-Bereich von *ctaA-1* wurde mit

Spe I und Nae I ebenfalls aus pATGeta herausgetrennt und in den mit Spe I und Sma I restringierten Vektor pUC-gapCTA-A ligiert. Somit war das *ctaA*-Expressionsplasmid pUC-gapCTA hergestellt. Auch diese Klonierungsstrategie ist im Anhang Abb. 7-13 graphisch dargestellt.

4.4.2.2 Kotransformation von *T. versicolor* mit pUC-gapCTA und gPuragapTAH

Die beiden Plasmide pUC-gapCTA und gPuragapTAH (Abb. 4-31) wurden in Verhältnis 1:1 gemischt, in *T. versicolor* F6-79 B11 (auch nur als F6 bezeichnet) transformiert (siehe 3.13) und dann die Transformationsansätze auf MMS-Platten ausplattiert. Nach ein bis zwei Wochen Inkubation bei 28 °C wurden die entstandenen Pilzkolonien auf MM-Platten umgeimpft und diese bis zum völligen Zuwachsen (ca. sieben Tage) bei 28 °C gehalten. Aus der Randregion der Platten wurde dann nochmals Mycel auf eine Malzagarplatte umgeimpft und diese wieder bis zum Zuwachsen bebrütet.

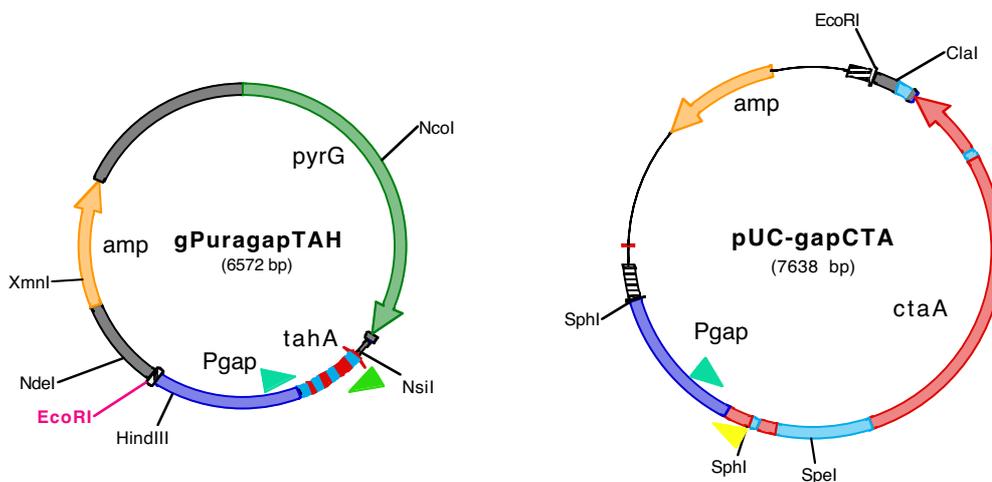


Abb. 4-31: Darstellung der Expressionsvektoren pUC-gapCTA und gPuragapTAH für *T. versicolor*. In beiden Vektoren steht das genomische Strukturgen (*tahA* bzw. *ctaA*) unter der Kontrolle des *T. versicolor gapDH*-Promotors (dunkelblau). Die Introns in den Strukturgenen (rot) sind hellblau dargestellt. Da beide Vektoren kotransformiert wurden, ist das Markergenen *pyrG* (grün) nur im Vektor gPuragapTAH vorhanden. Die türkisen Pfeile repräsentieren den Primer Pgap, der hellgrüne Pfeil steht für den Primer tahE und der gelbe für *ctaA*. Mit diesen Primern konnten die Vektoren in *T. versicolor* nachgewiesen werden.

Von den Transformanten wurde etwas Mycel abgekratzt, in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und in 50 µl TE aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in einer PCR-Maschine

durch das folgende Programm aufgeschlossen: 5 min bei 65 °C → 2 min bei 96 °C → 4 min bei 65 °C → 1 min bei 96 °C → 1 min bei 65 °C → 0,5 min bei 96 °C → 20 °C. Danach wurden die Zellen mit einer Impföse mechanisch gequetscht und dann abzentrifugiert. Je 1 µl des Überstandes wurde mit den Primerkombinationen Pgap und tahE bzw. Pgap und ctaA in einer PCR mit Taq-Polymerase eingesetzt. Der Primer Pgap hybridisiert im *gapDH*-Promotor, tahE im *tahA* Gen und ctaA im *ctaA*-Gen. Die Primer-Kombinationen sind daher spezifisch für die Expressionskonstrukte (siehe auch Abb. 4-31). Aus der Transformation wurden 23 potentielle Kotransformanden erhalten und durch PCR getestet (Abb. 4-32). Von diesen Transformanden hatten 13 beide Plasmide aufgenommen und zeigten deshalb je ein spezifisches PCR Produkt für beide Primer-Kombinationen. Dies entspricht einer Kotransformationsrate von mehr als 50 %. Das Produkt aus der PCR mit Pgap und tahE ist 690 bp und das aus der PCR mit Pgap und ctaA ist 460 bp groß. Als Positivkontrolle für die PCR wurde mit den Primern Pgap und gapA ein 260 bp großes Fragment aus dem chromosomalen *T. versicolor gapDH*-Gen amplifiziert.

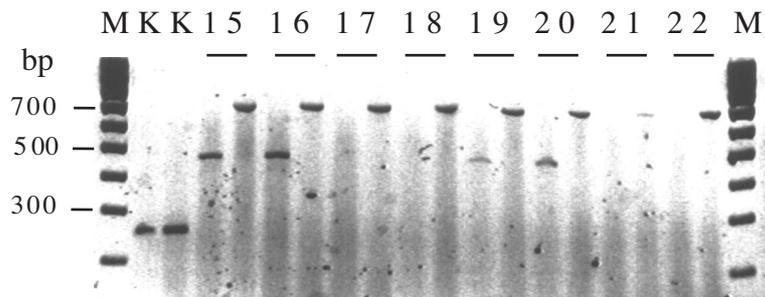


Abb. 4-32: 2 % iges Agarosegel der PCR-Analyse von potentiellen *T. versicolor* pUC-gapCTA und gPuragapTAH Kotransformanden. Die Klone 15 bis 22 sind für das Konstrukt gPuragapTAH positiv, da bei der PCR mit den Primern Pgap und tahE jeweils ein 690 bp Fragment entstand. Die Klone 15, 16, 19 und 20 sind echte Kotransformanden, da bei diesen auch die für pUC-gapCTA spezifische Primerkombination ein Produkt (460 bp) ergab. Als Positivkontrolle für die PCR wurde mit den Primern Pgap und gapA ein 260 bp großes Fragment aus dem chromosomalen *gapDH*-Gen von Klon 15 und 16 amplifiziert (K).

Um eine genauere Vorstellung von der Anzahl der in das Genom integrierten Expressionskonstrukte zu bekommen, wurde aus den Kotransformanden Ko7, Ko15, Ko19 und aus dem Rezipientenstamm F6-79 B11 die genomische DNA isoliert und damit eine Southernblot-Analyse durchgeführt. Die DNAs wurden jeweils mit BamH I + Nsi I, Kpn I, Sac I und Xho I geschnitten und der Blot mit einer *tahA* Sonde (Nco I / Nsi I Fragment aus pZg TAH-N) bzw. einer *ctaA* Sonde (Cla I / Nde I Fragment aus pgATGcta) (siehe auch

4.4.2.1, Anhang Abb. 7-13 und Abb. 7-14) hybridisiert. Bei der Hybridisierung mit *tahA* wurde in dem Rezipientenstamm F6-79 B11 nur eine kreuzhybridisierende Bande pro Verdau gefunden, während bei den Kotransformanden zusätzliche Banden detektiert wurden, die auf das integrierte *tahA*-Expressionskonstrukt zurückzuführen sind. Die im BamH I + Nsi I Verdau auftretende 1,5 kb Bande entspricht der kompletten Expressionskassette mit *gapDH*-Promotor und *tahA*-Gen, da BamH I im Expressionkonstrukt vor und Nsi I hinter dieser Kassette schneidet (Abb. 4-33).

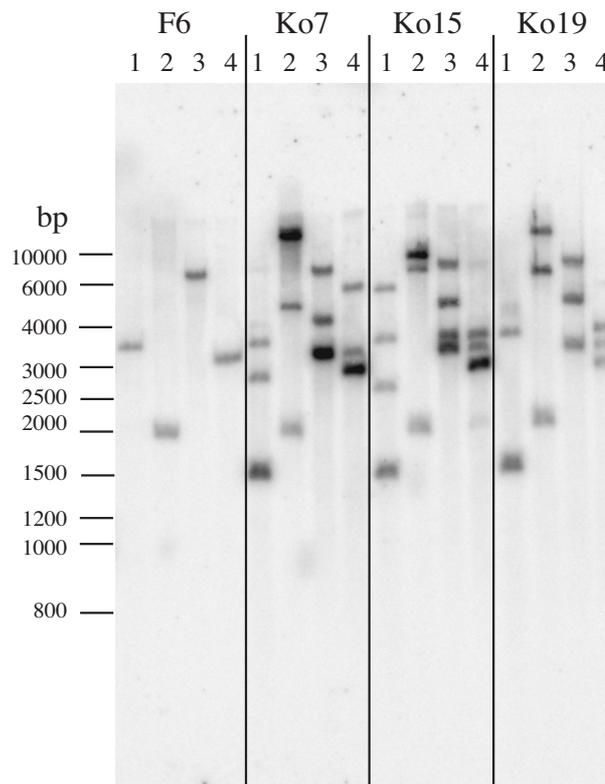


Abb. 4-33: Southernblot-Analyse der Kotransformanden Ko7 Ko15 und Ko19 im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11. Die DNAs wurden jeweils mit BamH I + Nsi I (1), Kpn I (2), Sac I (3) und Xho I (4) geschnitten. Der Blot wurde mit einem ^{32}P markierten *tahA*-Fragment hybridisiert. Bei den Kotransformanden treten zusätzlich zu den genomischen Banden, wie sie bei F6 zu finden sind, noch zusätzliche Banden auf. Bei Ko7 und Ko15 sind aufgrund der Stärke der neuen Banden mindestens zwei Kopien des Konstruktes inseriert.

Aus der Stärke dieser 1,5 kb Banden konnte im Vergleich mit der Wildtypbande (3,7 kb) die Anzahl der integrierten *tahA*-Konstrukte mit dem Programm Image Quant abgeschätzt werden. So sind bei Ko7 mindestens drei und in Ko15 und Ko19 mindestens zwei Expressionskassetten intakt ins Genom integriert. Bei der Hybridisierung mit dem *ctaA*-Fragment (Abb. 4-34) konnte nur in Ko7 und Ko 19 die Integration des

Expressionskonstruktes in das Genom nachgewiesen werden. Ko15 ist somit keine echte Kotransformante und das Signal bei der PCR-Analyse (Abb. 4-32) rührt wahrscheinlich von zwar aufgenommenem aber nicht integriertem Vektor in sogenannten „abortiven“ Transformanden her.

In dem 6,7 kb großen *ctaA*-Expressionskonstrukt schneidet Kpn I einmal im Vektorrückgrad.

In Ko7 ist bei dem Kpn I Verdau eine deutliche Bande mit einer Größe von 6,7 kb zu erkennen, die durch Tandemintegration des pUC-gapCTA Vektors entstanden ist. Die Wildtypbande läuft bei 4,8 kb. Der densitometrische Vergleich der Signalstärken (Image Quant) der 6,7 kb Bande mit der 4,8 kb Bande zeigt, dass das *ctaA*-Konstrukt mindestens fünf mal hintereinander integriert ist. Die Expressionkassetten der integrierten Vektoren sind dabei intakt. In Ko19 ist die Bande im Kpn I Verdau nur 5,3 kb groß und somit ist fraglich ob die Expressionkassette intakt ist oder nicht.

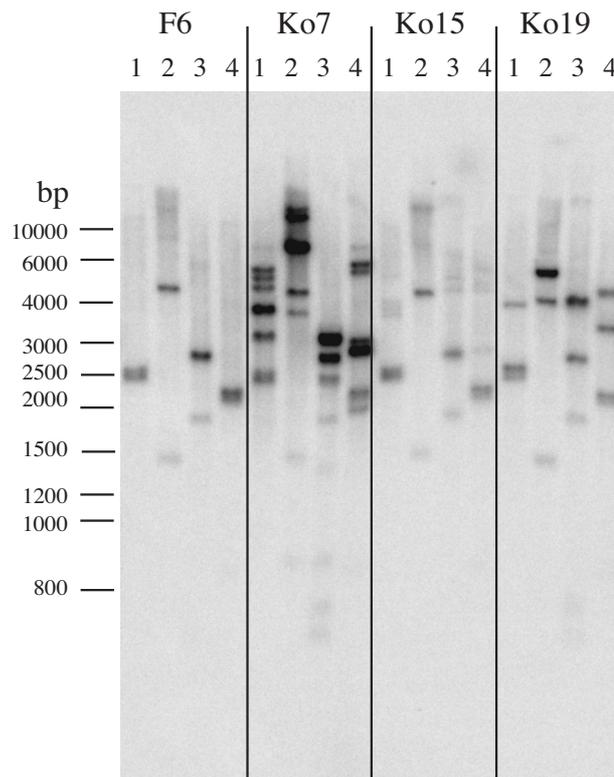


Abb. 4-34: Southernblot-Analyse der Kotransformanden Ko7, Ko15 und Ko19 im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11. Die DNAs wurden mit BamH I + Nsi I (1), Kpn I (2), Sac I (3) und Xho I (4) geschnitten. Der Blot wurde mit einem ^{32}P markierten *ctaA*-Fragment hybridisiert. Bei den Kotransformanden Ko7 und Ko19 treten zusätzlich zu den genomischen Banden, wie sie bei F6 zu finden sind, noch zusätzliche Banden auf. Bei Ko7 sind aufgrund der Stärke der neuen Banden mindestens fünf Kopien des Konstruktes inseriert. Ko15 ist keine echte Kotransformante, da kein integriertes *ctaA*-Expressionskonstrukt detektiert werden konnte.

Die Southernblot-Analysen zeigen zwar, dass zusätzliche Kopien von *ctaA* und *tahA* ins Genom der Kotransformanten integriert wurden, sie zeigen allerdings nicht, ob die Gene auch vermehrt transkribiert werden. Deshalb wurde mit den Kotransformanten Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20 eine Northernblot-Analyse durchgeführt bei der deren Expression von *tahA* und *ctaA* mit dem Rezipientenstamm F6-79 B11 verglichen wurden. Alle Stämme wurden dazu parallel in vier Tage bei 25 °C Malzmedium angezogen. In Abb. 4-35 ist die Transkriptionsanalyse für *tahA* dargestellt. Man kann vor allem in der graphischen Darstellung, in der die Transkription von *tahA* gegen das interne Kontrollgen *gapDH* normiert wurde, deutlich erkennen, dass die Transkription von *tahA* in den Kotransformanten im Vergleich zu F6 um den Faktor 2,5 bis 10 erhöht ist. Hierbei schneidet der Stamm Ko7 (10x) am besten ab, gefolgt von Ko19 (6x), Ko20 (3x) und Ko15 (2,5x).

Bei der Transkriptionsanalyse von *ctaA* zeigt die graphische Darstellung (Abb. 4-36), dass nur in den Stämmen Ko7 und Ko20 eine signifikante Erhöhung der *ctaA* Transkription auftrat, die bei Ko7 etwa 9 mal und bei Ko20 etwa 6 mal größer war als die von F6-79 B11. Die Transkription von *ctaA* ist allerdings sehr gering und kaum auf dem Northernblot zu erkennen. Dies trifft besonders bei F6-79 B11 zu.

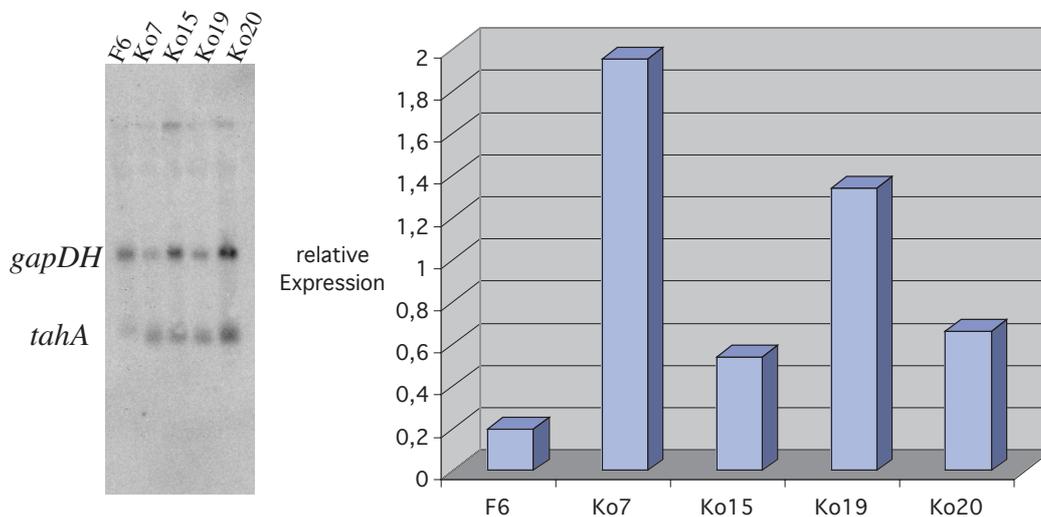


Abb. 4-35: Transkriptionsanalyse von *tahA* in den Kotransformanten Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20 im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11 (F6). In der graphischen Darstellung, in der die Transkription von *tahA* gegen das Kontrollgen *gapDH* normiert wurde, ist deutlich zu erkennen, dass die Transkription von *tahA* in den Kotransformanten im Vergleich zu F6 um den Faktor 2,5 bis 10 erhöht ist. Auch der Northernblot zeigt einen deutlichen Unterschied in der Intensität der *tahA*-Bande.

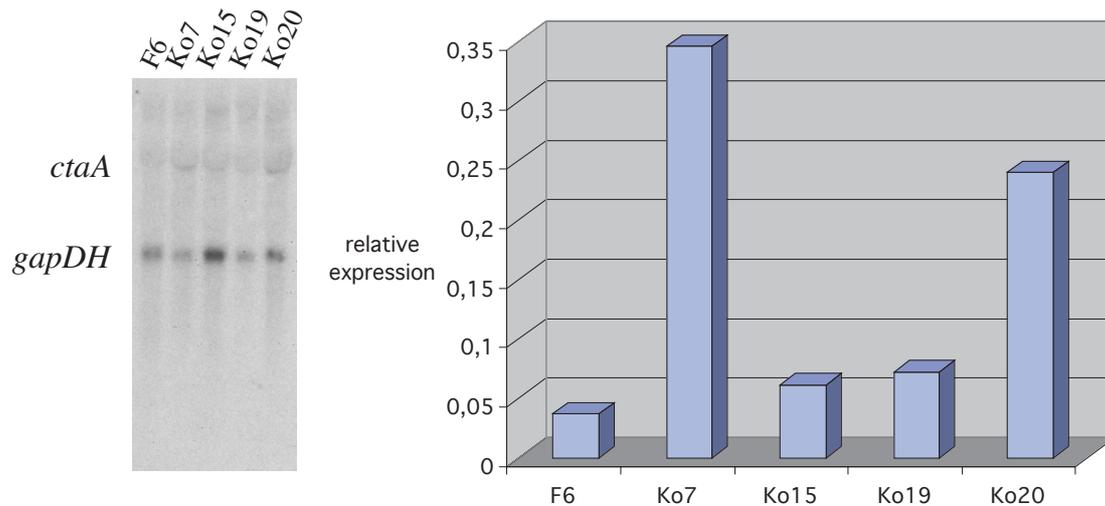


Abb. 4-36 Transkriptionsanalyse von *ctaA* in den Kotransformanten Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20 im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11 (F6). Die graphische Darstellung, in der die Transkription von *ctaA* gegen das Kontrollgen *gapDH* normiert wurde, zeigt, dass nur in den Stämmen Ko7 und Ko20 eine signifikante Erhöhung der *ctaA* Transkription zu detektieren war, die bei Ko7 etwa 9 mal und bei Ko20 etwa 6 mal größer war als die von F6. Die *ctaA*-Bande ist auf den Northernblot kaum zu detektieren.

4.4.2.3 Laccase-Expression in den *T. versicolor* Kotransformanten

Von den Kotransformanten wurden die Stämme Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20 ausgewählt und parallel mit dem Wildtypstamm F6-79 B11 für die Schüttelkolbenanzucht eingesetzt. Dazu wurden aus voll bewachsenen Malzagarplatten 2 cm² große Mycelstücke ausgestochen, in 50 ml Malzmedium überführt und mit dem Ultra Turrax für 1 min bei 5 000 Upm zerkleinert. Danach wurden diese Kulturen in einem 250 ml Erlenmeyerkolben sechs Tage bei 24 °C unter Schütteln bei 110 Upm inkubiert. Am sechsten Tag wurden die Kulturen erneut mit dem Ultra Turrax für 1 min bei 5 000 Upm zerkleinert. Mit jeweils der Hälfte der so behandelten Kulturen wurden 200 ml Laccase-Expressionsmedium (Consortium für elektrochemische Industrie) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft, wobei dem Medium in einer Testreihe 600 µM CuSO₄ in der zweiten Testreihe kein zusätzliches Kupfer zugesetzt wurde. Diese Hauptkulturen wurden ebenfalls bei 24 °C unter Schütteln bei 110 Upm inkubiert. Am zweiten Tag wurde die Laccase-Expression durch Zugabe von jeweils 1,5 mM 2,5-Xylidin induziert. Ab dem dritten Tag wurde dann über einen Zeitraum von neun Tagen die Laccase-Produktion durch einen ABTS-Test bestimmt. Für jede Bedingung wurden zwei parallele Kulturen in angesetzt und die gemessenen Aktivitäten der jeweiligen Parallelkulturen gemittelt. Die graphische Auswertung der Laccase-Aktivitäten aus den kupferhaltigen Parallelreihen (Abb.

4-37) zeigt, dass der Stamm Ko7 am vierten Tag um den Faktor drei bis vier mal mehr Laccase produziert als der Kontrollstamm F6-79 B11. Dies relativiert sich jedoch am Ende der Anzucht. Zu diesem Zeitpunkt haben alle Kulturen die stationäre Wachstumsphase erreicht und die Laccase-Aktivität im Überstand ist bei allen etwa gleich hoch. Die Stämme Ko15 und Ko19 zeigen keine Verbesserung der Laccase-Expression. Der Stamm Ko20 ist nicht so gut wie der Kontrollstamm F6-79 B11. Er hatte aber in den ersten vier Tagen eine Art Lag-Phase bei der Laccase-Expression. Man sollte ihn jedoch, aufgrund der Ergebnisse bei der Northernblot-Analyse, noch mal testen.

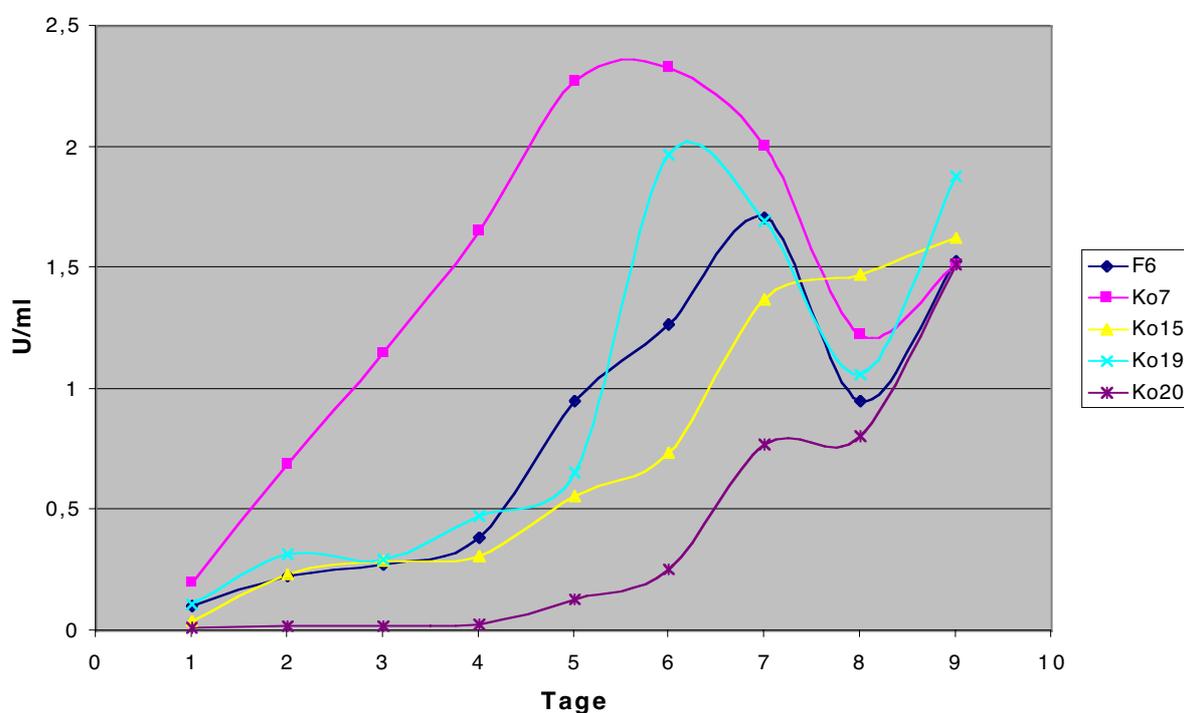


Abb. 4-37: Laccase-Expressions-Studie der mit pUC-gapCTA und gPuragapTAH kotransformierten Stämme Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20, im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11, mit 600 μM CuSO_4 im Medium. Alle Kurven sind Mittelwerte aus zwei Parallelanzuchten. Besonders zu Beginn der Fermentation ist der Stamm Ko7 deutlich besser als alle anderen. Am vierten Tag ist die Laccase-Expression ca. drei mal höher als die des Vergleichsstammes. Ko15 und 19 lassen kaum einen Unterschied zum Wildtyp F6-79 B11 erkennen. Ko20 zeigt die geringste Aktivität.

Bei der Versuchsreihe ohne zusätzliches Kupfer (Abb. 4-38) steigt bei allen Kulturen die Aktivität anfangs leicht an, fällt dann wieder ab, und pendelt sich ab dem fünften Tag bei einem Mittelwert zwischen Maximum und Minimum ein. Ein signifikanter Anstieg der Laccase-Aktivität konnte in keiner dieser Kulturen gemessen werden. Bei allen Kotransformanden sind die gemessenen Aktivitäten höher als bei dem Wildtyp-Stamm F6. Bei

dem Stamm Ko7 werden die stärksten Aktivitäten gemessen. Der Unterschied zwischen den Kulturen bewegt sich jedoch insgesamt in einem sehr geringen Bereich. Die Laccase-Produktion ist somit in diesen Kulturen kupferlimitiert.

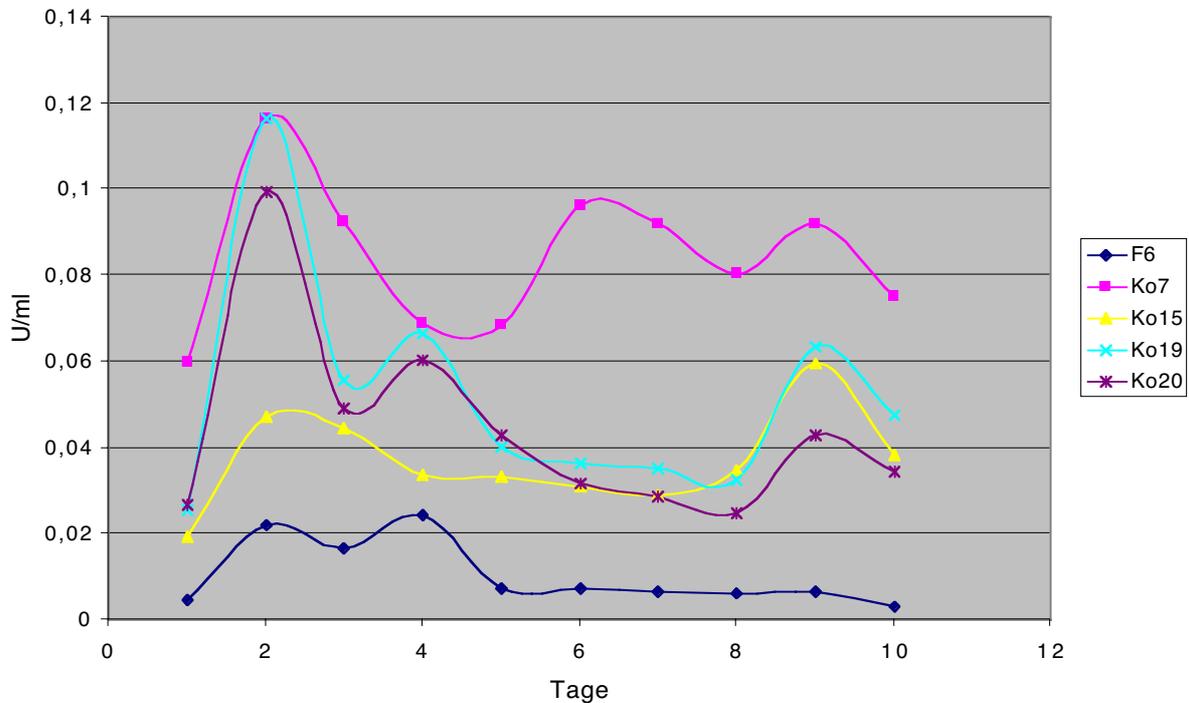


Abb. 4-38: Laccase-Expressions-Studie der mit pUC-gapCTA und gPura-gapTAH kotransformierten Stämme Ko7, Ko15, Ko19 und Ko20, im Vergleich zum Rezipientenstamm F6-79 B11, ohne zusätzliches CuSO₄ im Medium: Es kann bei allen Anzuchten kein signifikanter Anstieg der Laccase-Aktivität gemessen werden. Die Werte der Kotransformanden sind höher als die des Kontrollstammes F6.

Um den Stamm Ko7 besser zu charakterisieren, wurde seine Laccase-Expression mit der des Wildtyp-Stammes F6-79 B11 (F6) bei verschiedenen Kupferkonzentrationen verglichen. Dazu wurden die Zellen, wie oben beschrieben, als Vorkultur angezogen und zerkleinert. Jeweils 200 ml Expressionsmedium, dem zusätzlich 0 / 100 / 500 / 1 000 / 2 000 bzw. 3 000 μM CuSO₄ zugesetzt worden war, wurden mit je 25 ml dieser Vorkultur angeimpft. Die Anzucht erfolgte bei 24 °C unter Schütteln bei 110 Upm. Diese Kulturen wurden am zweiten Tag mit je 1,5 mM 2,5-Xylidin induziert. Ab dem dritten Tag wurde die Laccase-Produktion während der nächsten zehn Tage durch einen ABTS-Test bestimmt. Das Experiment wurde in zwei Parallelreihen durchgeführt und die Aktivitätswerte der Parallelanzuchten gemittelt (Abb. 4-39). Es ist zu erkennen, dass alle mit Kupfer supplementierten Ko7 Kulturen eine höhere

Laccase-Expression aufweisen als die F6 Vergleichskulturen. Der Unterschied ist bei 500 μM CuSO_4 am deutlichsten, d. h. der Stamm Ko7 weist bis zu sechs mal mehr Laccase-Aktivität auf als der Stamm F6. Die Ko7 Kultur ohne Kupferzusatz zeigt keine erhöhte Laccase-Produktion und bewegt sich im Bereich der F6 Kultur ohne Kupfer. Bei 3 000 μM Kupfer produziert F6 kaum mehr Laccase als in der Kontrollanzucht ohne Kupfer, während Ko7 noch sehr gut produziert.

Die Unterschiede in der Laccase-Expression beruhen nicht auf Unterschieden im Wachstum, denn die Bestimmung des Trockengewichts der Zellen nach dem Test zeigte, dass alle Kulturen trotz der extrem unterschiedlichen Kupferkonzentrationen vergleichbar gewachsen waren. Die interne Abweichung eines Stammes war nicht größer als 15 bis 20 %, und auch die verschiedenen Stämme differierten nicht sehr viel mehr. So war beispielsweise der Unterschied in der Zellmasse zwischen Ko7 und F6 bei 500 μM CuSO_4 nur 14 %.

Die Überexpression der Kupferhomeostasefaktoren *tahA* und *ctaA* führt auch in *T. versicolor* wie in Hefe zu einem deutlichen Anstieg der Laccase-Expression.

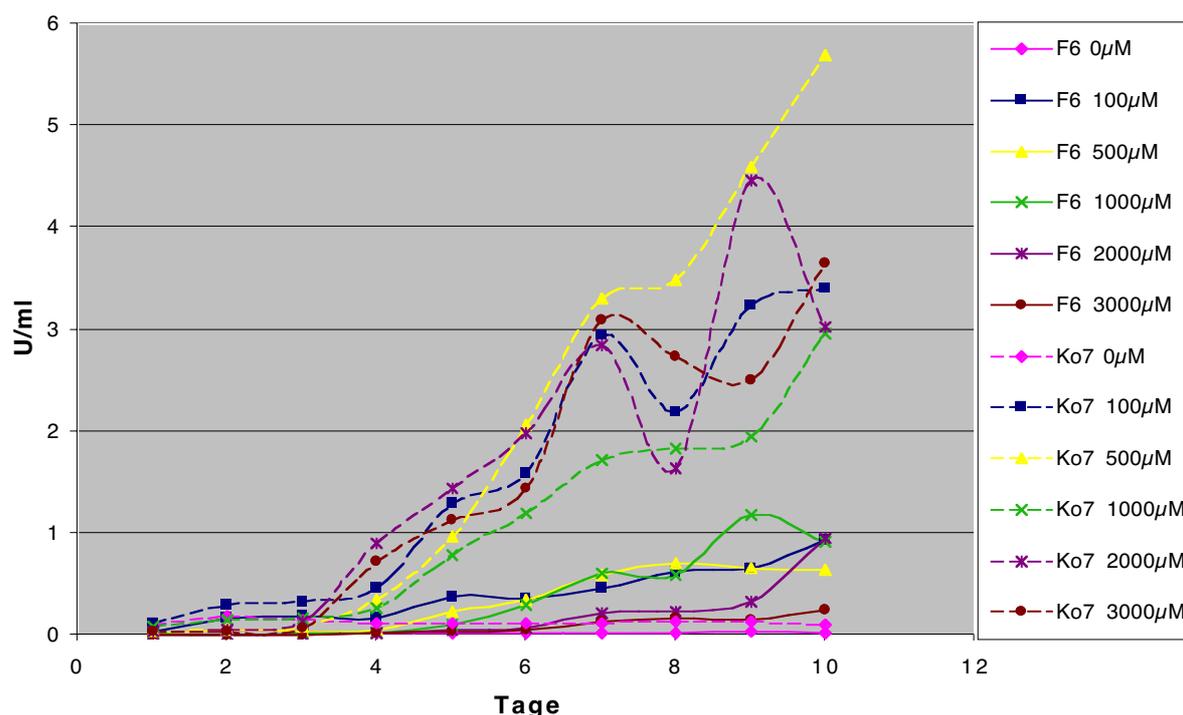


Abb. 4-39: Laccase-Expressions-Analyse von Ko7 im Vergleich zum Kontrollstamm F6 bei verschiedenen Kupferkonzentrationen. Der Stamm F6 und der *tahA* und *ctaA* überexprimierende Stamm Ko7 wurden in Medium, dem zusätzlich 0 / 100 / 500 / 1 000 / 2 000 bzw. 3 000 μM CuSO_4 zugesetzt worden war, angezogen. Über zehn Tage nach der Induktion mit 1,5 mM 2,5-Xylidin wurde die Laccase-Aktivität mit einem ABTS-Test bestimmt. Es ist zu erkennen, dass der Stamm Ko7 (gestrichelte Linien) bei Kupferzugabe deutlich mehr Laccase produziert als F6 (durchgängige Linien).

4.5 Herstellung, Reinigung, Charakterisierung und Rekonstitution von Apo-Laccase

4.5.1 Herstellung von Apo-Laccase

Bei Anzuchten von *T. versicolor* mit dem Kupferchelator BCS fiel auf, dass zwar noch Laccase in das Medium sekretiert wurde, diese jedoch nicht mehr aktiv war. Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde TV1 in Hauptkulturmedium ohne zusätzliches Kupfer mit jeweils 60, 100 und 150 μM BCS unter Schütteln bei 28 °C und 110 Upm angezogen. Als Kontrolle wurde eine Kultur mit 100 μM BCS und 200 μM CuSO_4 angezogen.

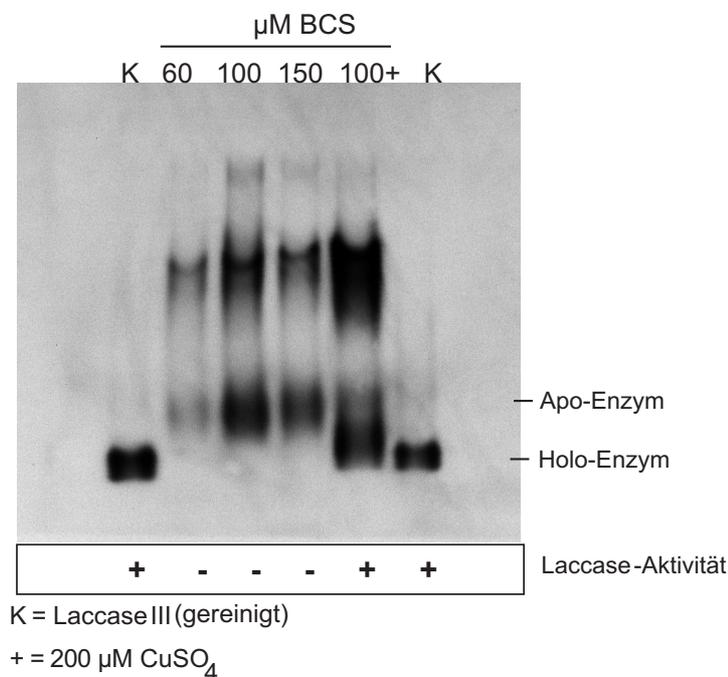


Abb. 4-40: Westernblot-Analyse von Laccase die unter Kupfermangelbedingungen (BCS) exprimiert wurde. In allen Kulturen, die unter Kupfermangel (60, 100 und 150 μM BCS) angezogen wurden, wird Laccase exprimiert. Dies ist auch in der mit 200 μM CuSO_4 supplementierten Kultur der Fall. Es treten dabei zwei Formen auf. Die mit Kupfer beladene, aktive und in einer 6 % igen native-PAGE schneller laufende Form (Holo-Laccase) und die unbeladene, inaktive und langsamer migrierende Form (Apo-Laccase). Die Holoform wird nur in der Kultur exprimiert, der Kupfer zugegeben wurde. Als Kontrolle (K) wurde gereinigte Holo-Laccase III aufgetragen.

Alle Kulturen wurden nach drei Tagen mit 40 $\mu\text{g/ml}$ DABA induziert. Nach weiteren zwei Tagen wurde der Überstand auf Laccase-Aktivität getestet (ABTS-Test). Zusätzlich wurden je 10 μl Überstand durch eine native 6 % ige PAGE (3.15.4) aufgetrennt und dann ein

Westernblot (3.18) gegen Laccase gemacht (Abb. 4-40). In allen Spuren konnte Laccase detektiert werden, wobei nur in der kupferhaltigen Kultur Laccase-Aktivität gemessen wurde. Zusätzlich zeigte sich, dass die Banden der Kulturen mit BCS und ohne Kupfer weniger weit im Gel gelaufen waren als die Bande der Kultur, der 200 μM Kupfer zugesetzt worden war. Als Positivkontrolle wurde gereinigte Holo-Laccase aufgetragen. Es sieht so aus, als würden zwei Formen von Laccase existieren. Eine aktive, mit allen vier Kupferionen beladene Holo-Laccase und eine unbeladene Apo-Laccase. Die höher laufenden Banden rühren von Kreuzreaktionen mit anderen Laccasen aus *T. versicolor* her.

4.5.2 Reinigung von Apo-Laccase

Für die Reinigung von Apo-Laccase wurde 500 ml Hauptkulturmedium, dem kein Kupfer aber 100 μM BCS zugesetzt worden war, mit TV1 angeimpft und mit 40 $\mu\text{g/ml}$ DABA induziert. Nach zehn Tagen Inkubation bei 24 °C unter Schütteln bei 110 Upm wurde der Kulturüberstand geerntet und daraus die Apo-Laccase nach 3.20 gereinigt.

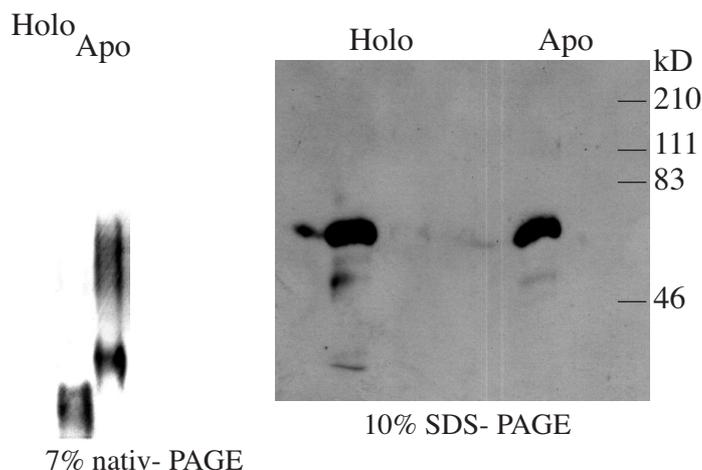


Abb. 4-41: Analyse der Apo- und Holo-Laccase durch Polyacrylamidgelelektrophorese. Die Apo-Laccase läuft im nativ-PAGE langsamer als die Holo-Laccase. Im SDS-Gel laufen beide gleich.

4.5.3 Charakterisierung der Apo-Laccase

Die gereinigte Apo- und Holo-Form der Laccase wurden zuerst durch denaturierende und nicht denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese untersucht. Dazu wurden je 10 ng der gereinigten Enzyme in einem 7 % igen nativen PAA-Gel und in einem 10 % igen SDS-PAA-

Gel aufgetrennt (Abb. 4-41). Hierbei wurde festgestellt, dass die Apo-Laccase im nativen Gel langsamer läuft als das Holo-Enzym. Dagegen laufen beide Formen im denaturierenden SDS-Gel gleich.

Die gereinigte Holo-Laccase hat aufgrund ihres Typ-1-Kupferzentrums eine blaue Farbe (Shin und Lee [2000]) und daher im Bereich von 600 nm ein Absorptionsmaximum im visuellen Spektrum. Dieser Effekt dürfte in einer kupferfreien Form der Laccase nicht auftreten, da das Typ-I-Kupfer nicht vorhanden ist. In Abb. 4-42 sind die Absorptionsspektren der gereinigten Apo- und Holo-Laccase gegenübergestellt. Das Absorptionsmaximum, das für die Holo-Laccase bei 615 nm gemessen wurde, konnte in der Apo-Laccase nicht detektiert werden.

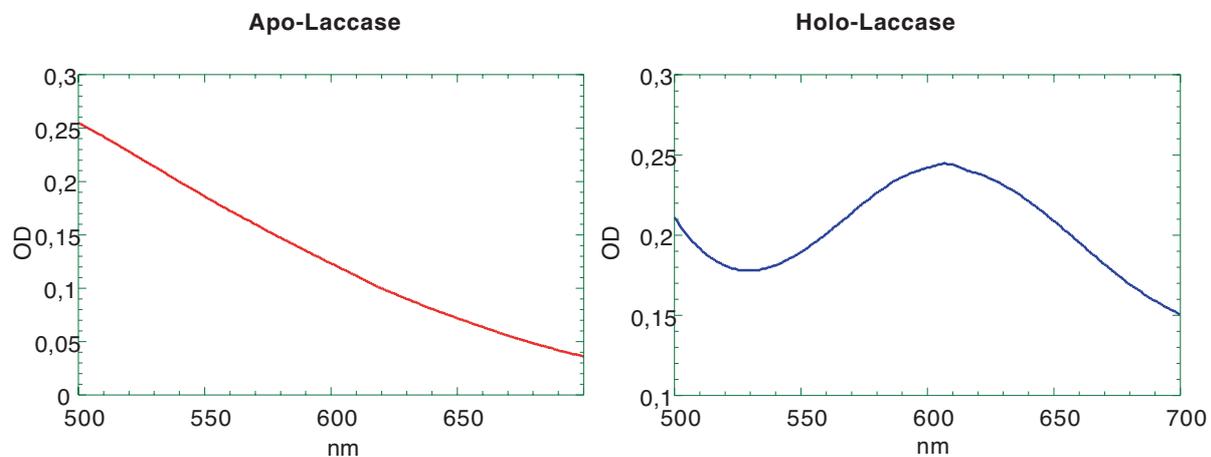


Abb. 4-42: Visuelles Spektrum von Holo- und Apo-Laccase. Holo-Laccase hat bei 615 nm ein Absorptionsmaximum, das bei der Apo-Form des Enzyms nicht detektiert werden kann.

Die gereinigte Apo-Laccase wies noch eine Restaktivität auf, die je nach Anzucht und Reinigung unterschiedlich hoch war.

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) von einer Lösung gereinigter Apo-Laccase ergab, dass der Kupfergehalt bei 400 ng/ml lag, was 6,3 μM entspricht. Die Apo-Laccase Lösung enthielt 0,35 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Laccase, dies entspricht 7 μM . Das Verhältnis der beiden Werte ist somit etwa 1:1, was bedeutet, dass pro Laccase-Molekül ein Kupferion vorhanden ist.

In der aktiven Laccase sind dagegen vier Kupferionen gebunden, was einem Verhältnis von 1:4 entspricht.

Rechnet man von der gemessenen Restaktivität der Apo-Laccase-Lösung auf das zu erwartende Kupfer zurück, so ist die tatsächlich mittels AAS gemessene Kupfermenge viel

höher. Es gibt demnach entweder Zwischenformen mit ein bis drei Kupferionen, oder es handelt sich um Verunreinigungen während der Proteinreinigung.

4.5.4 Rekonstitution der Apo-Laccase mit Kupfer

Die blaue Eisenoxidase Fet3 aus *S. cerevisiae* konnte in einem $\Delta ccc2$ Stamm als Apo-Enzym ohne Kupfer auf der Zelloberfläche der Hefe exprimiert werden. Davis-Kaplan *et al.* [1998] konnte Apo-Fet3 mit 35 mM NaCl, 50 μ M CuSO₄ und 1 mM Ascorbat bei pH 4,5 rekonstituieren. Der Beladungszustand von Fet3 mit Kupfer wurde durch eine Eisenaufnahmemessung bestimmt. Nach der in dieser Veröffentlichung beschriebenen Methode wurde versucht, auch die Apo-Laccase mit Kupfer zu beladen. Der Beladungszustand der Laccase wurde durch einen Aktivitätstest (ABTS-Test) überprüft. In einem Standard-Rekonstitutionsexperiment befanden sich 50 μ M CuSO₄, 80 mM NaCl, 400 ng Apo-Laccase und 1 mM Na-Ascorbat in 50 μ l Mac Illvaine Puffer mit pH 4,5. Dieser Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe von 1 U Ascorbatoxidase und Inkubation von 30 min bei 37 °C gestoppt und anschließend die Laccase-Aktivität bestimmt. Die Kontrollen ohne Kupfer, bzw. ohne Salz, bzw. ohne Ascorbat zeigten keine Erhöhung der Laccase-Aktivität, während der komplette Standard-Ansatz im Vergleich zu den Kontrollen eine zehnfache Steigerung der Laccase-Aktivität zeigte. Es war daher interessant, die Bedingungen für die Rekonstitution genauer zu untersuchen. Dabei wurde der Test mit variablen Konzentrationen von verschiedenen Kupferquellen, von unterschiedlichen Salzen, und von Na-Ascorbat sowie unter verschiedenen pH-Bedingungen durchgeführt.

4.5.4.1 Abhängigkeit der Rekonstitution von der Kupferkonzentration

Um den Einfluss der Kupferkonzentration auf die Beladung der Apo-Laccase zu untersuchen, wurden 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 bzw. 100 μ M CuSO₄ in einem Rekonstitutionsexperiment getestet. In Abb. 4-43 ist zu erkennen, dass ab etwa 50 μ M Kupfer keine signifikante Zunahme der Laccase-Aktivität festzustellen war, und dass 5 bis 10 μ M Kupfer ausreichend waren, um eine signifikante Menge an Apo-Laccase zu rekonstituieren. Es wurde auch die Cu(I)-Quelle Cu-Tetrakis (Acetonitril) in den Konzentrationen 0 / 5 / 25 / 50 / 100 und 200 μ M in einem entsprechenden Experiment getestet (Abb. 4-44). Eine Parallelreihe in diesem Experiment wurde ohne Ascorbat durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass 5 μ M

Cu-Tetrakis für die Rekonstitution von Apo-Laccase ausreichend waren. Ohne Zugabe des Reduktionsmittels Ascorbat fand keine Beladung der Apo-Laccase statt, egal ob Kupfer in Form von Cu(II) oder Cu(I) zur Rekonstitution angeboten wurde.

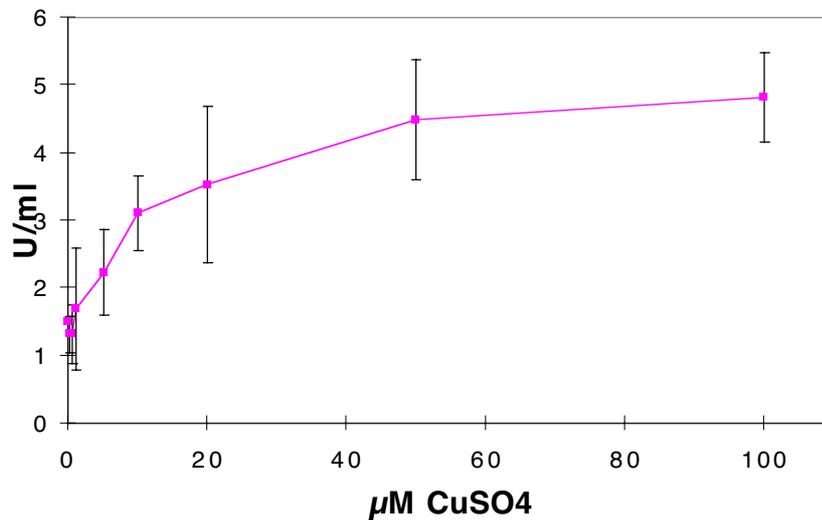


Abb. 4-43: Abhängigkeit der Rekonstitution von Apo-Laccase von der CuSO₄- Konzentration. Es wurden Rekonstitutionsexperimente mit 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 und 100 µM CuSO₄ durchgeführt und dann die Laccase-Aktivität (ABTS-Test) bestimmt. 10 µM CuSO₄ sind für eine effiziente Rekonstitution der Apo-Laccase ausreichend.

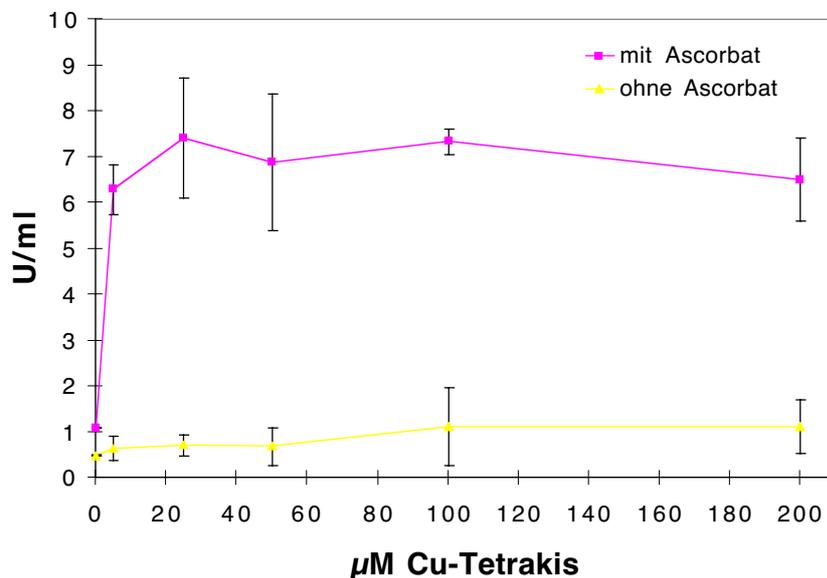


Abb. 4-44: Abhängigkeit der Rekonstitution von Apo-Laccase von der Cu-Tetrakis-Konzentration. Es wurden Rekonstitutionsexperimente mit 0 / 5 / 25 / 50 / 100 und 200 µM der Cu(I)-Quelle Cu-Tetrakis durchgeführt und dann die Laccase-Aktivität (ABTS-Test) bestimmt. Als Kontrolle wurde eine Experimentreihe ohne Zugabe von Ascorbat durchgeführt. Es wurde festgestellt, dass ohne Ascorbat keine Rekonstitution stattfindet. Mit Ascorbat im Rekonstitutionsansatz sind weniger als 5 µM Cu-Tetrakis für die Beladung der Laccase mit Kupfer ausreichend.

4.5.4.2 Ascorbatabhängigkeit der Rekonstitution

Wie das vorangegangene Experiment zeigt, spielt Ascorbat eine essentielle Rolle bei der Kupferbeladung der Apo-Laccase. Deshalb wurde der Einfluß von 0 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 / 50 / 100 / 200 / 500 und 1 000 μM Na-Ascorbat auf die Rekonstitution von Apo-Laccase mit Kupfer getestet. Der Rekonstitutionsansatz enthielt 100 mM NaCl und 50 μM CuSO_4 bei einem pH-Wert von 4,5. Das Experiment (Abb. 4-45) zeigt, dass 200 μM Ascorbat ausreichend sind, um Kupfer effizient in Apo-Laccase einzubauen, und dass bei 1 mM Ascorbat keine signifikante Steigerung der Aktivität im Vergleich zum 200 μM Wert erreicht wurde.

Eine Messung bei der 6 mM GSH als Reduktionsmittel verwendet wurde zeigte, dass auch in diesem Fall die Rekonstitution funktionierte. Die Messung wurde nur als Einzelwert durchgeführt, weshalb keine Kurve existiert.

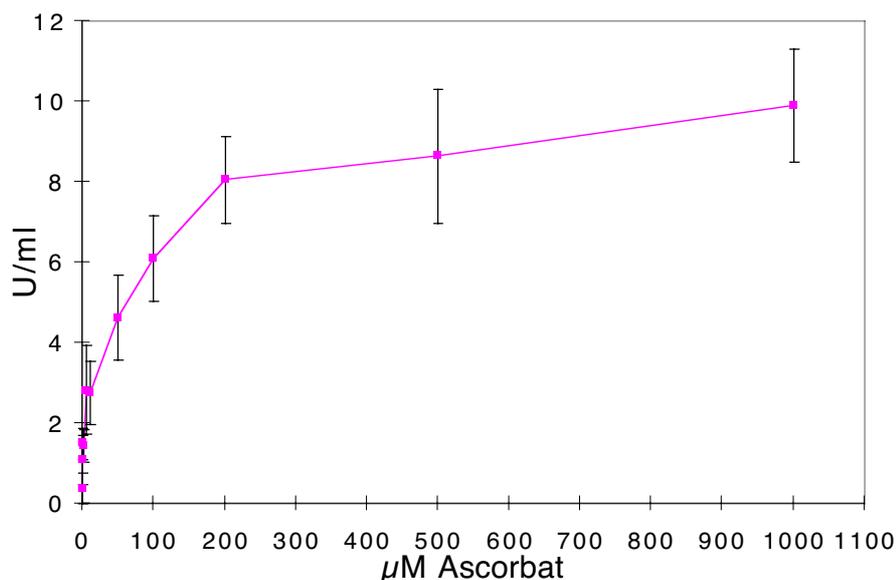


Abb. 4-45: Abhängigkeit der Rekonstitution der Apo-Laccase von der Na-Ascorbat Konzentration. 200 μM sind für eine effiziente Beladung der Apo-Laccase mit Kupfer ausreichend. Bei noch höheren Konzentrationen wurde keine erhebliche Verbesserung der Rekonstitution erreicht.

4.5.4.3 Abhängigkeit der Rekonstitution von einwertigen Anionen (Halogenide)

Kürzlich zeigte *Gaxiola et al.* [1998], dass eine Δgef1 Mutante in *S. cerevisiae* nicht in der Lage ist, auf Eisenmangelmedium zu wachsen, und dass dieser Effekt auf eine unzureichende Beladung von Fet3 mit Kupfer zurückzuführen ist. *GEF1* kodiert für einen Chloridkanal in der Golgi-Membran. Deshalb wurde der Einfluss von Chlorid, Bromid und Iodid sowie der Pseudohalogenide Cyanat und Cyanid auf die Rekonstitution der Apo-Laccase untersucht. Es wurden je 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 und 100 mM NaCl, NaI, KBr, NaOCN und NaSCN mit 50 μM CuSO_4 bei einem pH von 4,5 in den Test eingesetzt. Aus Abb. 4-46 ist zu ersehen, dass Chlorid essentiell für die Kupferbeladung des Apo-Enzyms ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Beladung mit zunehmender Größe des zugegebenen Anions immer schlechter wird ($\text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$). So wirkt Bromid ineffizienter als Chlorid und Iodid wirkt eher inhibierend auf die Rekonstitution des Apo-Enzyms. Die als stark kupferbindend bekannten Pseudohalogenide OCN^- und SCN^- sind beide - wie Iodid - bei diesem Experiment Inhibitoren.

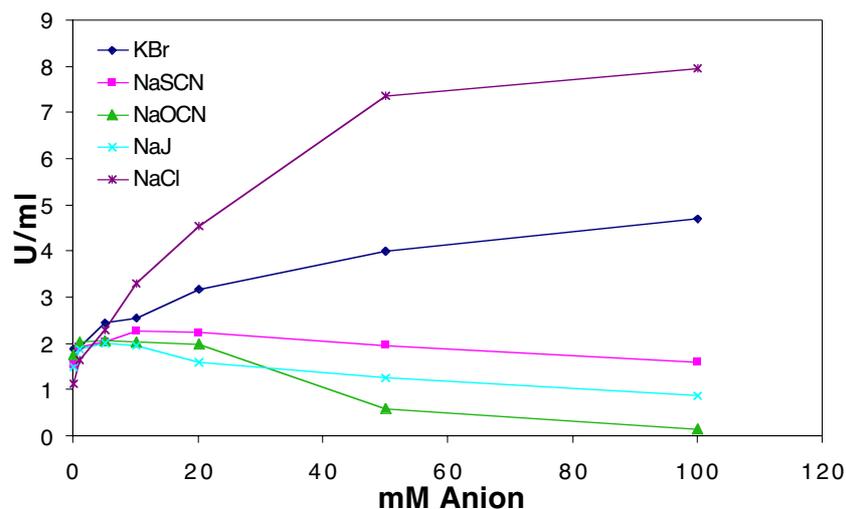


Abb. 4-46: Abhängigkeit der Rekonstitution von der Konzentration einwertiger Anionen (Halogenide). Es wurden 0 / 1 / 5 / 10 / 20 / 50 und 100 mM NaCl, NaI, KBr, NaOCN und NaSCN in das Rekonstitutionsexperiment eingesetzt. Es ist zu sehen, dass Chlorid essentiell für das Experiment ist, und dass Bromid ineffizienter ist als Chlorid. Iodid, $(\text{OCN})^-$ und $(\text{SCN})^-$ sind Inhibitoren des Experiments.

4.5.4.4 Einfluss des pH-Wertes auf die Rekonstitution

Die in der Membran von Post-Golgi-Vesikeln lokalisierte Protonenpumpe *Vma1* aus *S. cerevisiae* ist essentiell für die Beladung von Fet3 mit Kupfer (*Anderson et al.* [1994]). Deshalb sollte das pH-Optimum für die Rekonstitution von Apo-Laccase bestimmt werden.

Es wurden die pH-Werte 1,7 / 2 / 2,5 / 3 / 3,5 / 4 / 4,5 / 5 / 5,5 / 6,5 und 7 getestet, die durch Titration des Mac Illvaine Puffers eingestellt worden sind. Abb. 4-47 zeigt, dass das Optimum für die Rekonstitution mit etwa pH 3 sehr viel niedriger ist als das Optimum für die Kupferbeladung von Fet3, das etwa bei pH 4,5 liegt (Davis-Kaplan et al. [1998]).

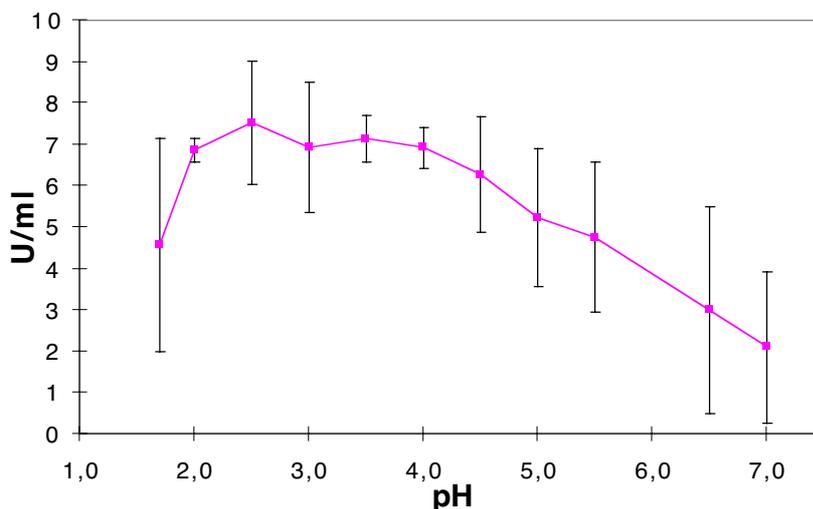


Abb. 4-47: Abhängigkeit der Rekonstitution der Apo-Laccase vom pH-Wert: Die Rekonstitution wurde bei den pH-Werten 1,7 / 2 / 2,5 / 3 / 3,5 / 4 / 4,5 / 5 / 5,5 / 6,5 und 7 getestet. Das Optimum liegt bei pH 3 bis 4.

4.5.4.5 Zeitabhängigkeit der Rekonstitution

Um zu untersuchen, ob es möglich ist, dass die Apo-Laccase während des 10 bis 20 min dauernden Transports vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran (Lippincott-Schwartz [2001]) mit Kupfer beladen werden kann, wurde die Rekonstitution in Abhängigkeit von der Zeit beobachtet. Dazu wurde ein 100 µl Rekonstitutionsansatz mit 50 µM CuSO₄ und 100 mM NaCl bei pH 4,5 angesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mM Ascorbat gestartet und nach 0,5 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 20 / 40 / 50 und 60 min gestoppt, indem jeweils 5 µl aus der Reaktion in 985 µl Mac Illvaine Puffer, der 1 U Ascorbat-Oxidase enthielt, verdünnt wurden. Danach wurde die Laccase-Aktivität durch Zugabe von 10 µl ABTS bestimmt. Aus dem Experiment wird deutlich, dass die Laccase-Moleküle nach 20 min fast komplett mit Kupfer beladen sind. Der lineare Bereich der Reaktion endet nach 5 min und geht dann in eine Sättigungskurve über (Abb. 4-48).

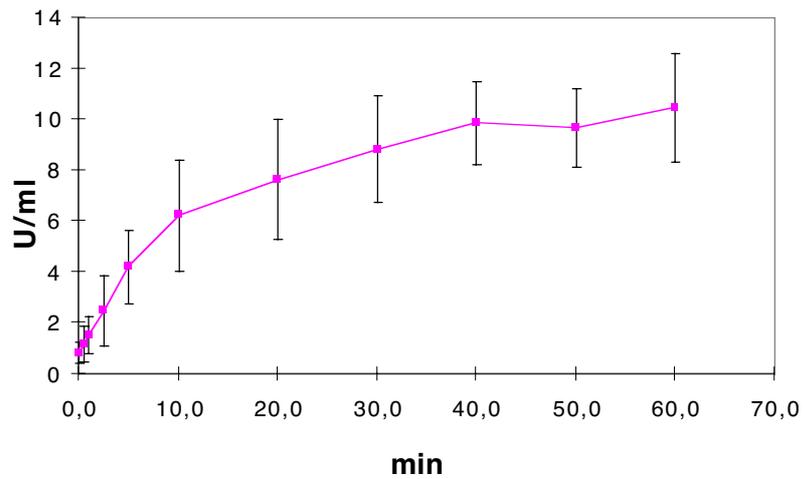


Abb. 4-48: Zeitabhängigkeit der Rekonstitution von Apo-Laccase mit Kupfer. Die Reaktion wurde nach 0,5/ 1/ 2,5/ 5/ 10/ 20/ 40/ 50 und 60 min gestoppt und die Laccase-Aktivität (U/ml) bestimmt. Nach 20 min war die Beladung mit Kupfer fast komplett. Der lineare Bereich der Reaktion endete nach 5 min und ging dann in eine Sättigungskurve über.

Wie aus den oben gemachten Experimenten zu ersehen ist, kann Apo-Laccase also durch eine 30 minütige Behandlung mit einer physiologischen Salzkonzentration (150 mM NaCl), 10 bis 20 μ M Kupfer, sowie einem Reduktionsmittel (1 mM Ascorbat oder 6 mM GSH) bei einem pH-Wert von 4,5 mit Kupfer beladen werden.

5 DISKUSSION

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement aber auch ein potentes Zellgift. Seine Verstoffwechslung verlangt von jedem Organismus eine exakte und auf die Lebensweise abgestimmte Regulation. Freies Kupfer kommt in der Zelle so gut wie nicht vor (*Rae et al.* [1999]), und die deregulierte Aufnahme von Kupfer führt zum Zelltod. *T. versicolor* muss als guter Laccase-Produzent über ein sehr angepasstes Kupferhomeostase-System verfügen, um Laccase mit ausreichend Kupfer zu versorgen. Ziel dieser Arbeit war es, Einblick in den Kupferhaushalt des Pilzes zu gewinnen und die Laccase-Ausbeute durch genetische Manipulation von *T. versicolor* zu erhöhen. Trotz des großen biotechnologischen Interesses an Laccase gibt es so gut wie keine Untersuchungen zur Kupferhomeostase in höheren Pilzen.

5.1 Vortest

Bei der Bestimmung der Laccase-Aktivität in den Vortests (4.1.1) wurde deutlich, dass die Laccase-Expression nicht nur von der Transkription des Laccase-III-Gens abhängt (konstitutive Expression in Hefe), sondern auch von der Kupferversorgung der Zellen. Kupfer hat dabei keinen Einfluss auf die Transkription des Laccase-III-Gens (*Rupert Pfaller, Consortium für elektrochemische Industrie*), obwohl für andere Laccasen eine kupferabhängige Regulation gezeigt werden konnte (*Palmieri et al.* [2000]). Es ergab sich ein Optimum für die Laccase-Expression bei etwa 500 μM Kupfer, was in der Natur so gut wie nie vorhanden ist. Trotzdem zeigte dieses Experiment, dass eine bessere Versorgung der Zellen mit Kupfer auch zu einer besseren Kupferbeladung der Laccase im Golgi führt und zwar unabhängig vom verwendeten Organismus. Welche Gene und regulativen Mechanismen dabei eine Rolle spielen, ist weit gehend ungeklärt. *T. versicolor* scheint aber in dieser Hinsicht besondere Gene bzw. Regulationen entwickelt zu haben, da der Pilz im Vergleich zu anderen fungalen Expressionssystemen wie *Pichia* und *Aspergillus* eine deutlich größere Menge an Laccase sekretiert.

5.2 Herstellung der Genbanken

Um ein geeignetes Werkzeug für die Identifizierung von Genen aus *T. versicolor* zu haben, wurden drei cDNA-Banken hergestellt. Die *T. versicolor* Zellen wurden hierfür unter erhöhter Kupferkonzentration und DABA-Induktion angezogen, um eine Anreicherung der an der Laccase-Herstellung beteiligten Gene zu erreichen. Die Genbanken enthielten 60 000 (pJG4-5) bis 160 000 (pAT) unabhängige Klone. Anhand der Genomgröße von *T. versicolor* wurde die Anzahl der Gene wie für *Schizophyllum* auf etwa 20 000 abgeschätzt (Dons *et al.* [1979; Dons und Wessels [1980]). Deshalb wurde unter Berücksichtigung der Tatsache, dass bei fast allen cDNA-Fragmenten das Start-ATG vorhanden ist, kalkuliert, dass mindestens 60 000 Klone in einer Genbank sein sollten, damit jedes Gen einmal enthalten ist. Diese Voraussetzung trifft auf alle Genbanken zu. Daher sind alle drei Genbanken prinzipiell für die Isolation von Genen durch Komplementation und PCR ausreichend. Die für einen „Interaction Trap“ konstruierte cDNA-Bank in pJG4-5 ist nur bedingt für den ihr zugedachten Zweck geeignet, da hier noch Leserahmenunterschiede zum Tragen kommen und die Anzahl der unabhängigen Klone etwa drei mal so groß sein sollte.

5.3 Isolierung und Charakterisierung von *tahA*

Es konnten zwei genomische Allele des *tahA* Gens aus *T. versicolor* isoliert werden, die für ein 7,9 kD Protein kodieren. Das TahA Protein zeigt Homologie zu Kupferchaperonen aus anderen Organismen, wie z.B. zu Atx1 aus *S. cerevisiae* oder CCH aus *A. thaliana*. Besonders konserviert ist hierbei das Metallbindemotiv MxCxxC, das in diversen unterschiedlichen Kupfer-bindenden Proteinen zu finden ist, sowie die lysinreiche Domäne, welche bei Atx1 die Interaktion mit Ccc2 vermittelt (Pufahl *et al.* [1997]). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TahA nicht nur strukturell, sondern auch funktionell zu Atx1 konserviert ist. So konnte durch Expression der cDNA von *tahA* der Wachstumsdefekt sowohl einer $\Delta atx1$ Hefemutante auf Eisenmangelmedium komplementiert werden, als auch eine $\Delta sod1\Delta sod2$ Hefemutante vor Sauerstoffvergiftung geschützt werden. Diese zweite Eigenschaft von Atx1 wird allerdings in der Literatur als stochiometrischer und nicht katalytischer Verbrauch von Superoxid diskutiert (Portnoy *et al.* [1999]), da der Effekt nur bei Überproduktion von Atx1 bzw. TahA auftritt. Interessanterweise konnte die Zufallsmutante *ATX**(R68K) die SOD-Aktivität nicht mehr

ausüben, obwohl sie den Eisenmangelphänotyp komplementieren konnte und der Aminosäureaustausch nicht in einer konservierten Region liegt. Ob strukturelle Einflüsse dabei eine Rolle spielen oder nicht muss noch gezeigt werden. Allerdings zeigt ein Vergleich mit der Struktur anderer metalltransportierender Proteine wie MerP (aus Bakterien) oder Ferr (Ferredoxin) aus *Desulfovibrio gigas* (Rosenzweig und O'Halloran [2000]), dass in allen Fällen eine $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ Struktur so angeordnet ist, dass die beiden α -Helices auf einem viersträngigen β -Faltblatt liegen (siehe Abb. 5-1). Für diese Struktur konnte gezeigt werden, dass sie eine feste Cu(I)-Bindung unterstützt und das Metallion vor Oxidantien und konkurrierenden Freien Thiolen (z.B. GSH) schützt (Pufahl et al. [1997]). In wieweit der R68K Austausch in Atx1* den Angriff von Superoxid und somit dessen Entgiftung verhindert, muss noch weiter untersucht werden. Es wurde allerdings durch eine Mutagenese von Atx1 gezeigt, dass auch eine K65E Mutation den Δsod -Phänotyp nicht komplementieren kann (Portnoy et al. [1999]). Ob die räumliche Nähe diese K65E Mutation zum R68 zu einem ähnlichen Effekt führt, muss noch geklärt werden. In TahA, das auch den Δsod -Phänotyp komplementiert, ist auf dieser Position ein Leucin zu finden somit ist nicht die Konservierung des R68 entscheidend für die SOD-Aktivität. Das K65 ist auch in TahA konserviert.

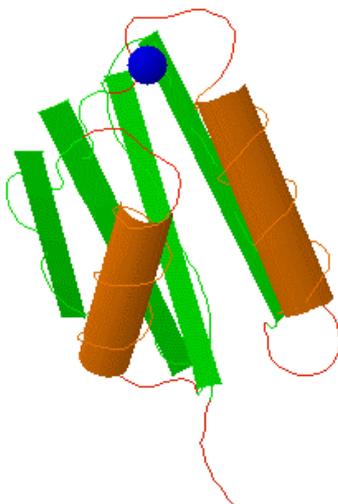


Abb. 5-1: Struktur von Atx1. Die beiden α -Helices (orange) liegen auf einem viersträngigen β -Faltblatt (grün). Das Kupferion (blau) wird im Loop (rot) zwischen dem ersten β -Strang und der ersten α -Helix von zwei Cysteinen koordiniert.

Da TahA die Funktion von Atx1 bei der hoch-affinen Eisenaufnahme übernehmen kann, sollte es auch mit Ccc2 über das lysinreiche Motiv interagieren können. Auch das Kupfer sollte demnach durch den von Pufahl et al. [1997] prognostizierten Mechanismus übergeben werden

können (siehe Einleitung 1.7), was folglich zum Transport von Kupfer in das Lumen der Golgi-Vesikel der Hefe führt.

Es konnte gezeigt werden, dass *tahA* in Abhängigkeit von Kupfer transkribiert wird. Das Gen wird nicht transkribiert, wenn Kupfermangel herrscht (Zugabe von BCS). Ab 0,25 μM CuSO_4 wird es verstärkt transkribiert. In der Promotorregion des Gens wurden vier putative MRE-Sequenzen (metal responsive elements) gefunden, die in Hefe durch den Transkriptionsfaktor Ace1 erkannt werden, der dort die Transkription von den kupferinduzierten Genen *SOD1* und *CUP1* steuert (Thiele [1988]). Die vier vermeintlichen Kupfersensor-Sequenzen im Promotor von *tahA* zeigen Homologie zu den bekannten MREs aus *S. cerevisiae* und *Candida glabrata*. Eine weitere Ähnlichkeit diese putativen MREs besteht auch zu den vor dem *ctr4*-Gen aus *S. pombe* identifizierten CuSEs (Copper Sensing Elements). Diese Elemente werden durch den Transkriptionsfaktor Cuf1 gebunden, wobei es im Gegensatz zu MRE aus *S. cerevisiae* und *C. glabrata* zu einer Transkription unter Kupfermangel kommt (Beaudoin und Labbé [2001]). Weitere Experimente müssen noch zeigen, ob eines oder alle dieser putativen Elemente im Promotor von *tahA* wirklich aktiv bzw. funktionell sind.

Die transkriptionelle Regulation von Hefe *ATX1* wird hingegen nicht von Kupfer beeinflusst, sondern von Eisen und oxidativem Stress (Lin und Culotta [1995]). Dieser Unterschied könnte durch die Tatsache erklärt werden, dass Basidiomyceten strikt aerobe Organismen sind, während Hefe hauptsächlich durch Fermentation wächst. *T. versicolor* kann somit unter Kupfermangel die Versorgung des sekretorischen Systems und damit der Laccase mit Kupfer abstellen, um die Versorgung der Atmungskette mit Kupfer sicherzustellen. Hefe dagegen kann auch ohne Atmung gut existieren, braucht aber mit Kupfer beladenes Fet3, um unter Eisenmangelbedingungen zu wachsen. Daher ist eine eisenabhängige Regulation von *ATX1* sinnvoll. *T. versicolor* nimmt sein Eisen wahrscheinlich, wie für Basidiomyceten vermutet, hauptsächlich durch selbst synthetisierte Siderophore auf, weshalb keine Induktion von *tahA* unter Eisenmangel detektiert wurde. *Arabidopsis thaliana* zeigt im Gegensatz zu *T. versicolor* und *S. cerevisiae* noch eine völlig andere Regulation. Dort wird die Transkription des Kupferchaperon-Gens *CCH* durch Kupfergabe heruntergeregelt, während die des Metallothionein-Gens hoch reguliert wird (Himmelblau et al. [1998]).

Die beiden mutierten MRE ähnlichen Sequenzen in Allel *tahA-2* hatten keinen Einfluss auf die kupferabhängige Transkription des *tahA-2*-Allels, wie die Northernblot-Untersuchungen der Stämme F6 (Allel *tahA-2*) und Sp4 (Allel *tahA-1*) zeigte. Dies könnte daran liegen, dass der

regulierende Faktor trotz der Mutationen an die MRE homologen Sequenzen bindet, oder dass dieser Faktor eine völlig andere Bindestelle verwendet. Auch das 425 bp große IS-Element in der Promotorregion des Allels *tahA-2* hatte keinen Einfluss auf die Transkription des *tahA*-Gens. Es handelt sich also um kein regulatives Element, das „Enhancer-“ oder „Silencer-“ Funktion hat. Vielmehr weisen Homologien zu einem „Stelth Virus“ auf die Möglichkeit hin, dass es sich um die Reste eines mobilen Elementes oder Virus handeln könnte.

Durch weitere Studien der Regulation von *tahA* und anderer Kupferhomeostasefaktoren aus *T. versicolor* könnte das Verständnis über die Regulation der Hierarchie der Kupferverteilung innerhalb der Zelle (Mitochondrien > Cytoplasma > sekretorisches System), wie sie von *Shatzman und Kosman* [1978] für *Dactylium dendroides* beschrieben wurde, besser beleuchtet werden.

5.4 Isolierung und Charakterisierung von *ctaA*

Es konnten zwei Allele von *ctaA* durch funktionelle Komplementation einer *S. cerevisiae* $\Delta ccc2$ Mutante mit einer *T. versicolor* cDNA-Bank isoliert werden. In den isolierten genomischen Sequenzen des *ctaA*-Gens wird die kodierende Sequenz durch drei Introns unterbrochen. Von diesen Introns ist das zweite aufgrund seiner Größe sehr ungewöhnlich (Intron 2 von Allel *ctaA-1*: 643 nt; Intron 2 von Allel *ctaA-2*: 284 nt), da in höheren Pilzen die Introns meist nur zwischen 50 bp und 60 bp, selten bis 100 bp, lang sind (*Gurr* [1988]). In diesen langen Introns konnten keine ungewöhnlichen Sequenzen wie invertierte Sequenzwiederholungen identifiziert werden, die z.B. auf ein IS-Element hinweisen könnten.

Das aus den cDNAs abgeleitete 983 AS große Protein zeigte bis zu 60 % Homologie zu den bekannten Kupfer-P-Typ-ATPasen Ccc2 aus Hefe und MNKP aus dem Menschen. Überhaupt ist diese Proteingruppe über alle Organismen und Reiche hoch konserviert. In allen finden sich am N-Terminus ein bis sechs Metallbinde-Stellen (MBS) (*Pena et al.* [1999]) mit der Konsensussequenz GMTCxxC. Wie Ccc2 hat CtaA auch zwei MBS am N-Terminus. Für Ccc2 wurde gezeigt, dass Atx1 an diese Motive bindet und das Kupfer übergibt (*Pufahl et al.* [1997] *Huffman und O'Halloran* [2000]). Da *ctaA* eine $\Delta ccc2$ Hefemutante voll funktionell komplementiert, interagieren die zwei MBS von CtaA sicherlich auch mit Atx1 und übernehmen dann das Kupfer. *Forbes et al.* [1999] konnte durch Deletions-Analyse der MBS im WNDP zeigen, dass die MBS, die am nächsten zur ersten Membrandomäne lokalisiert ist,

für den Kupfertransport ausreichend aber auch essentiell ist. Weitere hoch konservierte Bereiche sind das CPC-Motiv in der Membrandomäne VI, das essentiell für die Kupfertransduktion ist. Auch für das Methionin 1386 in der Membrandomäne VIII des Maus WND-Proteins konnte gezeigt werden, dass es für den Kupfertransport essentiell ist (*Voskoboinik et al.* [2001]). Dieses Methionin ist in allen Kupfer-P-Typ-ATPasen und auch in CtaA konserviert. Die ATP-Bindedomäne, die Phosphorylierungs-Domäne und die Dephosphorylierungs-Domäne, an denen der Umsatz von ATP zu ADP stattfindet, um den Transport des Kupfers anzutreiben, wurden auch in CtaA identifiziert. Es ist somit davon auszugehen, dass CtaA in *T. versicolor* die gleiche Funktion ausübt wie Ccc2 in Hefe und dass es im Golgi-Netzwerk lokalisiert ist.

Eine genauere Aussage über die Funktion von CtaA in *T. versicolor* könnte nur ein *ctaA* „Knock-out“ Stamm geben, der aber während dieser Arbeit, trotz intensiver Bemühung, nicht hergestellt werden konnte. Grund dafür könnte sein, dass eines der fünf Laccase-Isoenzyme aus *T. versicolor* essentiell für die Zellentwicklung bzw. Mophogenese sein könnte. Diese Laccase könnte in einem Δ *ctaA* Stamm nicht mehr mit Kupfer beladen werden und wäre somit inaktiv, was dazu führen würde, dass der „Knock-Out“-Stamm nicht wächst. Auch wurde für die Biosynthese von Ceramiden in *S. cerevisiae* beschrieben, dass deren zweite Hydroxylierung von Ccc2 abhängt (*Haak et al.* [1997]). Ein ähnlicher Effekt könnte auch die Zellentwicklung von *T. versicolor* beeinflussen. Ein zusätzlicher Hinweis für obige Theorien wäre, dass bei der Transformation von *T. versicolor* mit einem *ctaA*-antisense-Konstrukt nur sehr wenig Transformanden erhalten wurde. Diese zeigten zudem keine Expression der antisense-RNA. Die Expression der antisense-RNA könnte somit wie der *ctaA*-Knock-Out ein letales Ereignis sein. Diese Fragestellung könnte in zukünftigen Experimenten durch Transformation eines induzierbaren antisense-Konstrukt geklärt werden.

In der Promotorregion wurden einige Erkennungs-Motive für Transkriptionsfaktoren, wie NIT2, GCN4 und NF1 gefunden, ein Transkript konnte aber durch Northernblots nicht nachgewiesen werden. Ob das sehr große zweite Intron auf die sehr geringe Transkription des *ctaA*-Gens Einfluss hat, ist unklar, es wird jedoch angenommen, dass die Intronlänge indirekt über die Spleiß-Effektivität Einfluss auf die Anzahl der Transkripte haben könnte (*Pukkila und Casselton* [1991]). Eine zweite Möglichkeit für die geringe Transkription des *ctaA*-Gens wäre, dass das Intron eine Art Terminatorstruktur ausbildet, und so die Anzahl der Transkripte niedrig gehalten wird. Über die transkriptionelle Regulation der homologen Proteine gibt es bis

jetzt kaum Untersuchungen. Nur für das *WND*-Gene wurden vier MREs im Promotor detektiert (*Oh et al.* [2002]), die aber noch nicht auf Kupferinduktion getestet wurden. Bei den P-Typ-ATPasen handelt es sich wahrscheinlich um Haushaltsgene, die eher auf Proteinebene reguliert werden. Bis jetzt konnte aber nur für die homologen Kupfer-P-Typ-ATPasen WNDP und MNKP gezeigt werden, dass sich deren Lokalisation, je nach Kupferkonzentration im Medium, ändert. So sind sie bei niedrigen Kupferkonzentrationen im Golgi und unter hohen Kupferkonzentrationen an der Zellmembran lokalisiert, wo sie dann Kupfer aus der Zelle herauspumpen (*Petris et al.* [1996]; *Hung et al.* [1997]).

5.5 Isolierung und Charakterisierung von *cupA* und *cupB*

Das Gen *cupA* wurde durch eine funktionelle Komplementation einer Hefe $\Delta ctr1$ Mutante aus *T. versicolor* isoliert. Das Gen kodiert für ein 19,8 kD Protein, das Homologie zu Ctr1 aus Hefe aufweist. Durch die Komplementation wurde zugleich gezeigt, dass das CupA Protein eine funktionelle Kupferpermease ist. Die Homologie zu Ctr1 ist allerdings nicht sehr hoch und nur auf wenige konservierte Motive beschränkt. So ist vor allem ein MxxxM Motiv in der zweiten Membrandomäne zu finden. Für dieses Motiv, das in allen Kupferpermeasen konserviert ist, konnte erst kürzlich eine Beteiligung an der Kupferaufnahme im Falle von Ctr1 und hCtr1 nachgewiesen werden (*Puig et al.* [2002]). Eine Substitution der beiden Methionine mit Alanin führte zu einem Verlust der Transportfunktion der Proteine. Eine Substitution durch Cystein konnte die Funktion aber erhalten, was zusammen mit der zur Zellaußenseite lokalisierten Position des Motivs zu der Vermutung führt, dass die Koordination des Kupfers die initiale Rolle beim Transport des Ions spielt (*Puig et al.* [2002]). Auch in den P-Typ-ATPasen MNKP und WNDP wurde in der achten Membrandomäne ein hoch konserviertes Methionin (z.B. AS 1393 in MNKP) identifiziert, das essentiell für den Kupfertransport ist (*Voskoboinik et al.* [2001]).

Das *cupB*-Gen wurde durch Zufall aus der Komplementation einer $\Delta cup5$ Hefemutante erhalten. Das Gen kodiert für ein 21,8 kD Protein mit ähnlichen Eigenschaften wie CupA. Auch hier ist das MxxxM Motiv zu finden, das dieselbe Position hat wie in den homologen Proteinen. Der größte Unterschied zu allen Homologen (auch zu CupA) ist, dass für CupB eine zusätzliche Membrandomäne direkt am N-Terminus prognostiziert wurde. Ob diese wirklich existiert und welche biologische Relevanz sie hat, muss noch gezeigt werden.

Beide Proteine besitzen nicht die ausgeprägten M-x-M bzw. M-xx-M MBS (metall binding sites)-Motive im N-Terminus wie dies bei *S. cerevisiae* Ctr1, *A. thaliana* COPT1 und hCtr1 der Fall ist (Dancis *et al.* [1994]; Kampfenkel *et al.* [1995]; Zhou und Gitschier [1997]), sie besitzen jedoch methionin- und histidinreiche Domänen im N-Terminus die als Kupferbindestelle fungieren könnten. Puig *et al.* [2002] konnte durch Deletionsstudien an Ctr1 und hCtr1 zeigen, dass diese MBS nur unter sehr starkem Kupfermangel einen Einfluss auf die Effektivität der Kupferaufnahme haben. Dies wurde auch für die sechs kupferbindenden MBS Motive im MNK-Protein gezeigt (Voskoboinik *et al.* [2001]). Es wird diskutiert, ob diese MBS Kupfer von geeigneten Liganden übernehmen und für den Transport bereithalten. Ob die in CupA und CupB gefundenen Methionine und Histidine eine ähnliche Funktion ausüben, muss noch durch zukünftige Experimente geklärt werden. Ein weiteres hoch konserviertes und für den Kupfertransport essentielles Methionin (Puig *et al.* [2002]), das in Ctr1 20 Aminosäuren vor der ersten Transmembrandomäne liegt, wurde auch in CupA und CupB gefunden. Dieses Methionin konnte in Ctr1 auch ohne Verlust der Funktion zu Cystein mutiert werden, was zeigt, dass es wiederum an der Koordinierung des Kupferions beteiligt ist.

Funktionell ergaben sich auch Unterschiede von CupB zu CupA, da CupB zwar das Wachstum einer $\Delta ctr1$ Hefemutante auf BCS und Paraquat wiederherstellen kann, jedoch bei deregulierter Expression in Hefe auf Hochkupfer nicht wie CupA letal wirkt. Bei Koexpression beider Gene in Hefe werden die *cupA* Phänotypen allerdings verstärkt. Dies lässt einerseits den Schluß zu, dass CupB aufgrund der unterschiedlichen Kodonverwendung von *S. cerevisiae* und *T. versicolor* in Hefe nicht gut exprimiert wird und alleine keinen ausgeprägten Phänotyp zeigt. Andererseits könnte CupB eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle haben wie es auch für Hefe Ctr2 angenommen wird (Portnoy *et al.* [2001]). CupB könnte somit z.B. Speicherkupfer aus der Vakuole rekrutieren und dadurch den CupA Phänotyp verstärken. Ein Hinweis dafür wäre, dass das Gen durch Komplementation eines im Golgi lokalisierten Proteins gefunden wurde. Es könnte aber auch sein, dass die CupA und CupB auf Proteinebene unterschiedlich reguliert werden. So könnte die Transportaktivität von CupB unter Hochkupferbedingungen herunterreguliert sein, während CupA noch Kupfer transportieren kann.

Bis heute konnten viele Transmembrantransporter für Metallionen charakterisiert werden. Dabei wurde festgestellt, dass alle mindestens 6 bis 12 Membrandomänen besitzen. Da CupA nur drei bzw. CupB vier putative Membrandomänen hat, sollten die Proteine als Oligomere

vorliegen. Auch für Ctr1 konnte eine Oligomerisierung festgestellt werden (*Dancis et al.* [1994]). Daher wäre die letzte Erklärungsmöglichkeit für den verstärkten Phänotyp der Koexpression, dass CupB mit CupA möglicherweise ein Heterooligomer bildet, das besser Kupfer transportieren kann als die Homooligomere. Auch für die Koexpression von Ctr1 und Ctr3 in Hefe konnte eine bessere Kuperaufnahme festgestellt werden (*Knight et al.* [1996]), ein Ctr1/Ctr3 Heterooligomer wurde aber noch nicht detektiert. Weitere Experimente sollten hier einen verstärkten Einblick ermöglichen. Diese Interaktion könnte durch das Split-Ubiquitin-System (*Stagljar et al.* [1998]) und Kolokalisationsstudien nachgewiesen werden. Für beide Gene konnte gezeigt werden, dass sie in *T. versicolor* unter Kupfermangel verstärkt transkribiert und bei Zugabe von Kupfer herunterreguliert werden. Dies wurde auch für *CTR1* aus *S. cerevisiae* gezeigt (*Dancis et al.* [1994]), was für die Beteiligung der beiden Gene an der hoch-affinen Kupferaufnahme in *T. versicolor* spricht. In Hefe werden die Ctr-Gene durch Mac1 auf Transkriptionsebene induziert (*Dancis et al.* [1994]; *Labbe et al.* [1997]; *Yamaguchi-Iwai et al.* [1997]). Es wäre somit denkbar, dass *cupA* und *cupB* durch ein zu Mac1 homologes Protein reguliert werden. Untersuchungen in diese Richtung müssen aber erst durchgeführt werden.

Interessanterweise ist für den Transport von Kupfer durch Ctr1 die Abhängigkeit von ATP gezeigt worden (*Lin und Kosman* [1990]). Es wurde jedoch kein ATPase Motiv in Ctr1 gefunden. Deshalb wurde anhand von Elektroden-Messungen die Theorie entwickelt, dass der Kupfertransport durch einen Kalium-Antiport angetrieben wird (*De Rome und Gadd* [1987]). In CupA und CupB wurden ebenfalls keine ATPase Motive gefunden. Daher ist es möglich, dass sie im Hinblick auf ihre Funktionalität in der Hefe in ähnlicher Weise angetrieben werden.

Eine Überexpression von *cupA* und *cupB* in *T. versicolor* könnte bei niedrigen Kupferkonzentrationen durchaus zu einer Steigerung der Laccase-Expression führen. Aufgrund der Toxizität von zuviel Kupfer wäre eine sehr geringe konstitutive Expression wahrscheinlich eher Erfolg versprechend.

5.6 Koexpression von *tahA* und *ctaA* in Hefe und in *T. versicolor*

Bei der deregulierten Koexpression von *ctaA* und *tahA* in einer Laccase III exprimierenden Hefe wurde gezeigt, dass die Laccase-Ausbeute bis zu einem Faktor acht bei einer Kupferkonzentration von 10 μ M gesteigert werden konnte (siehe 4.4.1 und Abb. 4-30).

Auch bei der deregulierten Koexpression der beiden Gene in *T. versicolor* wurde eine Steigerung der Laccase-Expression bis auf das achtfache festgestellt. Dies zeigt, dass die Effektivität der Laccase-Herstellung von der Versorgung der Golgi-Vesikel mit Kupfer abhängt. Durch die Überexpression der Gene, die dieses Zellorganell mit Kupfer versorgen, konnte der Kupferfluss Richtung Golgi-Apparat verstärkt werden. Da *ctaA* bei der Überexpression in Hefe unter niedrigen Kupferkonzentrationen den besseren Effekt bei der Laccase-Expression zeigte, und CtaA wahrscheinlich eher auf Proteinebene reguliert wird, ist anzunehmen, dass CtaA der „Flaschenhals“ beim Kupfertransport in das Golgi-Lumen ist. In weiteren Experimenten zur Regulation des CtaA-Proteins soll geklärt werden in wie weit das CtaA-Protein z.B. durch die Phosphorylierung beeinflusst wird. Es wurde von *Shatzman und Kosman* [1978] am Beispiel von Galactose-Oxidase, Cu/Zn-SOD und Cytochrom-Oxidase beschrieben, dass bei Kupfermangel zuerst die Kupferversorgung von sekretierten Proteinen, dann die von der Cu/Zn-SOD und zuletzt die Kupferversorgung der Atmungskettenproteine eingestellt wird. Auch unsere Untersuchungen zeigen dies. So wird in *T. versicolor* unter Kupfermangelbedingungen die Kupferversorgung des Golgi durch Herunterregulierung von *TahA* minimiert (4.3.1) und die Laccase nicht mehr mit ausreichend Kupfer versorgt (4.5.1). Der Pilz wächst allerdings unter diesen Bedingungen noch völlig normal, was zeigt, dass seine Atmungskettenproteine noch Kupfer erhalten. Durch die Überexpression der beiden Gene (*ctaA* und *tahA*) kommt es wahrscheinlich zu einem starken Eingriff in diese Hierarchie der Kupferverteilung zugunsten des Golgi-Netzwerks. Es wurde somit eine Art „Kupferautobahn“ geschaffen, die den Großteil des vorhandenen Kupferpools zum Golgi leitet. Dies hat keine Auswirkungen auf das Wachstum des Pilzes, was zeigt, dass dadurch keine Unterversorgung der für die Atmung wichtigen Kupferenzyme, wie COX, entsteht. Der oben beschriebene verstärkte Kupfertransport zum Golgi könnte auch der Grund dafür sein, dass bei Kotransformante Ko7 bei 3 000 μM Kupfer noch Laccase exprimiert wird, während im Wildtyp F6 kaum noch Laccase-Aktivität zu finden ist. In F6 sind durch die hohe Kupfermenge wahrscheinlich alle Kupferaufnahme-systeme reprimiert und alle Kupferentgiftungsproteine wie z.B. Metallothioneine, sowie Kupferchaperone und Cu/Zn-SOD hoch exprimiert. Für *S. pombe* wurde die Expression von Phytochelatinen unter Kupferstress gezeigt (*Perego et al.* [1996]). Ob und welche dieser Mechanismen auf *T. versicolor* zutreffen, muss durch zukünftige Experimente noch geklärt werden. Da Metallothioneine und Phytochelatine eine sehr hohe Affinität für Kupfer haben (z.B. $> 2 \times$

10^{14} M^{-1} für humanes MT-3 (Hasler et al. [2000])), konkurrieren diese wahrscheinlich mit dem Kupferchaperon TahA um das vorhandene Kupfer. Dadurch wird die Versorgung des Golgi mit Kupfer unterbunden und Laccase nicht mehr mit Kupfer versorgt. In Ko7 wird durch die Überexpression von TahA und CtaA die Konkurrenz mit den Metallothioneinen erleichtert und Laccase noch mit Kupfer versorgt.

5.7 Herstellung, Reinigung und Rekonstitution der Apo-Laccase

5.7.1 Herstellung und Reinigung der Apo-Laccase

Durch die Anzucht von *T. versicolor* unter Kupfermangel konnte eine Laccase mit stark verminderter Aktivität, fehlendem Absorptionsmaximum bei 600 nm und verlangsamtem Lauf in einer nativen PAGE exprimiert werden (4.5.1). Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass die Laccase unter Induktionsbedingungen (DABA) zwar stark gebildet wird, sie jedoch nicht mit Kupfer beladen werden kann, da unter Kupfermangel die wenigen Kupferionen für essentielle Kupferenzyme wie Cytochrom-C-Oxidase verwendet werden (Shatzman und Kosman [1978]). Die Ausbeute an Laccase ging allerdings im Vergleich zu Kulturen, die keinen Kupfermangel haben, deutlich zurück. Dies könnte an Kontrollmechanismen im Golgi-Apparat liegen, welche die unbeladene Laccase zurückhalten bzw. zum Abbau in Lysosomen umsortieren. Die sekretierte Apo-Laccase ist wahrscheinlich auf ein Leck in diesem Kontrollsystem zurückzuführen. Rupert Pfaller (Consortium für Elektrochemische Industrie) konnte auch zeigen, dass *T. versicolor* unter Cu-Mangelbedingungen (Anzucht auf BCS) vermehrt Serin-Proteasen sezerniert. Dies könnte dazu führen, dass Apo-Laccase verstärkt proteolytisch gespalten wird und somit die sekretierte Enzymmenge geringer ist.

Die Charakterisierung der aufgereinigten Apo-Laccase ergab, dass das Typ-1 Kupferzentrum nicht besetzt war und dass weniger als ein Kupferion pro Enzymmolekül vorhanden war. Es wurde eine Restaktivität in der Apo-Laccase-Präparation festgestellt, die aber geringer ausfiel, als die für das Restkupfer berechnete Enzymaktivität. Dies weist darauf hin, dass es nicht nur die mit vier Kupferionen beladene Holo-Laccase und die unbeladene Apo-Laccase, sondern auch Zwischenformen der Beladung geben könnte. Eine andere Erklärung wäre, dass sich freies Kupfer in der Präparation der Apo-Laccase befand, das bei der Reinigung eingebracht worden ist. Für die zweite Annahme spricht, dass für die Kupferbeladung von Ceruloplasmin

gezeigt werden konnte, dass nur beladene oder unbeladene Formen existieren (*Sato und Gitlin* [1991]). Somit könnte also auch Laccase nur in der Holo- oder Apo-Form vorliegen. Reine Apo-Laccase ohne Restaktivität könnte nur durch einen *T. versicolor ctaA* „Knock-Out“-Stamm hergestellt werden. Ein solcher Stamm konnte aber trotz intensiver Bemühungen während dieser Arbeit nicht erzeugt werden (siehe 5.4).

5.7.2 Rekonstitution der Apo-Laccase

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich gereinigte Apo-Laccase ähnlich wie Apo-Fet3 aus Hefe mit Kupfer rekonstituieren lässt (*Davis-Kaplan et al.* [1998]). Für die Beladung sind Chlorid, ein niedriger pH-Wert und ein Reduktionsmittel (Ascorbat) notwendig. Die optimalen Rekonstitutionsbedingungen für die Apo-Laccase wurden mit 5-25 μ M Kupfer, 80-100 mM NaCl und 0,5 mM Ascorbat bei einem pH-Wert von 3,5 bestimmt. *Davis-Kaplan et al.* [1998] verwendeten Ascorbat nicht zur eigentlichen Rekonstitution von Apo-Fet3, sondern für den Eisenaufnahmetest ein, mit dessen Hilfe die Rekonstitution von Apo-Fet3 nachgewiesen wurde. Bei den Rekonstitutionsexperimenten mit Apo-Laccase konnte dagegen gezeigt werden, dass Reduktionsmittel wie Ascorbat oder GSH essentiell für die Rekonstitution ist. Auch die Rekonstitution mit der Cu(I)-Quelle Cu-Tetrakis war abhängig von der Verwendung eines Reduktionsmittels, was darauf hindeutet, dass nicht das Kupfer reduziert sein muss, sondern die Laccase in einer reduzierten Umgebung vorliegen muss, um die Kupferionen in das aktive Zentrum zu inserieren. Das könnte daran liegen, dass die Disulfidbrücken der Laccase (*Jonsson et al.* [1995]) für die Beladung des Proteins mit Kupfer offen sein müssen bzw. das Cystein, das an der Koordination im Typ-1 Kupferzentrum beteiligt ist (*Ducros et al.* [1998]; *Bertrand et al.* [2002]), reduziert sein muss. Unter natürlichen Bedingungen wie in den Golgi-Vesikeln könnte diese Aufgabe von GSH übernommen werden. *Hwang et al.* [1992] bestimmte das GSH/GSSG Verhältnis im sekretorischen System mit 1:1 bis 3:1, was bei einer Konzentration von 8 mM einem Redoxpotential von -170 bis -180 mV entspricht. Dieses Redoxpotential ist ideal für die Rückfaltung von Proteinen mit Disulfidbrücken (*Lyles und Gilbert* [1991]).

Chlorid ist ebenfalls essentiell für die Kupferbeladung von Apo-Laccase wie auch von Apo-Fet3. Für Fet3 wurde dies durch einen Δ gef1 Hefestamm entdeckt (*Davis-Kaplan et al.* [1998]). Gef1 ist ein Chloridtransporter, der im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Fehlt Gef1, kann

ein Hefestamm nicht mehr auf Eisenmangelmedium wachsen, was auf ein inaktives nicht mit Kupfer beladenes Fet3 hinweist (*Greene et al.* [1993] und *Gaxiola et al.* [1998]). *Davis-Kaplan et al.* [1998] zeigte, dass die Rekonstitution von Apo-Fet3 mit Kupfer nur durch Zugabe von NaCl möglich ist. Dies trifft auch, wie in dieser Arbeit gezeigt, für Laccase zu. Die Rekonstitutionseffizienz der Laccase kann dabei bis zu einer Salzkonzentration von 80 mM gesteigert werden, was im Bereich der physiologischen Salzkonzentration von 150 mM NaCl liegt. Dies legt die Vermutung nahe, dass NaCl als allosterischer Faktor bei der Beladung von blauen Oxidasen eine entscheidende Rolle spielt. Chlorid hat zusätzlich noch eine inhibierende Wirkung auf die Laccaseaktivität, die bei 250 mM NaCl völlig aufgehoben wird. Bei dem Versuch Chlorid durch andere einwertige Ionen zu ersetzen, zeigte sich, dass nur Bromid zu einer Rekonstitution führt, diese jedoch sehr viel schlechter ist als die Rekonstitution mit Chlorid. Iodid inhibiert die Beladung der Apo-Laccase. Die Beladung scheint daher auch von der Größe der einwertigen Ionen abhängig zu sein. Große Ionen können wahrscheinlich aus Platzgründen nicht mit den Kupferionen zusammen in die Kupferbindestellen vordringen, um dort den Einbau der Kupferionen zu begünstigen.

Dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Kupferbeladung von Apo-Fet3 hat, zeigte sich an einer $\Delta cup5$ Hefemutante, die in einer Untereinheit der im Golgi lokalisierten Protonenpumpe (Vma3) deletiert ist. Diese Mutante kann nicht auf Eisenmangel wachsen (*Yuan et al.* [1997]), was wiederum zeigt, dass Fet3 nur bei einem niedrigen pH-Wert effizient mit Kupfer beladen werden kann. Für Laccase trifft dies auch zu. Es wurde ein Optimum von pH 3,5 bestimmt. Dies ist in Bezug auf den Golgi sehr niedrig. Der pH-Wert von Golgi-Vesikeln wird für Säugerzellen mit 5,4 - 6,5 angegeben (*Grabe und Oster* [2001] und *Wu et al.* [2001]). Für Hefe und Pilze existieren hingegen keine Daten für den pH-Wert im Golgi-System. Für Lysosomen werden aber durchaus sehr viel saurere (pH 4,5) pH-Werte beschrieben, so dass es durchaus denkbar wäre, dass in *Trametes* spezialisierte Laccase-Sekretions-Vesikel auf diesen pH-Wert angesäuert werden können.

Die Untersuchung der Zeitabhängigkeit ergab, dass die Beladung der Laccase nach ca. 20 min vollständig ist. Dies liegt durchaus in dem Zeitrahmen, der für die Verweildauer von sekretierten Proteinen im Golgi abgeschätzt wird (*Lippincott-Schwartz* [2001]).

Die erhaltenen Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Kupferbeladung vom Apo-Laccase zeigen, dass eine spontane Beladung der Apo-Laccase mit Kupfer ohne einen zusätzlichen Proteinfaktor möglich ist. Es müssten dafür Vesikel mit erhöhter Kupferkonzentration, pH 4,5

und 80 mM Chlorid existieren, in der die Laccase auf ihrem Weg zur Zellmembran mit Kupfer beladen werden kann.

In zukünftigen Experimenten soll geklärt werden, ob durch den Einbau anderer Metalle in die Apo-Laccase, wie z.B. Cerium oder Mangan, Laccasen mit veränderten Redoxeigenschaften generiert werden können.

5.8 Modell der Kupferhomeostase von *T. versicolor*

Laccase wird in *T. versicolor* im Golgi-Netzwerk mit Kupfer beladen. Dazu muss der Pilz Kupfer aufnehmen, zum Golgi transportieren und dort in die Laccase inserieren.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen ergab sich für *T. versicolor* folgendes Modell für die Versorgung des Golgi-Netzwerkes mit Kupfer (Abb. 5-2):

Kupfer (Cu(II)) muss für die Aufnahme durch die Kupferpermerasen zuerst zu Cu(I) reduziert werden. Die postulierte(n) Metallreduktase(n) dafür konnte(n) in *T. versicolor* noch nicht identifiziert werden.

Das reduzierte Kupfer (Cu(I)) wird dann durch die beiden Kupferpermeasen CupA und CupB aufgenommen. Hierfür muss noch geklärt werden, ob CupA und CupB als Einzel- oder Heterooligomere arbeiten und ob beide Proteine die gleiche Lokalisation haben. So ist es durchaus denkbar, dass CupB z.B. in der Vakuole lokalisiert ist, um dort Speicherkupfer zu rekrutieren.

Cu(I) wird im Cytoplasma sofort durch das Kupferchaperon TahA gebunden. Ob es dabei zu einer direkten Interaktion zwischen TahA und CupA bzw. CupB kommt, muss noch geklärt werden. TahA bringt das Kupfer dann zu der in der Golgi-Membran lokalisierten Kupfer-P-Typ-ATPase CtaA, welche die Kupferionen durch ATP-Verbrauch in das Golgi-Lumen pumpt. Dort wird das Kupfer in Apo-Laccase eingebaut. Die Apo-Laccase wurde zuvor in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert und dann zum Golgi-Netzwerk transportiert. Der Mechanismus des Kupfereinbaus in die Laccase ist noch nicht vollständig geklärt. Die Ergebnisse aus den Rekonstitutionsexperimenten in dieser Arbeit zeigen allerdings die Möglichkeit auf, dass es ein unter bestimmten Bedingungen (10 μ M Kupfer, pH 4, leicht reduzierte Bedingungen, 150 mM NaCl) spontan ablaufender Prozess sein kann. Es ist durchaus denkbar, dass solche Bedingungen in speziellen Golgi-Vesikeln existieren.

Überexpression von CtaA und TahA führten zu einer deutlich verbesserten Laccase-Expression, da vermehrt Kupferionen zum Golgi transportiert werden („Kupferautobahn“ zum Golgi).

Kupfer wird somit in *T. versicolor* durch die Kupferpermeasen CupA und / oder CupB aufgenommen, durch TahA zur im Golgi lokalisierten Kupfer-P-Typ-ATPase CtaA transportiert, welche das Kupfer dann ins Golgi-Lumen pumpt. Dort wird es in die Laccase eingebaut.

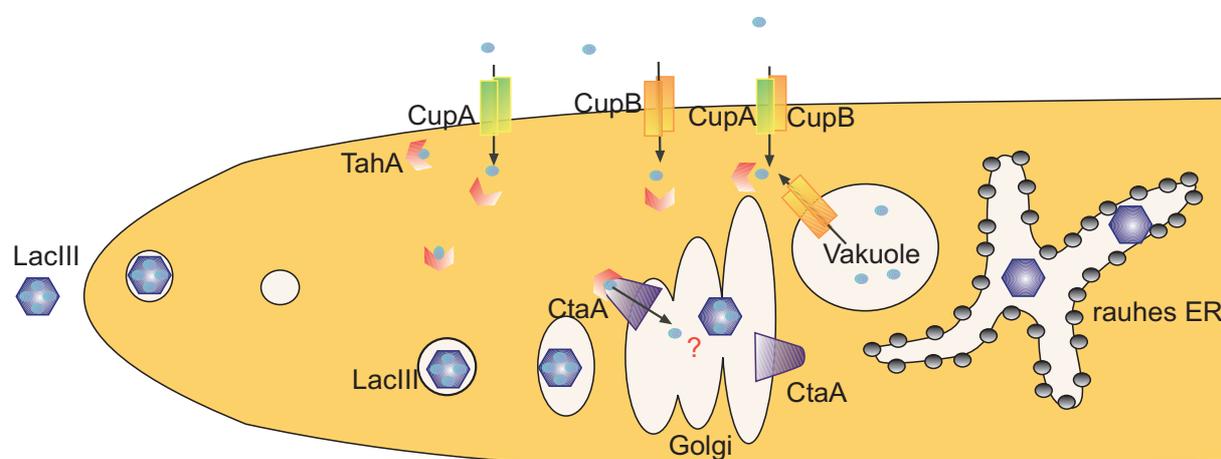


Abb. 5-2: Modell für die Versorgung des Golgi-Netzwerks bzw. der Laccase III mit Kupfer in *T. versicolor*. Laccase wird als Apo-Enzym (ohne Kupfer) in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) translatiert. Von dort gelangt sie in den Golgi-Apparat wo sie mit Kupfer beladen wird. Das Kupfer wird durch die Kupferpermeasen CupA oder CupB bzw. einem Heterooligomer aus beiden aufgenommen. CupB könnte aber auch woanders lokalisiert sein und z.B. Speicherkupfer aus der Vakuole rekrutieren. Das Kupfer wird dann sofort auf das Kupferchaperon TahA übertragen, das die Kupferionen zur Kupfer-P-Typ-ATPase CtaA bringt. CtaA pumpt dann das Kupfer in das Golgi-Lumen, wo es in die Apo-Laccase inseriert wird. Dieser Mechanismus der Kupferbeladung der Apo-Laccase ist noch nicht geklärt (?). Die Holo-Laccase (mit Kupfer) wird durch sekretorische Vesikel an der Hyphenspitze in das Medium sekretiert.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurden vier Gene aus *T. versicolor* isoliert und charakterisiert, die an der Kupferversorgung des Trans-Golgi-Netzwerks, in dem Laccase mit Kupfer beladen wird, beteiligt sind.

Die zwei Kupferpermease-Gene *cupA* und *cupB* (copper uptake permease) konnten durch Komplementation der *S. cerevisiae* Deletionsmutanten $\Delta ctr1$ bzw. $\Delta cup5$ mit einer *T. versicolor* cDNA-Bank isoliert werden. Die aus den beiden Genen abgeleiteten Proteinsequenzen zeigen strukturelle Homologien zu den Proteinen aus der Ctr-Familie und weisen ein in dieser Familie konserviertes MxxxM-Motiv auf. Die Expression beider Gene wird in *T. versicolor* durch Kupfermangel induziert und durch Kupfergabe reprimiert.

Das Gen für das cytosolische Kupferchaperon TahA (*Trametes* ATX1 homolog) wurde mittels PCR mit degenerierten Primern isoliert. TahA zeigt deutliche Homologie zu Atx1 aus *S. cerevisiae*, HAH1 aus dem Menschen und CCH aus *A. thaliana*. TahA kann in Hefe Atx1 funktionell ersetzen: sowohl als Kupfertransportprotein zur im Golgi lokalisierten Kupfer-ATPase Ccc2, als auch bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS). Der Promotor des *tahA*-Gens enthält Motive, die im Promotor der durch Kupfer regulierten Gene Metallothionein (*CUP1*) und Cu/Zn-Superoxiddismutase (*SOD1*) aus *S. cerevisiae* konserviert sind. Das *tahA*-Gen wird unter erhöhten Kupferkonzentrationen ($>0,25 \mu\text{M}$) exprimiert und unter Kupfermangel reprimiert. Es unterscheidet sich somit in der Regulation deutlich vom *ATX1*-Gen, das unter Eisenmangel und oxidativem Stress induziert wird.

Das Gen für die im Golgi-Netzwerk lokalisierte Kupfer-P-Typ-ATPase, *ctaA* (copper transport ATPase), wurde durch die funktionelle Komplementation einer Hefe $\Delta ccc2$ -Mutante mit einer *T. versicolor* cDNA-Bank isoliert. Dadurch wurde zugleich die physiologische Funktion des Proteins bei der Kupferversorgung des Golgi-Netzwerks gezeigt. CtaA weist deutliche Homologien zu den bekannten Kupfer-P-Typ-ATPasen aus dem Menschen (MNKP und WNDP), aus *A. thaliana* (RAN1) und *S. cerevisiae* (Ccc2) auf. CtaA enthält alle wichtigen Motive, die für die Kupfertransport- und ATPase-Funktionen in allen anderen Kupfer-P-Typ-ATPasen konserviert sind.

Durch die deregulierte Koexpression von *tahA* und *ctaA* in *S. cerevisiae* sowie in *T. versicolor* konnte eine im Vergleich zum Wildtypstamm bis zu achtfach höhere Laccase-Expression

erreicht werden. Dies zeigt, dass die Überexpression von Genen, die an der Versorgung des sekretorischen Systems mit Kupfer beteiligt sind, ein Mittel darstellt, um die Expression von sekretierten, kupferabhängigen Enzymen zu steigern.

Durch Anzucht von *T. versicolor* unter Kupfermangel wurde eine Apo-Form der Laccase hergestellt und gereinigt, die kein für blaue Oxidasen typisches Absorptionsmaximum bei 600 nm besaß und die kaum Aktivität aufwies. AAS-Untersuchungen zeigten, dass weniger als ein Kupferion pro Laccase-Molekül in dieser Proteinpräparation vorhanden war.

Durch die *in vitro* Beladung dieser Apo-Laccase mit Kupfer konnte die Enzymaktivität wiederhergestellt werden. Die Bedingungen hierfür waren ein niedriger pH-Wert, reduzierende Bedingungen und das Vorhandensein von NaCl. Eine spontane Beladung der Laccase im Golgi scheint daher ohne Mitwirkung eines weiteren Faktors möglich zu sein.

7 ANHANG

7.1 Sequenzen und Vergleiche

7.1.1 Vergleich von TahA mit Atx1, CCH, CUC-1 und HAH

```

      1          *          20          *          40          *          60          *
TahA : MSE-HTYKFNVKMTCTGCSGAIDRVLKKTD-GVAEYD-ISLEKQEVLVKGTIPYDDLHAKIAKTGKQILSGETVV----
Atx1  : MAEIKHYQFNVMTCSGCSGAVNKVLTKLEPDVSKID-ISLEKQLVDVYTTLPYDFILEKIKKTGKEVRSQKQL-----
CCH   : MAQ--TVVLKVGMSQGGCVGAVNRVLGKMEG-VESFD-IDIKEQKVTVKGNVEPEAVFQTVSKTGKTSYWPVEAEAEPKA
CUC-1 : MTQ---YVFEMGMTCNCGANAARKVLGKLGEDKIKIDDINVETKKITVTTDLPASDVLEALKKTGKEIKQLQ-----
HAH   : M---PKHEFSVDMTCGGCAEAVSRVLNKLGG--VKYD-IDLPNKKVCIESEHSMDTLLATLTKKTGKTVSYLGLE-----

```

Abb. 7-1: Sequenzvergleich von TahA mit Atx1, CCH, CUC-1 und HAH: Der Vergleich von *T. versicolor* TahA mit Atx1 (*S. cerevisiae*), CCH (*A. thaliana*), CUC-1 (*C. elegans*) und HAH (*H. sapiens*). Die konservierten Aminosäuren sind rot markiert.

7.1.2 Vergleich der genomischen Sequenzen von *tahA-1* und *tahA-2*

```

          *          740          *          760          *          780
tahA-1 : TACGCCGCTGGTTTTTTGCGCAGTAAGTGGGACCGTTACCCGCTTTCGCCTCCCCCGGA : 780
tahA-2 : TACGCCGCTGGTTTTTTGCGCAGTAAGTGGGACCGTTACCCGCTTTCGCCTCCCCCGGA : 634

          *          800          *          820          *          840
tahA-1 : CTGCTGCGGAGTCTTCGCTAATATTAGCTCTATCGTGCCCTCCGCAGGTGTGCATTTTC : 840
tahA-2 : CTGCTGCGGAGTCTTCGCTAATATTAGCTCTATCGTGCCCTCCGCAGGTGTGCATTTTC : 694

          *          860          *          880          *          900
tahA-1 : CTGCTGTGCATGCCATAATCGCTGCGCCTCTAGAAGCCATGGCCGTACTAGGTTTCGTCG : 900
tahA-2 : CTGCTGTGCATGCCATAATCGCTGCGCCTCTAGAAGCCATGGCCGTACTAGGTTTCGTCG : 754

          *          920          *          940          *          960
tahA-1 : TCCCTTGTGCACTTTCTGGAACAGTGCTGATCGTTTTTCGCAGGCTTCGTGCTCGCCGGG : 960
tahA-2 : TCCCTTGTGCACTTTCTGGAACAGTGCTGATCGTTTTTCGCAGGCTTCGTGCTCGCCGGG : 814

          *          980          *          1000          *          1020
tahA-1 : GTACCGCTGTATTACATCACGCATCGGAACGAGGGACGGGCGCAATGTGAGTGGTCTCGG : 1020
tahA-2 : GTACCGCTGTATTACATCACGCATCGGAACGAGGGACGGGCGCAATGTGAGTGGTCTCGG : 874

```

```

*          1040          *          1060          *          1080
tahA-1 : TGAATGGTTGCGCAGCGGATTTACCGACGTTCTGCCTCTCTGTATAGCGTTCTTCTCGGG : 1080
tahA-2 : TGAATGGTTGCGCAGCGGATTTACCGACGTTCTGCCTCTCTGTATAGCGTTCTTCTCGGG : 934

*          1100          *          1120          *          1140
tahA-1 : CGTGCGCGCGGATAAGGGGAAGACCCACGCCTGGCGCGGGGTGGCAGGCGGTGGCGAC : 1140
tahA-2 : CGTGACGGCGCGGATAAGGGGAAGACCCACGCCTGGCGCGGGGTGGCAGGCGGTGGCGAC : 994

*          1160          *          1180          *          1200
tahA-1 : AGAAGGGGACGAGAACGTCGAGATGGAGCAGTCGCGGACGCCGCGCGATGACGGGCGTG : 1200
tahA-2 : GGAAGGAGACGAGAACGTCGAGATGGAGGAGTCGCGGACGCCGCGCGATGACGGGCGTG : 1054

*          1220          *          1240          *          1260
tahA-1 : TTAAACATACACGATGGGTCGTTTCAGAGTATAGACACATTCCCGCGCCGACAAGGCGCTG : 1260
tahA-2 : TTAA-CATACACGATGGTTCGTTTCAGAGTATAGACACATTCCCGCAC-----AGGTGCTG : 1108

*          1280          *          1300          *          1320
tahA-1 : CGAGGTAACTGTGGCTGATATTTCTGGATGCGGATGGTTTCGGCCGTACCTGTGGCCCTA : 1320
tahA-2 : CGAGGTAACTGTGGCAGATATTTCTGGATGCGGATGGTTTCGGCCGTACCTCTAGCCCTA : 1168

*          1340          *          1360          *          1380
tahA-1 : TGATTGGTAAGACCTGACATAGAGCTGTGA-----GGCCA-----ACA-CGTCCGGAA : 1369
tahA-2 : TGATTGGTAAGACCTGACATA-TGCGGTGAACGATGGCTCATTTCTACACAGCGTCCGGAG : 1227

*          1400          *          1420          *          1440
tahA-1 : CATAAGTTGTGTTACATAGCCTACTGCTAGGCCCTAACCAAGTAGTA----- : 1416
tahA-2 : CATAAGTTGTGTTGTTAGGCTACTGCAAGGTCCTAGCCAAGTAGTGATGACTTCCCAT : 1287

*          1460          *          1480          *          1500
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : AAGCATCTACGGCTTTAGAGTCGTCGGTAACTCTCGATCTCCTCCGATCCGGCCTACTC : 1347

*          1520          *          1540          *          1560
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : GCCGAGATGCCGACGCCGATACAGGCTCCGCTGATGGGACAGAGGCCGTAGACGTTGTAA : 1407

*          1580          *          1600          *          1620
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : GCGCCCAAATCTAGAAAGGGGGTCGACCCCTTTCCAGACCTAAACGGTCCGCAGA : 1467

```

```

*      1640      *      1660      *      1680
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : GGCTCGGCTAACGAGCGTCTACGTCGGGATGTGAAGCTGCCATCACCAAGTTACCATCCT : 1527

*      1700      *      1720      *      1740
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : GAGGCCACCATCATTTTCGTTTCGACCTCCGACTCAGCTGAGGTCAGCGTTCCCACACCGG : 1587

*      1760      *      1780      *      1800
tahA-1 : ----- : -
tahA-2 : CGCTTCAGTGTGTAGCGCCCAAGATACAAAAAGATACCCGGCCACTTTGATCTCCGCTCT : 1647

*      1820      *      1840      *      1860
tahA-1 : -----C : 1417
tahA-2 : AGGACTTTACGGTGACTTCAGAGCCGTAATCCTTATGGGAAGTCACCCAGTACCGCAGC : 1707

*      1880      *      1900      *      1920
tahA-1 : CGCAGCCATGCTGACTGATGAGGCTCATCGACAACGAGCTATTTCGTCGGCTTAGCTACCG : 1477
tahA-2 : CTGAGCCATGCTGACTGATGAGGCTCATCGACTCCGAGC-ATTTCGTCGGCTTAGCTACCG : 1766

*      1940      *      1960      *      1980
tahA-1 : TCGGCATTCTCCGCGCGTATCTTGGATGTGTGAGCTTGTTCGCCATTGATCACGATGG : 1537
tahA-2 : TCGGCATTCTCCGCGCGATATCTTGGATGTGTGAGCTTGTTCGCCATTGATCACGATGG : 1826

*      2000      *      2020      *      2040
tahA-1 : CGCCGTCGCCGCTGAGATAAATAACGAGCTCGGCGACATACGCACCTCCACATCTGCTGTA : 1597
tahA-2 : CGCCGTCGCCGCTGAGATAAATAACGGCTCGGCGACATACGCACCTCTACATCTGCTGTA : 1886

*      2060      *      2080      *      2100
tahA-1 : TCTCTACGTCTTCT---GCCTCCGACCCCTGCGCGTTCGATCCGTAAGTGTGCAGCT : 1654
tahA-2 : TCTCTACGACCTTCTCTGCGCTCCGACCCCTGCTCGTTCGATCCGTAAGTGTGCACCT : 1946

*      2120      *      2140      *      2160
tahA-1 : CGCAAGG-CGTGGAGGGCTTC-TTAAAGATCGATCTCCGCCGAGCCCGCCTCTTGAAC : 1712
tahA-2 : CGAAAGGGCGTAGGGGATGTCGTTGACGATCGATCTTCGCCGAGCCCGCCTCTTGAAC : 2006

*      2180      *      2200      *      2220
tahA-1 : CGATATACACCATGTTGGGTCCGCTTGCTTCTGAGGAACAAGAGAGCGGACTGACGGTC : 1772
tahA-2 : CGATATACACCATGTTGGGTCCGCTTGCTTCTGAGGAACAAGAGAGCAGACTGACGGTC : 2066

*      2240      *      2260      *      2280
tahA-1 : CGAATGCTGACAACCAGTCCGAGCACACTTACAAGTTCAACGTCAAGGTGATGACGAGTG : 1832
tahA-2 : CGAGTGTGCTGACAACCAGTCCGAGCACACTTACAAGTTCAACGTCAAGGTGATGACGAGTG : 2126

```

	*	2300	*	2320	*	2340		
tahA-1	:	ATCAGA	AGCAGCCGAGGG	AGGATGACTGAGCGGGGGGAATTATAG	ATGACCTGCACCGGA	:	1892	
tahA-2	:	ATCAGACT	CAGCCGAGGG	CGGATGACTGAGCGGGGGGAATTATAG	ATGACCTGCACCGGA	:	2186	
		*	2360	*	2380	*	2400	
tahA-1	:	TGCTCAGGCGGATTGATCGCGT	GCCTGAAGAAGAC	GGACGGTGC	GTATCTTTATCGAGCC	:	1952	
tahA-2	:	TGCTCAGGCGGATTGATCGCGT	GCCTGAAGAAGAC	TGACGGTGC	GTATCTTTATCGAGCT	:	2246	
		*	2420	*	2440	*	2460	
tahA-1	:	TCGGGAGGTT	CAGGATGGG	AGGTGACCGCGCAACGGGGGAG	GACAGGTGTCGCGGAGTAC	:	2012	
tahA-2	:	TCGGGAGGTT	CAGGATGGG	-GGT	GACCGCGCAACGGGGGAG	GACAGGTGTCGCGGAGTAC	:	2305
		*	2480	*	2500	*	2520	
tahA-1	:	GACATTAGCCTGGAGAAGCAGGAGGTGCTCGTCAAGGGCACGATTCCGTACGACGACCTT	:	2072				
tahA-2	:	GACATTAGCCTGGAGAAGCAGGAGGTGCTCGTCAAGGGCACGATTCCGTACGACGACCTT	:	2365				
		*	2540	*	2560	*	2580	
tahA-1	:	CACGCGAAGATCGCAAAGACCGGCAAGCAG	GTGGGTGTTCTTGGATAAGCGGGCGCGGCT	:	2132			
tahA-2	:	CACGCGAAGATCGCAAAGACCGGCAAGCAG	GTGGGTGTTCTTGGATAAGCGGGCGCGGCT	:	2425			
		*	2600	*	2620	*	2640	
tahA-1	:	CGCCGAGGCTCACGCAGACTCACT	TAGATCCTCTCTGGAGAGACGGTGGTATGATCGTG	:	2192			
tahA-2	:	CGCCGAGGCTCACGCAGACTCACT	CAGATCCTCTCTGGAGAGACGGTGGTATGATCGTG	:	2485			
		*	2660	*	2680	*	2700	
tahA-1	:	GCGGTTGCTATGCATCTTGCTCGACGATGGGGATGTACGAA	GCTCAGAATGTCCC	CGGTT	:	2252		
tahA-2	:	GCGGTTGCTATGCATCTTGCTCGACGATGGGGATGTACGAA	ACTCAGAATGTCCC	CGGTT	:	2545		
		*	2720	*	2740	*	2760	
tahA-1	:	TCTTGATGTGTAGGATTCA	AATTGGAAAGATAGGTTCCCGTGTTCGAAAGCGTTAAGTAC	:	2312			
tahA-2	:	TCTTGATGTGTAGGATTCA	GATTGGAAAGATAGGTTCCCGTGTTCGAAAGCGTTAAGTAC	:	2605			
		*	2780	*	2800	*	2820	
tahA-1	:	GTTGGCGAGCCGTGCGAAGCGAG	TGCAGTGATATGCGGTGAGGCGGCC	-----	:	2360		
tahA-2	:	ATTGGCGAGCCGTGCGAAGCGAG	AGCAGTGATATGCGGTGAGGCGGCC	-----	:	2665		

Abb. 7-2: Vergleich der genomischen Sequenzen von *tahA-1* und *tahA-2*. Die putativen Ace1-Bindestellen in der 5' UTR sind pink markiert. Introns sind hellblau und die kodierenden Bereiche dunkelblau dargestellt. Das Start ATG ist grün und die Stopp-Kodons rot markiert. Sequenzunterschiede zwischen den beiden cDNAs wurden orange markiert.

7.1.3 Primer für die Sequenzierung von *ctaA*

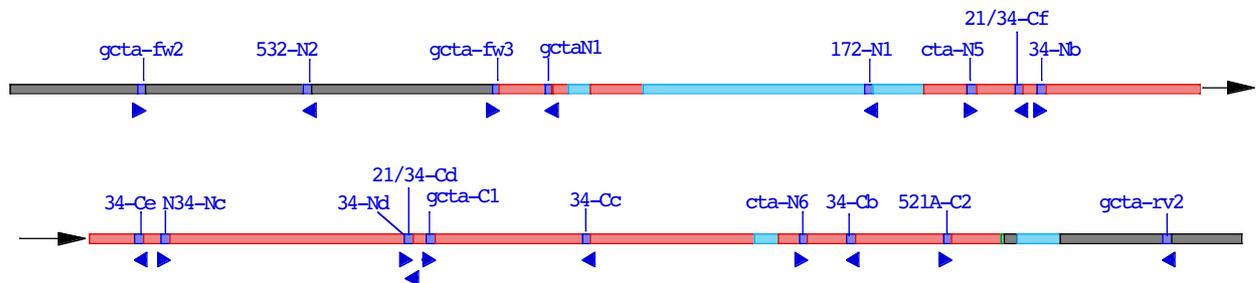


Abb. 7-3: Graphische Darstellung der Position der Sequenzprimer für das *ctaA*-Gen. Das *ctaA*-Gen ist dabei als Balken skizziert und wurde in der Mitte geteilt damit es auf die Seitenbreite passt. Die 5'- und 3'- UTR sind schwarz, die kodierenden Bereiche rot und die Introns hellblau markiert. Die Primer-Sequenzen wurden dunkelblau unterlegt, mit dem Namen versehen und die Elongationsrichtung durch einen Pfeil kenntlich gemacht.

7.1.4 Vergleich der genomischen *ctaA-1* Sequenz mit den cDNA Sequenzen von *ctaA-1* und *ctaA-2*

	*	20	*	40	*	60	*	
<i>ctaA-1</i> gen :	TACATCTTCTATATCCCTGTGGNACGCGTTGGGTGCGCTGGTGATATACCTCACCTTCGTGGAGACCAAGGGGAGG							75
<i>ctaA-1</i> cDNA :	-----							-
<i>ctaA-2</i> cDNA :	-----							-
	80	*	100	*	120	*	140	*
<i>ctaA-1</i> gen :	AACCTGGAGGAGATTGATCACATCTTCGAGGCGAAGAACCACAAAGAAAGCCAGTTTACGAGCGCAAGCGGGGCTG							150
<i>ctaA-1</i> cDNA :	-----							-
<i>ctaA-2</i> cDNA :	-----							-
	160	*	180	*	200	*	220	
<i>ctaA-1</i> gen :	AGACGTACAGATGGAATGCTGAAGTCGGGAGAAGCGGGCCGCGTATACCAGACCAGGTTGACCTAGCCAACATAC							225
<i>ctaA-1</i> cDNA :	-----							-
<i>ctaA-2</i> cDNA :	-----							-
	*	240	*	260	*	280	*	300
<i>ctaA-1</i> gen :	TTCGGAAGCTTCTTGACCTGTATACAATATACACCTGGGTCCAGCGGCTACAGTCAGTAATATTGAACTCAGCG							300
<i>ctaA-1</i> cDNA :	-----							-
<i>ctaA-2</i> cDNA :	-----							-

```

          *      320      *      340      *      360      *
ctaA-1gen : TCGGAGACATTTGACAGACGACTCACATTCAGTCGCAGTCTTGGCTCGGTATCCAAGGGTCTCTCATATGTGTC : 375
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          380      *      400      *      420      *      440      *
ctaA-1gen : GGCCCTCAAGCCACAGCTATTGGCGTGCCTGATTAGATCTTCTACACGCAGCTGCTGTTCTGTGCGCGGGTGCTT : 450
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          460      *      480      *      500      *      520
ctaA-1gen : CAAGTCTGCGTCTCACCTGCGGTCTCTGGATGATGACGCGGGTCTGACGGAGATATCACTTGAACGCACGCGG : 525
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      540      *      560      *      580      *      600
ctaA-1gen : GCGTCGGTCATCTGTGAGATTTATACATCACGGTAAACCGGGGCTAGTGTACACTGAGCTCGAGGTTCCCGGTTT : 600
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      620      *      640      *      660      *
ctaA-1gen : GCTGTCATTGTTGAATAGCGCTGTTGACATTGCATTGTCAGCACTTATGGTGGACCACATACCGAGACCGTGTTT : 675
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          680      *      700      *      720      *      740      *
ctaA-1gen : CAATATTATGTGCGCTGGTGGTGGCGCCGTTGGAACGGATCCCGCAGCCAGTTCGCGCAGTTGGCACAACCTA : 750
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          760      *      780      *      800      *      820
ctaA-1gen : GGCACAACCGTATAGTCAGCTTGACGACGTTAGAGTATGTCGCGGAGGCATATAACAGGCCACGTTGCTGCGGT : 825
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      840      *      860      *      880      *      900
ctaA-1gen : GGGTCGGCTGTGTCCAGTGCATAATGATGAAGCGTGAGAAGATATGCCCGGATTGGGACGCGCAGAAGTGCCTCA : 900
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      920      *      940      *      960      *
ctaA-1gen : GCCCCTGGAGCCGAATACCGCGGAGACGGAAAGAGGGATTGCTGCGTAAGCTCGGCCTGACTTCGCTCTCTCA : 975
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          980      *      1000      *      1020      *      1040      *
ctaA-1gen : CCTCCAGGTGCCGCCGCCGACATCCTCCGGTACCAGTGCAGGCGCTTTCATCACCCCTACCTTTCCTATTTATCT : 1050
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

```

```

          1060      *      1080      *      1100      *      1120
ctaA-1gen : CTTGACCAGGCCAGCCATGCCACCTAGGACACCCATCACCCCATCATGCGGGCCTTTCTGCCGATTC AAC : 1125
ctaA-1cDNA : -----ATGCGGGCCTTTCTGCCGATTC AAC : 27
ctaA-2cDNA : -----ATGCGGGCCTTTCTGCTGCATTTC AAC : 27

          *      1140      *      1160      *      1180      *      1200
ctaA-1gen : GGCCTCCTTGGGACTCCTCGCACGCCACCTCTGGCAAACCTGGAGCTCCCTGTGGGCGAACACGAACCTCTGGCT : 1200
ctaA-1cDNA : GGCCTCCTTGGGACTCCTCGCACGCCACCTCTGGCAAACCTGGAGCTCCCTGTGGGCGAACACGAACCTCTGGCT : 102
ctaA-2cDNA : AGCCTCCTTGGGACTCCTCGCACGCCACCTTC CGCAAACCTGGAGCTCCCTGTGGGCA AACACGAACCTCTGGCT : 102

          *      1220      *      1240      *      1260      *
ctaA-1gen : GCTGCGGGCGGGCCTGCGTCAGAGAAATGCGAGCTGAGAATCGAAGGCATGACTTGCGGAGCATGCGTCGAGGTG : 1275
ctaA-1cDNA : GCTGCGGGCGGGCCTGCGTCAGAGAAATGCGAGCTGAGAATCGAAGGCATGACTTGCGGAGCATGCGTCGAG--- : 174
ctaA-2cDNA : GCTGCGGGCGGGCCTGCATCAGAGAAATGCGAGTTGAGGATCGAGGGCATGACTTGCGGAGCATGCGTCGAG--- : 174

          1280      *      1300      *      1320      *      1340      *
ctaA-1gen : TGTGTTTCCCCGCGTTGATGATCGGCATTCGCTGAGCGTGCGACAGTCTATAGAGGGTATGCTGCGTACACAAC : 1350
ctaA-1cDNA : -----TCTATAGAGGGTATGCTGCGTACACAAC : 202
ctaA-2cDNA : -----TCTATAGAGGGTATGCTGCGTACACAAC : 202

          1360      *      1380      *      1400      *      1420
ctaA-1gen : CCGGCATACAGTCGGTCAAGGTCGCGCTACTCGCGGAACGGGGCGTAGTGAATACGATCCAGCCGTTTGGGATG : 1425
ctaA-1cDNA : CCGGCATACAGTCGGTCAAGGTCGCGCTACTCGCGGAACGGGGCGTAGTGAATACGATCCAGCCGTTTGGGATG : 277
ctaA-2cDNA : CCGGCATACAGTCGGTCAAGGTCGCGCTACTCGCGGAACGGGGCGTAGTGAATACGACCAGCCGTTTGGGATG : 277

          *      1440      *      1460      *      1480      *      1500
ctaA-1gen : CAGACAAGATCATCGGGGTGAGTCTTCAACCTATAGCTCAACACTTGGTTACCCCTTTACGATATGCGGCACAC : 1500
ctaA-1cDNA : CAGACAAGATCATCGGG----- : 295
ctaA-2cDNA : CGGACAAGATCATCGGG----- : 295

          *      1520      *      1540      *      1560      *
ctaA-1gen : TTCCCGCAGCGGTTACGGACTGCACCTGGCAAGTGAAGAAAACCTGGACCTCTTGGCGGCTACTCTGCCACAGAT : 1575
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          1580      *      1600      *      1620      *      1640      *
ctaA-1gen : AGAGTTGCCCGGGGAGTGCCGTATCCCTCCCTCTCGCTGGACAGCGTTGGACGGGTTATTAATAGCGCGCGA : 1650
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          1660      *      1680      *      1700      *      1720
ctaA-1gen : CGTCCGTCTAGCTGCCAGCGTGACTAGTGCACATGTTGCAGAAAGTCTGATCCTCTGGCGCAAGTGTTCGGCGG : 1725
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      1740      *      1760      *      1780      *      1800
ctaA-1gen : AACACATCCCGTTCCACGGAACGAGTAGAAGTACCAGGTCGCCAATCAGTTGGTAGGCCCTCACGACAGGCTTTG : 1800
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

```

```

*      1820      *      1840      *      1860      *
ctaA-1gen : CGAGGCGTACGGTFCGCATCTTGCCTCGAAAACGTCCTGTGCCTTGAACAAGTTGTTCTGCGGAGCATGTCTGTGC : 1875
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

      1880      *      1900      *      1920      *      1940      *
ctaA-1gen : AGTGTGCTTCGCAGGACAGCGGTATGACCACAATAGTACGCAGTGTCCGTGTTCCCGCGCTGGCCGCATAGCCG : 1950
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

1960      *      1980      *      2000      *      2020
ctaA-1gen : TACCCCAATGTGCTATATAGTTCGTCATTTTCGCACGTTATAGCCGCGTTCGATAGACGGGACGCCGCTCTGT : 2025
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

*      2040      *      2060      *      2080      *      2100
ctaA-1gen : TATATTTCCCCACTCGAAATAGCCATAGCCTCCTGGAATTGCATCGCTGACGTCTTCATAGGAAATATCTGACAT : 2100
ctaA-1cDNA : -----GAAATATCTGACAT : 308
ctaA-2cDNA : -----GAAATATCTGACAT : 308

*      2120      *      2140      *      2160      *
ctaA-1gen : AGGTTTCGATGCTACTCTCATAACCCCAACACGCGCGGATGCCATCACCTTCGCATATACGGGATGACATGTTC : 2175
ctaA-1cDNA : AGGTTTCGATGCTACTCTCATAACCCCAACACGCGCGGATGCCATCACCTTCGCATATACGGGATGACATGTTC : 383
ctaA-2cDNA : AGGTTTTCGATGCTACTCTCATAACCCCAACACGCGCGGATGCCATCACCTTCGCATATACGGGATGACATGTTC : 383

      2180      *      2200      *      2220      *      2240      *
ctaA-1gen : ATCATGCACATCAACGGTAGAGACGCAACTGGGGGCAATGCCCGGAGTCACCAGCGTCGCCGCTCTCGCTCGCTAC : 2250
ctaA-1cDNA : ATCATGCACATCAACGGTAGAGACGCAACTGGGGGCAATGCCCGGAGTCACCAGCGTCGCCGCTCTCGCTCGCTAC : 458
ctaA-2cDNA : ATCATGCACATCAACGGTAGAGACGCAACTGGGGGCAATGCCCGGAGTCACCAGCGTCGCCGCTCTCGCTCGCTAC : 458

      2260      *      2280      *      2300      *      2320
ctaA-1gen : AGAGACCTGCAAAGTAGAGTTCGACAGGACAATGGTCGGGCCTCGGGAGCTGGTAGAACGGATAGAAGAGATGGG : 2325
ctaA-1cDNA : AGAGACCTGCAAAGTAGAGTTCGACAGGACAATGGTCGGGCCTCGGGAGCTGGTAGAACGGATAGAAGAGATGGG : 533
ctaA-2cDNA : AGAGACCTGCAAAGTAGAGTTCGACAGGACAATGGTCGGGCCTCGGGAGCTGGTAGAACGGATAGAAGAGATGGG : 533

*      2340      *      2360      *      2380      *      2400
ctaA-1gen : ATTCGACGCCATGGTCTCCGATCAAGAAGACGCGACTCAGCTGCGATCGCTCACCCGGACGAAGGAGATCCAGGA : 2400
ctaA-1cDNA : ATTCGACGCCATGGTCTCCGATCAAGAAGACGCGACTCAGCTGCGATCGCTCACCCGGACGAAGGAGATCCAGGA : 608
ctaA-2cDNA : ATTCGACGCCATGGTCTCCGATCAAGAAGACGCGACTCAGCTGCGATCGCTCACCCGGACGAAGGAGATCCAGGA : 608

*      2420      *      2440      *      2460      *
ctaA-1gen : ATGGCGGTCACGCTTCCAGTGGAGTCTTGCCCTTCGCGATTCCGGTCTTCTTCGTCACTATGATCGCGCCGAAGAT : 2475
ctaA-1cDNA : ATGGCGGTCACGCTTCCAGTGGAGTCTTGCCCTTCGCGATTCCGGTCTTCTTCGTCACTATGATCGCGCCGAAGAT : 683
ctaA-2cDNA : ATGGCGGTCACGCTTCCAGTGGAGTCTTGCCCTTCGCGATTCCGGTCTTCTTCGTCACTATGATCGCGCCGAAGAT : 683

      2480      *      2500      *      2520      *      2540      *
ctaA-1gen : CCCCTTCTTGCGCCGATTGTTCGAGTACCAGCTGTGCCGCGGCATCTACGTCAGTGACGTCGTGGCGTTTTCATTCT : 2550
ctaA-1cDNA : CCCCTTCTTGCGCCGATTGTTCGAGTACCAGCTGTGCCGCGGCATCTACGTCAGTGACGTCGTGGCGTTTTCATTCT : 758
ctaA-2cDNA : CCCCTTCTTGCGCCGATTGTTCGAGTACCAGCTGTGCCGCGGCATCTACGTCAGTGACGTCGTGGCGTTTTCATTCT : 758

```

2560 * 2580 * 2600 * 2620
 ctaA-1gen : TACGACCCCGGCTCTGTTCTGGCTTGGACAGAAGTTCTACCGAACCGGTACAAGTCGCTGAAGCACGGGAGCGC : 2625
 ctaA-1cDNA : TACGACCCCGGCTCTGTTCTGGCTTGGACAGAAGTTCTACCGAACCGGTACAAGTCGCTGAAGCACGGGAGCGC : 833
 ctaA-2cDNA : TACGACCCCGGC^GTGTTCTGGCT^CGGACAGAAGTTCTACCGAACCGGTACAAGTCGCTGAAGCACGGGAGCGC : 833

* 2640 * 2660 * 2680 * 2700
 ctaA-1gen : CACCATGGACGTGCTCATCGCCATTGGGACGTCGTCGCGGTACATATACTCCATCGGCGCCATGTGCTTTGCGGC : 2700
 ctaA-1cDNA : CACCATGGACGTGCTCATCGCCATTGGGACGTCGTCGCGGTACATATACTCCATCGGCGCCATGTGCTTTGCGGC : 908
 ctaA-2cDNA : CACT^TATGGACGTGCTCATCGCCAT^CGGGACGTCGTCGCGGTACAT^CTACTCCAT^AGGCG^GATGTGCTT^CGCC^CGC : 908

* 2720 * 2740 * 2760 *
 ctaA-1gen : GTACAACCGGGAGCTGGACTATCACCCCATGGTCTTCTTCGACACTAGCACGATGCTGATCATGTTCTGTGTCGCT : 2775
 ctaA-1cDNA : GTACAACCGGGAGCTGGACTATCACCCCATGGTCTTCTTCGACACTAGCACGATGCTGATCATGTTCTGTGTCGCT : 983
 ctaA-2cDNA : GTACAACCGGGAGCTGGACTATCACCCCATGGT^ATTCTTCGAC^CAGCACGATGCTGATCATGTTCTGTG^CACT : 983

2780 * 2800 * 2820 * 2840 *
 ctaA-1gen : CGGCCGATACCTGGAGAACC^GGGCGAAGGGCAAGACGAGCGCCGCGT^GACTGATCTCATGGCGCT^TGCTCCGTC : 2850
 ctaA-1cDNA : CGGCCGATACCTGGAGAACC^GGGCGAAGGGCAAGACGAGCGCCGCGT^GACTGATCTCATGGCGCT^TGCTCCGTC : 1058
 ctaA-2cDNA : ^GGGCCG^TACCT^CGAGAACC^GGGCGAAGGGCAAGACGAGCGCCGCGT^GACTGATCTCATGGCGCT^TGCTCCGTC : 1058

2860 * 2880 * 2900 * 2920
 ctaA-1gen : TATGGCGACAATCTACACCGACGCTCCGCGGTGCACGCAGGAGAAGAAGATCCCCACGGAGCTGGTCTCGGTCCG : 2925
 ctaA-1cDNA : TATGGCGACAATCTACACCGACGCTCCGCGGTGCACGCAGGAGAAGAAGATCCCCACGGAGCTGGTCTCGGTCCG : 1133
 ctaA-2cDNA : TATGGCGACAATCTACACCGACGCTCCGCGGTGCACGCAGGAGAAGAAGAT^CCCACGGAGCTGGT^CCA^AGTCCG : 1133

* 2940 * 2960 * 2980 * 3000
 ctaA-1gen : CGACACGGTGA^AACTCGTGCC^TGGCGACAAGGT^CCCCGCGGACGGCACTGT^CTGCGTGGGACCTCCACCGT^GGA : 3000
 ctaA-1cDNA : CGACACGGTGA^AACTCGTGCC^TGGCGACAAGGT^CCCCGCGGACGGCACTGT^CTGCGTGGGACCTCCACCGT^GGA : 1208
 ctaA-2cDNA : CGACACGGTGA^AACTCGTGCC^TGGCGACAAGGT^CCCCGCGGACGGCACTGT^GCTGCGTGGGACCTCCAC^AGT^GGA : 1208

* 3020 * 3040 * 3060 *
 ctaA-1gen : CGAGAGCGCAGTCACGGGCGAGCCAGTCCCTGTGCTCAAGCAGATCGGAGACAGCGTCATTGGAGGCACCGTCAA : 3075
 ctaA-1cDNA : CGAGAGCGCAGTCACGGGCGAGCCAGTCCCTGTGCTCAAGCAGATCGGAGACAGCGTCATTGGAGGCACCGTCAA : 1283
 ctaA-2cDNA : CGAGAGCGC^CGT^TACGGGCGAGCC^GTCC^CGTGCTCAAGCAGATCGGAGACAGCGTCAT^CGGAG^TACCGTCAA : 1283

3080 * 3100 * 3120 * 3140 *
 ctaA-1gen : CGGGCTCGGGACGTTTCGACATGGTCGTCACGCGCGCCGGGAAGGACACCGCGCTCGCGCAGATCGTGAAGCTGGT : 3150
 ctaA-1cDNA : CGGGCTCGGGACGTTTCGACATGGTCGTCACGCGCGCCGGGAAGGACACCGCGCTCGCGCAGATCGTGAAGCTGGT : 1358
 ctaA-2cDNA : CGGGCTCGGGAC^ATTTCGACATGGTCGTC^ATCGCGCGGGAA^AAGACACCGCGCTCGCGCAGAT^TGTGAAGCT^CGT : 1358

3160 * 3180 * 3200 * 3220
 ctaA-1gen : CGAGGACGCGCAGACGTCGAAGGCGCCGATCCAGGAGTTCGCGGACAAGGTCGCGGGTACTTCGTGCCGATGGT : 3225
 ctaA-1cDNA : CGAGGACGCGCAGACGTCGAAGGCGCCGATCCAGGAGTTCGCGGACAAGGTCGCGGGTACTTCGTGCCGATGGT : 1433
 ctaA-2cDNA : CGAGGACGCGCAGACGTCGAAGGCGCCGATCCAGGAGTTCGCGGACAAGGTCGCGG^AATACTTCGTGCCGATGGT : 1433

* 3240 * 3260 * 3280 * 3300
 ctaA-1gen : CATCTCGCTCTCGCTCATCACCTTCGCGGTGTGGATGGTGTATCTCGCACGTCGTCGACGAGAACCGCGCTCCCCGC : 3300
 ctaA-1cDNA : CATCTCGCTCTCGCTCATCACCTTCGCGGTGTGGATGGTGTATCTCGCACGTCGTCGACGAGAACCGCGCTCCCCGC : 1508
 ctaA-2cDNA : CATCTCGCTCTCGCTCATCACCT^TGCGGTGTGGATGGT^CAT^TTCGCACGTCGTCGACGAGAACCGCGCTCCCCGC : 1508

```

*      3320      *      3340      *      3360      *
ctaA-1gen : GCTGTTCCACAAGCACGGTGCCTCGAAGCTCGGATCTGCTTGCAGCTGTGCATCTCCGTCGTCGGTTCGCGTG : 3375
ctaA-1cDNA : GCTGTTCCACAAGCACGGTGCCTCGAAGCTCGGATCTGCTTGCAGCTGTGCATCTCCGTCGTCGGTTCGCGTG : 1583
ctaA-2cDNA : GCTGTTCCACAAGCACGGCGCGCTTAAGCTCGGATCTGTCTCCAAGTGTGCATCTCCGTCGTCGGTTCGCGTG : 1583

3380      *      3400      *      3420      *      3440      *
ctaA-1gen : CCCGTGTGCGCTTGGGCTGAGCACGCCGACCGCGATTATGGTCGGGACCGGGATGGGCGCGAAGAACGGGATCCT : 3450
ctaA-1cDNA : CCCGTGTGCGCTTGGGCTGAGCACGCCGACCGCGATTATGGTCGGGACCGGGATGGGCGCGAAGAACGGGATCCT : 1658
ctaA-2cDNA : CCCGTGCGCGCTCGGACTGAGCACGCCGACCGCGATCATGGTCGGCACCGGGATGGGGCGAAGAACGGGATCCT : 1658

3460      *      3480      *      3500      *      3520
ctaA-1gen : GATCAAGGGCGGGCGCGCTCGAGGCGAGTCGATTTATCAAGCGGATCGCTCTCGACAAGACGGGCACGGTCAC : 3525
ctaA-1cDNA : GATCAAGGGCGGGCGCGCTCGAGGCGAGTCGATTTATCAAGCGGATCGCTCTCGACAAGACGGGCACGGTCAC : 1733
ctaA-2cDNA : GATCAAGGGCGGACGTGCGCTCGAGGCAAGCCGGTTCATCAAGCGGATCGCGCTCGACAAGACGGGCACGGTCAC : 1733

*      3540      *      3560      *      3580      *      3600
ctaA-1gen : CGAGGGCAAGCTCACTGTGCGGGCGCTCACGTGGGCGCCCTCGAGCGACCACAGCGACCTGCACAGCTACGCGAC : 3600
ctaA-1cDNA : CGAGGGCAAGCTCACTGTGCGGGCGCTCACGTGGGCGCCCTCGAGCGACCACAGCGACCTGCACAGCTACGCGAC : 1808
ctaA-2cDNA : CGAGGGCAAGCTCACCGTCCGCGGCGCTCGCATGGGCGCCCTCGAGCGACCACAGCGACCTACACAGCTACGCGAC : 1808

*      3620      *      3640      *      3660      *
ctaA-1gen : TGACGGTGACGTCCTCCGCTGACCACGAAGTGTGTGCGGAACGCCACGCGCGGGACGTCATCGCAATGGTTCGCGGC : 3675
ctaA-1cDNA : TGACGGTGACGTCCTCCGCTGACCACGAAGTGTGTGCGGAACGCCACGCGCGGGACGTCATCGCAATGGTTCGCGGC : 1883
ctaA-2cDNA : CGACGGCGACGTTCCGCTGACCACGAAGTGTGTGCGGAACGCCACGCGCGCAGACGTCATTGCAATGGTTCGCGGC : 1883

3680      *      3700      *      3720      *      3740      *
ctaA-1gen : GACTGAGGCACGCTCAGAGCACCCGCTCGCGAAGGCGGTTCGCGGTGCACGGCAAGGAGCTGCTGAACAAGTCGAT : 3750
ctaA-1cDNA : GACTGAGGCACGCTCAGAGCACCCGCTCGCGAAGGCGGTTCGCGGTGCACGGCAAGGAGCTGCTGAACAAGTCGAT : 1958
ctaA-2cDNA : GACGGAGGCAGCTTCGGAGCACCCGCTTTCGCAAGGCGGTTCGCGGTGCACGGCAAGGAGCTGCTCAACAAGTCGAT : 1958

3760      *      3780      *      3800      *      3820
ctaA-1gen : GGTGCCCATCCCGGAGGTCGTGATTCACACGTTTCGAGAGCGTCACCGCGCGGGTGTGAAAGCCGAGATCGGGCT : 3825
ctaA-1cDNA : GGTGCCCATCCCGGAGGTCGTGATTCACACGTTTCGAGAGCGTCACCGCGCGGGTGTGAAAGCCGAGATCGGGCT : 2033
ctaA-2cDNA : GGTGCCCATCCCGGAGGTCGTGATCCAGACGTTTCGAGAGCGTCACCGGTGCAGGTGTCAAGGCCGAGATCGCGCT : 2033

*      3840      *      3860      *      3880      *      3900
ctaA-1gen : CCCGGGCGGCAAGGGCCAGTGCACGCTATTCGTCGGAAATGCACGCTTCATCCTGCAGACCGGCGACGCGCAGCT : 3900
ctaA-1cDNA : CCCGGGCGGCAAGGGCCAGTGCACGCTATTCGTCGGAAATGCACGCTTCATCCTGCAGACCGGCGACGCGCAGCT : 2108
ctaA-2cDNA : CCCCGGCGGCAAGGGCCAATGCACGCTCTTCGTCGGCAATGCGCGCTTCATCCTGCAGACCGGCGACGCGCAGCT : 2108

*      3920      *      3940      *      3960      *
ctaA-1gen : CCCGTCCGCGCTCGCGGCTTCGACTCGGAGGAGTCGACCGCGGCGCCACGTCCATCTTCGTCTCGATCTCGAC : 3975
ctaA-1cDNA : CCCGTCCGCGCTCGCGGCTTCGACTCGGAGGAGTCGACCGCGGCGCCACGTCCATCTTCGTCTCGATCTCGAC : 2183
ctaA-2cDNA : CCCGTCCGCGCTCGCGGCTTCGACTCGGAGGAGTCGACCGCGGCGCCACGTCCATCTTCGTCTCGATCTCGAC : 2183

3980      *      4000      *      4020      *      4040      *
ctaA-1gen : GTCTGGCAAGCCCGCGGTGCCATTCTAGCGATCGCGCTCGCGGACGCGCCGAGGCCGTCGTCGATACATGCGAT : 4050
ctaA-1cDNA : GTCTGGCAAGCCCGCGGTGCCATTCTAGCGATCGCGCTCGCGGACGCGCCGAGGCCGTCGTCGATACATGCGAT : 2258
ctaA-2cDNA : GTCTGGCAAGCCCGCGGTGCCATTCTAGCGATCGCGCTTCGGATGCGCCGAGGCCGTCGTCGATACATGCGAT : 2258

```

```

          4060      *      4080      *      4100      *      4120
ctaA-1gen : CAGGGCGCTGCAGAACATGGGTATTGAGGTGAACATGCTCACGGGCGACGCAAAGGCGACGGCGCTCGCTGTTGC : 4125
ctaA-1cDNA : CAGGGCGCTGCAGAACATGGGTATTGAGGTGAACATGCTCACGGGCGACGCAAAGGCGACGGCGCTCGCTGTTGC : 2333
ctaA-2cDNA : CAGGGCGCTGCAGAACATGGGCATCGAGGTGAACATGCTCACGGGCGACGCGAAGGCGACC GCGCTCGCTGTTGC : 2333

          *      4140      *      4160      *      4180      *      4200
ctaA-1gen : GAAGCAGGTCGGGATCAAGCCGGAGAACGTGTGGGCGAGCATGAGCCCGAAGGGCAAGGCGTCGGTTCGTGACTGA : 4200
ctaA-1cDNA : GAAGCAGGTCGGGATCAAGCCGGAGAACGTGTGGGCGAGCATGAGCCCGAAGGGCAAGGCGTCGGTTCGTGACTGA : 2408
ctaA-2cDNA : GAAGCAGGTCGGGATCAAGCCGGAGAACGTGTGGGCGAGCATGAGCCCGAAGGGCAAGGCGTCGGTTCGTGACTGCGA : 2408

          *      4220      *      4240      *      4260      *
ctaA-1gen : GCTCATGGAGAAGTACGGTGGCGGCGTGGCTATGTTGCGTACTGTCCTCTCTCAACCTTTCTGTGCGTCTGCTGA : 4275
ctaA-1cDNA : GCTCATGGAGAAGTACGGTGGCGGCGTGGCTATG----- : 2444
ctaA-2cDNA : GCTCATGGAGAAATACGGCGGCGGCGTGGCTATG----- : 2444

          4280      *      4300      *      4320      *      4340      *
ctaA-1gen : CTGAAAGCGCAGGTCGGAGACGGCATCAACGACTCCCCATCCCTCGTCGCCGCATCCGTTCGGTATTGCTCTGTCA : 4350
ctaA-1cDNA : -----GTCGGAGACGGCATCAACGACTCCCCATCCCTCGTCGCCGCATCCGTTCGGTATTGCTCTGTCA : 2505
ctaA-2cDNA : -----GTCGGAGACGGTATCAACGACTCTCCATCCCTCGTCGCTGCGTCCGTTCGGTATTGCTCTGTCA : 2505

          4360      *      4380      *      4400      *      4420
ctaA-1gen : TCCGGCACCTCCGTGGCGATCGAGGCGGCGGACATCGTGCATGCGCTCCGACCTGCTCGACGTCGTTCGCCGCC : 4425
ctaA-1cDNA : TCCGGCACCTCCGTGGCGATCGAGGCGGCGGACATCGTGCATGCGCTCCGACCTGCTCGACGTCGTTCGCCGCC : 2580
ctaA-2cDNA : TCCGGAACCTCCGTTCGGATCGAGGCGGCGGACATCGTGCATGCGCTCCGACCTGCTCGACGTCGTTCGCCGCC : 2580

          *      4440      *      4460      *      4480      *      4500
ctaA-1gen : CTGCACCTCTCGCGCGGATCTTACGACGATCCGGCGCAACCTCGTCTGGGCGTGTCTTACAACGTGCTCGGC : 4500
ctaA-1cDNA : CTGCACCTCTCGCGCGGATCTTACGACGATCCGGCGCAACCTCGTCTGGGCGTGTCTTACAACGTGCTCGGC : 2655
ctaA-2cDNA : CTGCACCTCTCGCGCGGATCTTCCGGACGATCCGGCGCAACCTCGTCTGGGCGTGCCTGTACAACGTGCTCGGC : 2655

          *      4520      *      4540      *      4560      *
ctaA-1gen : ATCCCGCTCGCGATGGGCTTCTTCTCCCGTTGGCGTGAGCTGCCCGGATGGGCGCCGCGCCGCGATGGCG : 4575
ctaA-1cDNA : ATCCCGCTCGCGATGGGCTTCTTCTCCCGTTGGCGTGAGCTGCCCGGATGGGCGCCGCGCCGCGATGGCG : 2730
ctaA-2cDNA : ATCCCGCTCGCGATGGGCTTCTTCTCCCGTTGGCGTGAGCTGCCCGGATGGGCGCCGCGCGCGATGGCG : 2730

          4580      *      4600      *      4620      *      4640      *
ctaA-1gen : TTCTCGTCCGTGAGCGTCGTGACGAGCTCGCTCGCGCTGAAGTGGTGGGTGCGCCCGGCGGAGAGTCTGATGCC : 4650
ctaA-1cDNA : TTCTCGTCCGTGAGCGTCGTGACGAGCTCGCTCGCGCTGAAGTGGTGGGTGCGCCCGGCGGAGAGTCTGATGCC : 2805
ctaA-2cDNA : TTCTCGTCCGTGAGCGTCGTGACGAGCTCGCTCGCGCTGAAGTGGTGGGTGCGCCCGCAGGAGAGCTGATGCC : 2805

          4660      *      4680      *      4700      *      4720
ctaA-1gen : GGGGAGAGCGTGCAGCACGAGACGATGTTTCGACAGCGCGGGAGGCGGTTTCGCGATGCGTGGGAGTTCGGTGC : 4725
ctaA-1cDNA : GGGGAGAGCGTGCAGCACGAGACGATGTTTCGACAGCGCGGGAGGCGGTTTCGCGATGCGTGGGAGTTCGGTGC : 2880
ctaA-2cDNA : GGGGAGAGCGTGCAGCACGAGACGATGTTTCGACAGCGCGGGAGACGGTTCGGGACGCGTGGGACTCGGTGCGG : 2880

          *      4740      *      4760      *      4780      *      4800
ctaA-1gen : GGCCTGGTGGGCTCGCGGCGGATGTGTCGGGGTACAGCCAGCTGCCGGTGGAGATGAGCGAGGCTGTATGATAG : 4800
ctaA-1cDNA : GGCCTGGTGGGCTCGCGGCGGATGTGTCGGGGTACAGCCAGCTGCCGGTGGAGATGAGCGAGGCTGTATGATAG : 2955
ctaA-2cDNA : GGCCTGGTGGGCTCGCGGCGGATGTGTCGGGGTACAGCCAGCTGCCGGTGGAGATGAGCGAGGCTGTATGATAGT : 2955

```

```

          *      4820      *      4840      *      4860      *
ctaA-1gen : GTTCAGACTGGGGTCCGGCGTCGGACGGTCCGTGTGCTCGCTCGTTTTGCGTCTCGATCTAACTTACTTAGTAT : 4875
ctaA-1cDNA : GTTCAGACTGGGGTCCGGCGTCGGACGGTCCGTGTGCTCGCTCGTTTTGCGTCTCGATCTAACTTACTTAGTAT : 3030
ctaA-2cDNA : GGTATG-----GGTCCGGCGTCGGACGGTCCGTGTGCTCGCTCGTTTTGCGTCTCGATCTAACTTACTTAGTAT : 3025

          4880      *      4900      *      4920      *      4940      *
ctaA-1gen : CTGGTGTGCGTTTCGACCTTCTTGGTTTGCATGATGTAATTTTACCTGCTGCAGTTGGAATATTGGAAGTATCGAT : 4950
ctaA-1cDNA : CTGGTGTGCGTTTCGACCTTCTTGGTTTGCATGATGTAATTTTACCTGCTGCAGTTGGAATATTGGAAGTATCGAT : 3105
ctaA-2cDNA : CTGGTGTTCGTTTCGACCTTCTTGGTTTGCATGATGTAATTTTACCTGCTGCAGTTGGAAT---GGAAGTATCGAT : 3097

          4960      *      4980      *      5000      *      5020
ctaA-1gen : AATTGTGAACCGAGTTAATCGTGACCGGTACCCCGTTCAATCCGCGGGGTGTGGGGTGTGTGGTGGACCGT : 5025
ctaA-1cDNA : AAAAAAAAAAAAAA----- : 3120
ctaA-2cDNA : AATTGTGAACCGACCGCGAGT-TCATCGCGCGCTTACCCTGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA : 3171

          *      5040      *      5060      *      5080      *      5100
ctaA-1gen : GGGCGACCATATTGCGCTCGCGAGCCTTGAGGTGCAGGCGCTAAAGCGCCTGACACGACCCACGTGAGCCGGCGT : 5100
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : AAAAAA----- : 3178

          *      5120      *      5140      *      5160      *
ctaA-1gen : ACCGCGCTCTGCACCGCGAGTTTGGAGCTGCACCTTCGTCTTACCACGACGGCGTTGAAGGTGAGTACGAA : 5175
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          5180      *      5200      *      5220      *      5240      *
ctaA-1gen : TATTCCTGCTCAAAGTCACACGGGATGTTCAACTTCGCACCTAACATCACCCGCAAGTAGCTCGACATGGCGATAC : 5250
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          5260      *      5280      *      5300      *      5320
ctaA-1gen : CGGCAGTATTCTATCACGACGACTGAGTGACATCGACACCGTCATAATAGTATCATACAGTCCCAACGATAGCGG : 5325
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

          *      5340      *      5360      *      5380      *      5400
ctaA-1gen : TCAGTAGCACAGTGC----- : 5340
ctaA-1cDNA : ----- : -
ctaA-2cDNA : ----- : -

```

Abb. 7-4: Vergleich zwischen der genomischen *ctaA-1* Sequenz mit der cDNA von *ctaA-1* und der cDNA von *ctaA-2*. Die 3'- und 5'-UTR sind pink, Introns hellblau und die kodierenden Bereiche dunkelblau dargestellt. Das Start ATG ist grün und die Stopp-Kodons rot markiert. Die putativen Polyadenylierungssignale wurden gelb gekennzeichnet. Sequenzunterschiede zwischen den beiden cDNAs wurden orange markiert.

7.2 Klonierungen und Vektoren

7.2.1 Laccase-Expressionsvektor für Hefe (pLacP2)

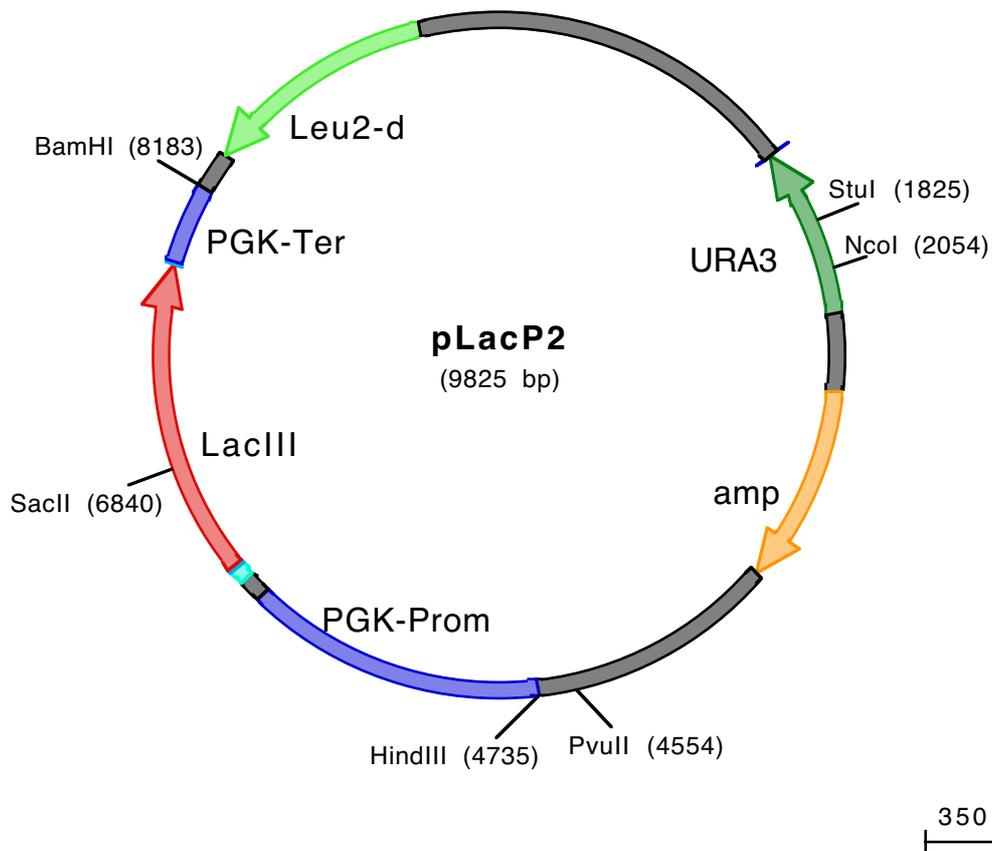


Abb. 7-5: Laccase III Expressions-Plasmid für Hefe. Das Laccase-III-Gen (rot) steht unter der Kontrolle des Phosphoglyceratkinase Promotors (blau). Die Markergene für Hefe sind grün, das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

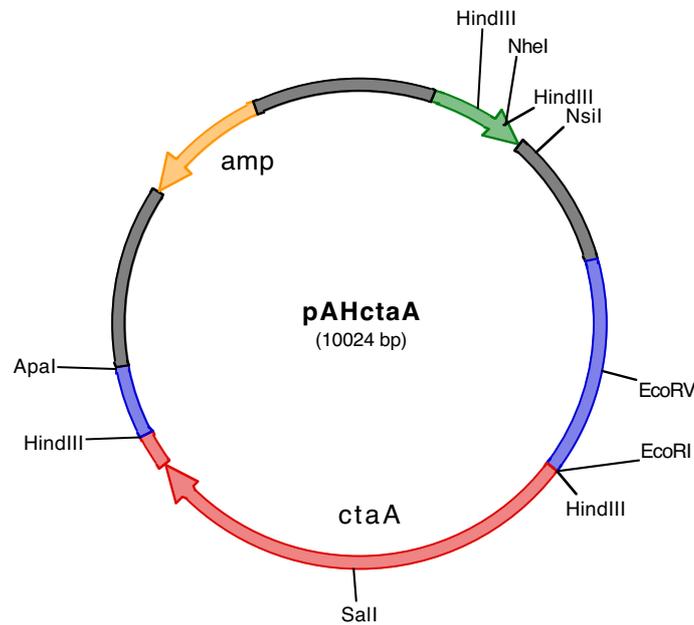
7.2.2 Vektoren für *tahA*- und *ctaA*-Expression in *S. cerevisiae*

Abb. 7-6: *ctaA*-Expressions-Plasmid für Hefe. Das *ctaA*-Gen (rot) steht unter der Kontrolle des ADH-Promotors (blau). Das Markergen (*HIS3*) für Hefe ist grün, das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

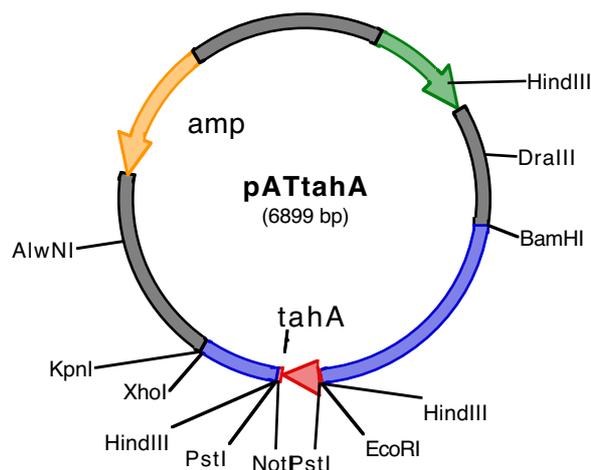


Abb. 7-7: *tahA*-Expressions-Plasmid für Hefe. Das *tahA*-Gen (rot) steht unter der Kontrolle des ADH-Promotors (blau). Das Markergen für Hefe (*TRP1*) ist grün, das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

7.2.3 Vektoren für *cupA*- und *cupB*-Expression in *S. cerevisiae*

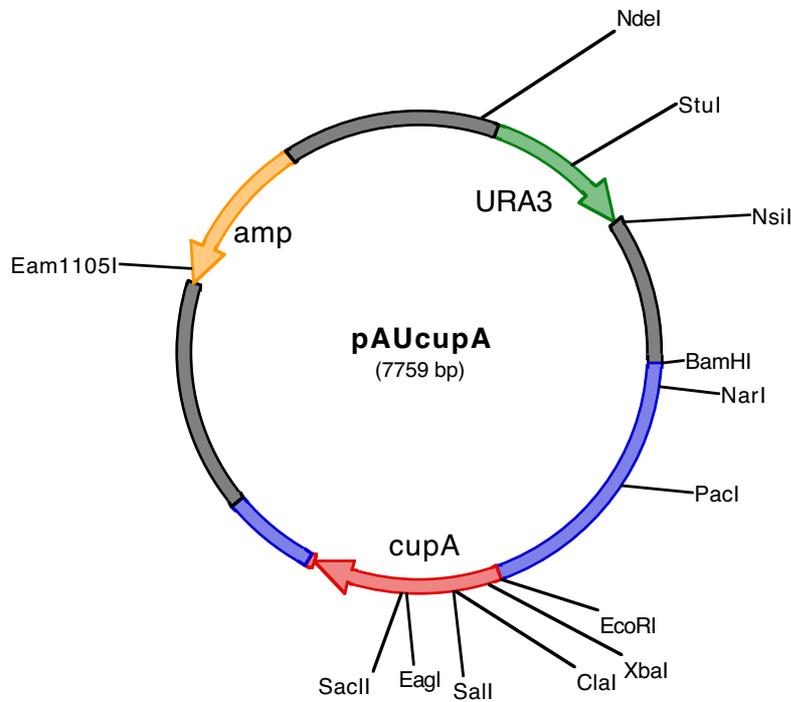
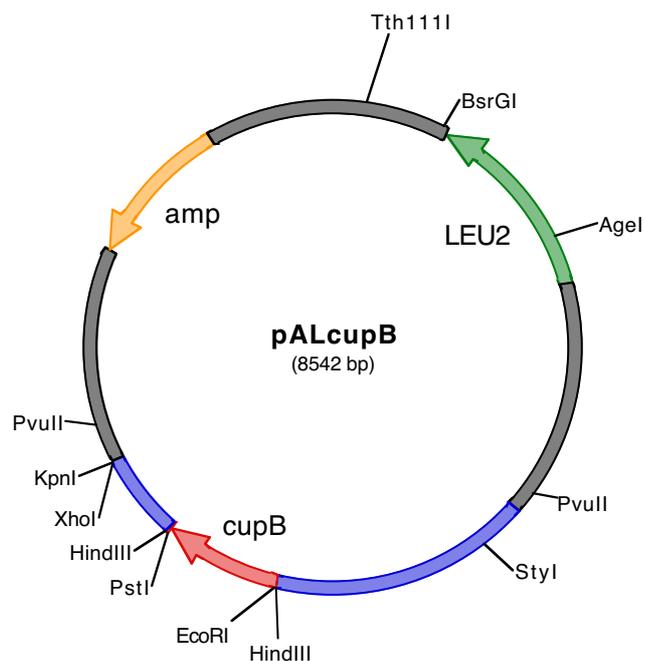


Abb. 7-8: *cupA*-Expressions-Plasmid für Hefe. Das *cupA*-Gen (rot) steht unter der Kontrolle des ADH-Promotors (blau). Das Markergen (*URA3*) für Hefe ist grün, das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

Abb. 7-9: *cupB*-Expressions-Plasmid für Hefe. Das *cupB*-Gen (rot) steht unter der Kontrolle des ADH-Promotors und des ADH-Terminators (blau). Das Markergen (*LEU2*) für Hefe ist grün, das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.



7.2.4 Klonierung der cDNA Banken in pJG4-5, pAH und pAT

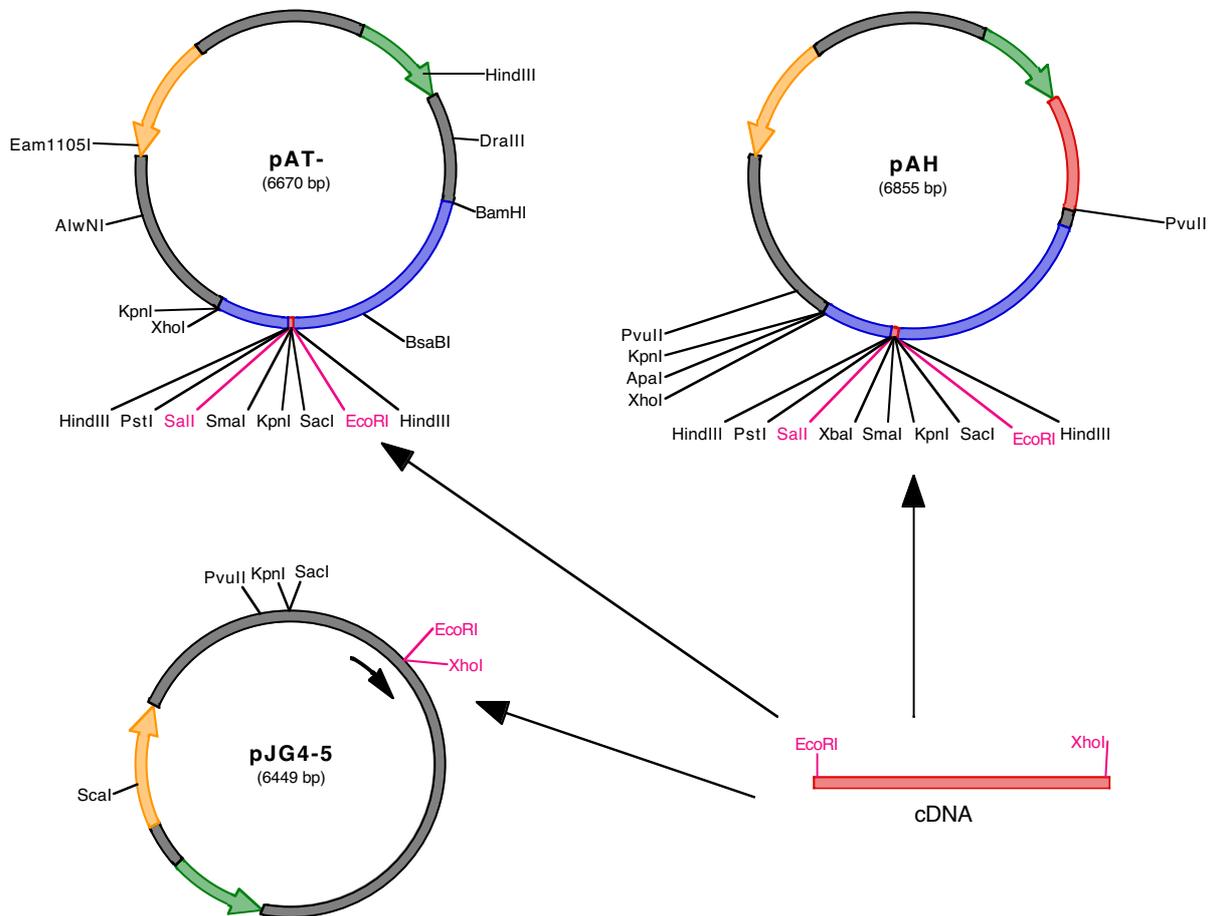


Abb. 7-10: Klonierung der cDNA Banken. Die aus der mRNA synthetisierten cDNA Fragmente wurden in die Vektoren pJG4-5, pAH und pAT über die pink markierten Schnittstellen kloniert. Die Markergene für Hefe (pAH / pJG4-5 = *HIS3* und pAT=*TRP1*) sind grün das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

7.2.5 Karte des Vektors pCR2.1gcta

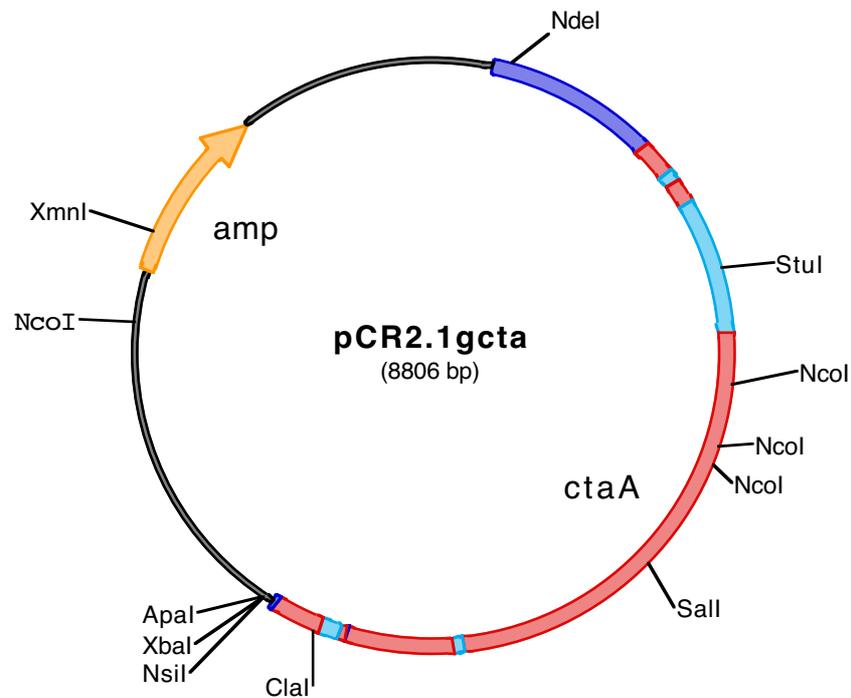


Abb. 7-11: Karte des pCR2.1gcta Vektors. Die genomische DNA von *ctaA* wurde von der 5'-UTR bis zur 3'-UTR (dunkelblau) durch PCR amplifiziert und in pCR2.1 kloniert. Die kodierenden Bereiche sind rot und die Introns hellblau dargestellt. Das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert.

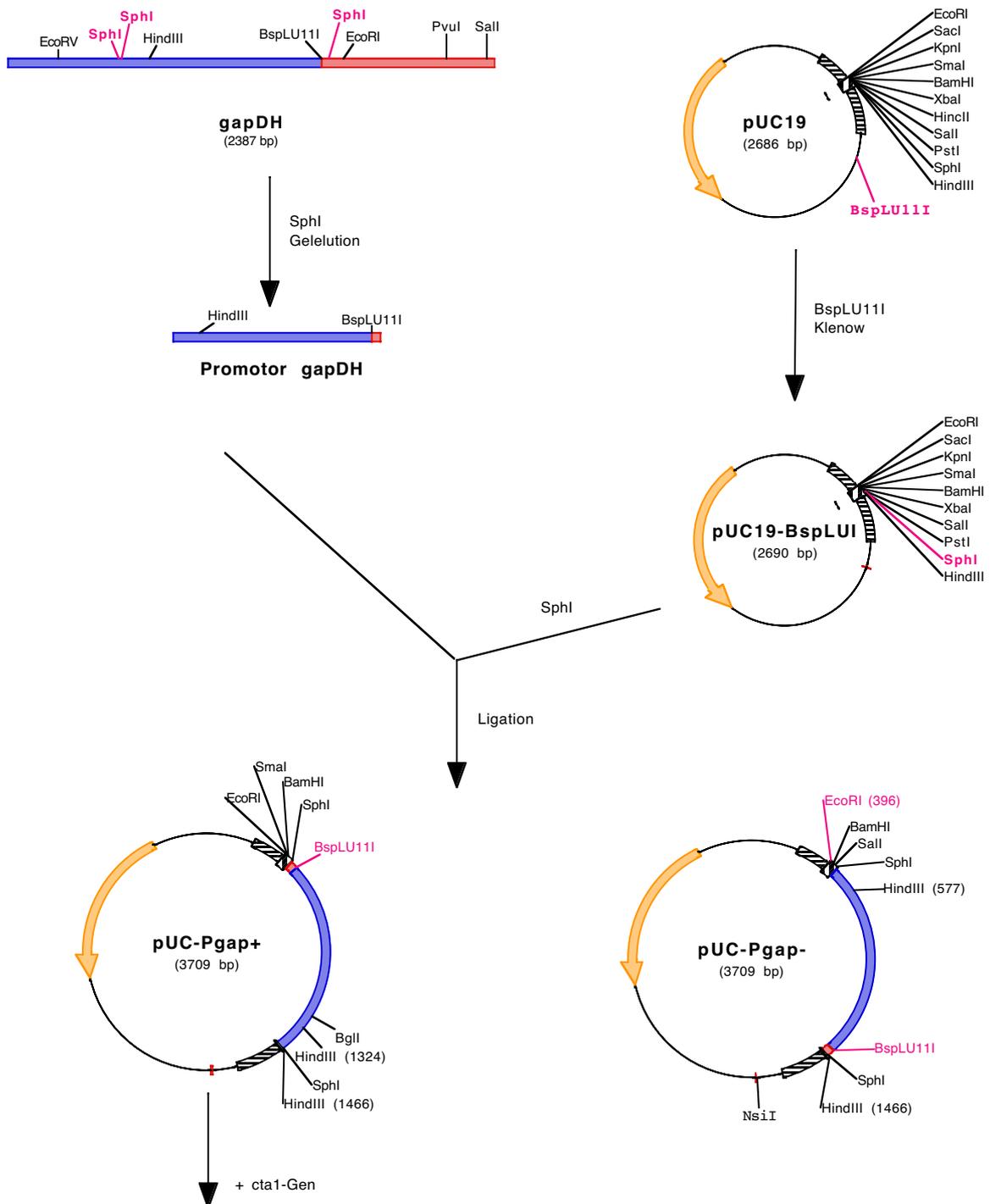
7.2.6 Konstruktion der Vektoren pUC-Pgap⁺ und pUC-Pgap⁻

Abb. 7-12: Klonierung des *gapDH* Promotors aus *T. versicolor* in pUC19. Der *gapDH* Promotor ist blau und das bakterielle Ampicillinresistenzgen orange markiert. (Abbildung von Karin Marbach)

7.2.7 Konstruktion des Vektors pUC-Pgap-cta

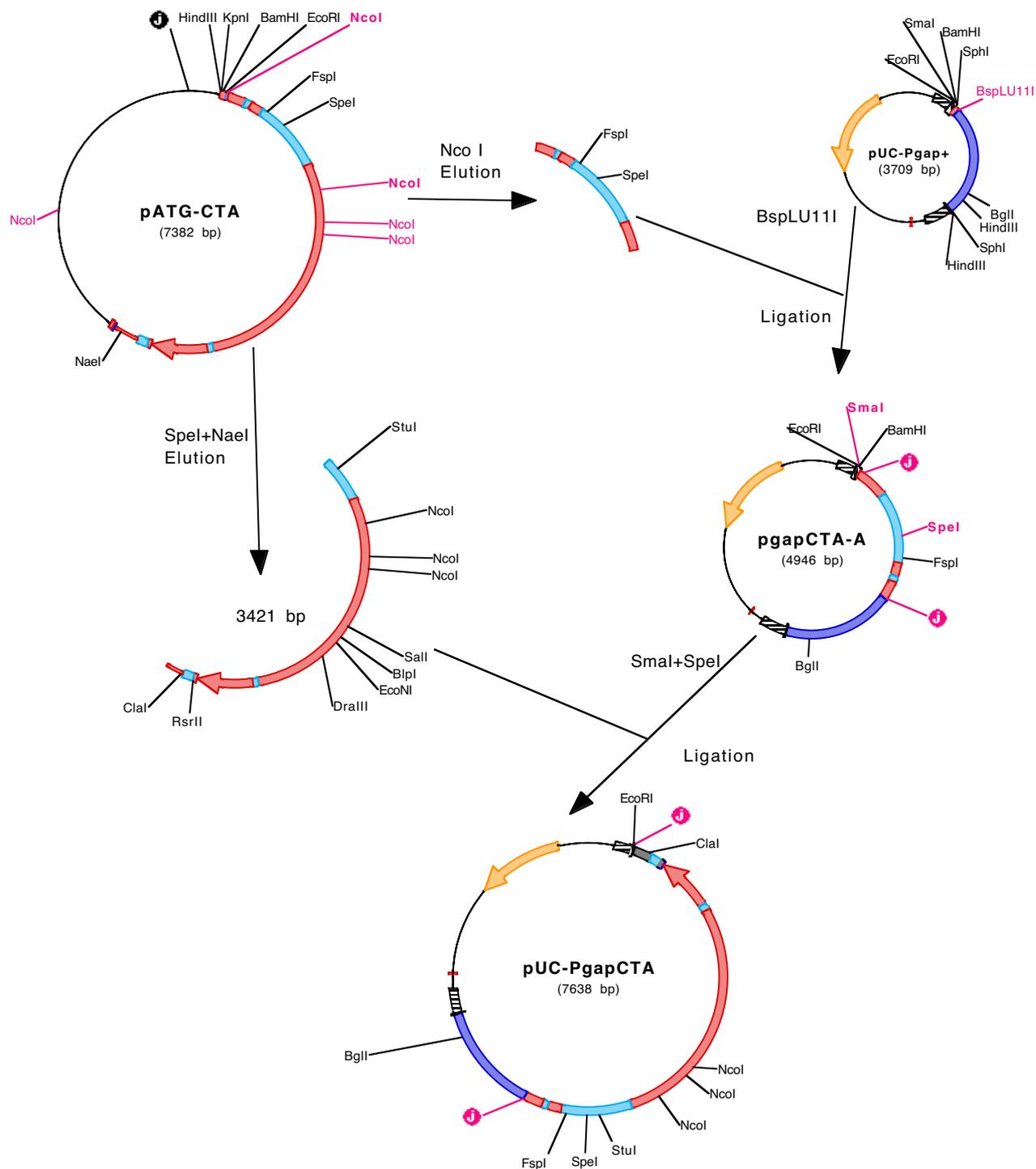


Abb. 7-13: Konstruktion des Vektors pUC-Pgap-cta. Das genomische *ctaA-1* Gen (rot) wurde unter die Kontrolle des gapDH Promotors (dunkelblau) gestellt. Die Introns im *ctaA-1* Gen sind hellblau gekennzeichnet. Der orange Pfeil markiert das Ampicillinresistenzgen. Der Vektor wurde für die Überexpression von *ctaA* in *T. versicolor* eingesetzt.

7.2.8 Konstruktion des Vektors gPuragapTAH

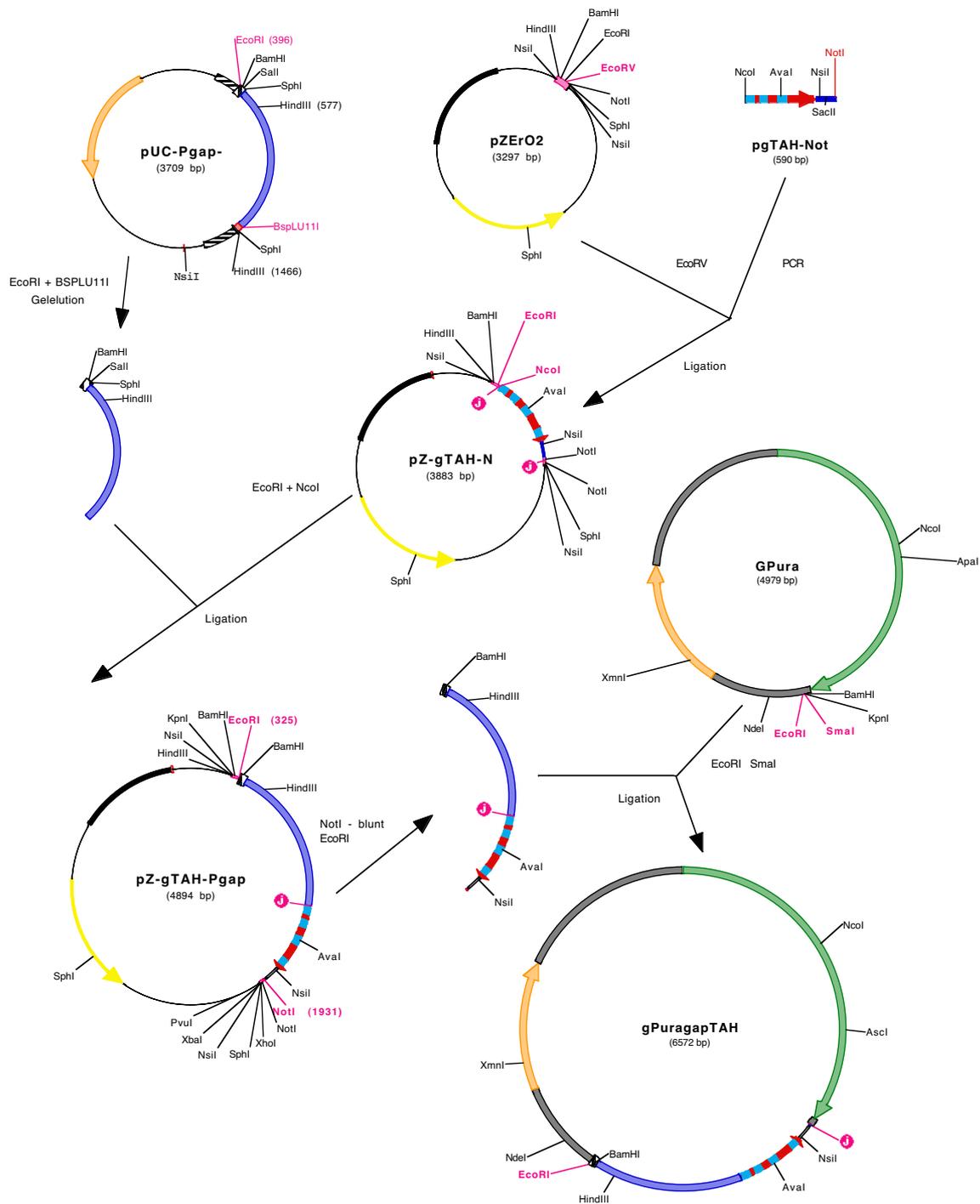


Abb. 7-14: Konstruktion des Vektors gPuragapTAH. Das genomische tahA-1 Gen (rot (Exons) und hellblau (Introns)) wurde unter die Kontrolle des gapDH Promotors (dunkelblau) gestellt. Der gelbe Pfeil steht für das Kanamycinresistenzgen, der orange Pfeil für das Ampicillinresistenzgen. Der grüne Pfeil symbolisiert das Pyrg-Gen aus *Schizophyllum commune*. Der Vektor wurde für die Überexpression von tahA in *T. versicolor* eingesetzt

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Anderson, G. J., Dancis, A., Roman, D. G., and Klausner, R. D.** (1994). Ferric iron reduction and iron uptake in eucaryotes: studies with the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Adv Exp Med Biol* 356, 81-9.
- Axelsen, K. B., and Palmgren, M. G.** (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol* 46, 84-101.
- Ballance, D. J.** (1986). Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* 2, 229-36.
- Beaudoin, J., and Labbé, S.** (2001). The fission yeast copper-sensing transcription factor Cuf1 regulates the copper transporter gene expression through an Ace1/Amt1-like recognition sequence. *J. Biol. Chem.* 276, 15472-15480.
- Bertrand, T., Jolival, C., Briozzo, P., Caminade, E., Joly, N., Madzak, C., and Mougin, C.** (2002). Crystal Structure of a Four-Copper Laccase Complexed with an Arylamine: Insights into Substrate Recognition and Correlation with Kinetics(.). *Biochemistry* 41, 7325-7333.
- Bertrand, T., Jolival, C., Caminade, E., Joly, N., Mougin, C., and Briozzo, P.** (2002). Purification and preliminary crystallographic study of *Trametes versicolor* laccase in its native form. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58, 319-21.
- Birnboim, H. C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- 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, 248-54.
- Call, H. P., and Mücke, I.** (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozyme®-process). *Journal of Biotechnology* 53, 163-202.
- Church, G. M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 1991-5.
- Cox, D. W.** (1996). Molecular advances in Wilson disease. *Prog Liver Dis* 14, 245-64.
- Cullen, D.** (1997). Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. *J Biotechnol* 53, 273-89.
- Culotta, V. C., Joh, H. D., Lin, S. J., Slekar, K. H., and Strain, J.** (1995). A physiological role for *Saccharomyces cerevisiae* copper/zinc superoxide dismutase in copper buffering. *J Biol Chem* 270, 29991-7.
- Culotta, V. C., Klomp, L. W., Strain, J., Casareno, R. L., Krems, B., and Gitlin, J. D.** (1997). The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 272, 23469-72.

- Dancis, A., Haile, D., Yuan, D. S., and Klausner, R. D.** (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem* 269, 25660-7.
- Dancis, A., Yuan, D. S., Haile, D., Askwith, C., Eide, D., Moehle, C., Kaplan, J., and Klausner, R. D.** (1994). Molecular characterization of a copper transport protein in *S. cerevisiae*: an unexpected role for copper in iron transport. *Cell* 76, 393-402.
- Davis-Kaplan, S. R., Askwith, C. C., Bengtzen, A. C., Radisky, D., and Kaplan, J.** (1998). Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13641-5.
- De Rome, L., and Gadd, G. M.** (1987). Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu^{2+} -selective electrode. *FEMS Microbiol. Lett.* 43, 283-287.
- Dietrich, D., Hickey, W. J., and Lamar, R.** (1995). Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 61, 3904-9.
- Dons, J. J., de Vries, O. M., and Wessels, J. G.** (1979). Characterization of the genome of the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Biochim Biophys Acta* 563, 100-12.
- Dons, J. J., and Wessels, J. G.** (1980). Sequence organization of the nuclear DNA of *Schizophyllum commune*. *Biochim Biophys Acta* 607, 385-96.
- Ducros, V., Brzozowski, A. M., Wilson, K. S., Brown, S. H., Ostergaard, P., Schneider, P., Yaver, D. S., Pedersen, A. H., and Davies, G. J.** (1998). Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. *Nat Struct Biol* 5, 310-6.
- Eide, D.** (1997). Molecular biology of iron and zinc uptake in eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* 9, 573-7.
- Eide, D. J., Bridgham, J. T., Zhao, Z., and Mattoon, J. R.** (1993). The vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for efficient copper detoxification, mitochondrial function, and iron metabolism. *Mol Gen Genet* 241, 447-56.
- Engel, M.** (1999). Identifizierung des Gens eines cytoplasmatischen Kupferchaperons aus *Trametes versicolor*. Institut für Biochemie (München: Ludwig -Maximilians-Universität), pp. 76.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B.** (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Felby, C., Petersen, L. S., and Nielsen, B. R.** (1997). Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung* 51, 281-286.
- Forbes, J. R., Hsi, G., and Cox, D. W.** (1999). Role of the copper-binding domain in the copper transport function of ATP7B, the P-type ATPase defective in Wilson disease. *J Biol Chem* 274, 12408-13.

- Fu, D., Beeler, T. J., and Dunn, T. M.** (1995). Sequence, mapping and disruption of CCC2, a gene that cross-complements the Ca(2+)-sensitive phenotype of *csg1* mutants and encodes a P-type ATPase belonging to the Cu(2+)-ATPase subfamily. *Yeast* *11*, 283-92.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O.** (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* *11*, 4241-57.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., and Fink, G. R.** (1998). The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 4046-50.
- Ghindilis, A. L., Michael, N., and Makower, A.** (1995). A new sensitive and simple method for detection of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Pharmazie* *50*, 599-600.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS- DNA/PEG procedure. *Yeast* *11*, 355-60.
- Glerum, D. M., Shtanko, A., and Tzagoloff, A.** (1996). Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* *271*, 14504-9.
- Grabe, M., and Oster, G.** (2001). Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol* *117*, 329-44.
- Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P., and Valentine, J. S.** (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 8558-62.
- Greene, J. R., Brown, N. H., DiDomenico, B. J., Kaplan, J., and Eide, D. J.** (1993). The GEF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an integral membrane protein; mutations in which have effects on respiration and iron- limited growth. *Mol Gen Genet* *241*, 542-53.
- Grosser, D.** (1985). Pflanzliche und tierische Bau- und Werkholzschädlinge: DRW-Verlag).
- Gurr, S. J., Unkles, S.E., and Kinghorn, J.E.** (1988). The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In *Gene Structure in Eucaryotic Microbes*, J.E.Kinghorn, ed. (Oxford: IRL Press), pp. 93-139.
- Haak, D., Gable, K., Beeler, T., and Dunn, T.** (1997). Hydroxylation of *Saccharomyces cerevisiae* ceramides requires Sur2p and Scs7p. *J Biol Chem* *272*, 29704-10.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M.** (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* *219*, 1-14.
- Hamza, I., Schaefer, M., Klomp, L. W., and Gitlin, J. D.** (1999). Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13363-8.
- Hasler, D. W., Jensen, L. T., Zerbe, O., Winge, D. R., and Vasak, M.** (2000). Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein. *Biochemistry* *39*, 14567-75.

- Himelblau, E., Mira, H., Lin, S. J., Culotta, V. C., Penarrubia, L., and Amasino, R. M.** (1998). Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene *ATX1* from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117, 1227-34.
- Hiratsuka, N., Wariishi, H., and Tanaka, H.** (2001). Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* 57, 563-71.
- Huffman, D. L., and O'Halloran, T. V.** (2000). Energetics of copper trafficking between the *Atx1* metallochaperone and the intracellular copper transporter, *Ccc2*. *J Biol Chem* 275, 18611-4.
- Hung, I. H., Suzuki, M., Yamaguchi, Y., Yuan, D. S., Klausner, R. D., and Gitlin, J. D.** (1997). Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272, 21461-6.
- Hwang, C., Sinskey, A. J., and Lodish, H. F.** (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-502.
- Jeffries, T. W.** (1994). Biodegradation of lignin and hemicelluloses. In *Biochemistry of microbial degradation*, C. Ratledge, ed. (Dordrecht, Netherlands: Kluwer-Academic), pp. 233-277.
- Jensen, L. T., Howard, W. R., Strain, J. J., Winge, D. R., and Culotta, V. C.** (1996). Enhanced effectiveness of copper ion buffering by *CUP1* metallothionein compared with *CRS5* metallothionein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 271, 18514-9.
- Jonsson, L., Sjostrom, K., Haggstrom, I., and Nyman, P. O.** (1995). Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus *Trametes versicolor* and structural features of basidiomycete laccases. *Biochim Biophys Acta* 1251, 210-5.
- Jungmann, J., Reins, H. A., Lee, J., Romeo, A., Hassett, R., Kosman, D., and Jentsch, S.** (1993). *MAC1*, a nuclear regulatory protein related to Cu-dependent transcription factors is involved in Cu/Fe utilization and stress resistance in yeast. *Embo J* 12, 5051-6.
- Kampfenkel, K., Mohlmann, T., Batz, O., Van Montagu, M., Inze, D., and Neuhaus, H. E.** (1995). Molecular characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett* 374, 351-5.
- Klomp, L. W., Lin, S. J., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Culotta, V. C., and Gitlin, J. D.** (1997). Identification and functional expression of *HAH1*, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem* 272, 9221-6.
- Knight, S. A., Labbe, S., Kwon, L. F., Kosman, D. J., and Thiele, D. J.** (1996). A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev* 10, 1917-29.
- Koch, K. A., Pena, M. M., and Thiele, D. J.** (1997). Copper-binding motifs in catalysis, transport, detoxification and signaling. *Chem Biol* 4, 549-60.
- Kyte, J., and Doolittle, R. F.** (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-32.

- Labbe, S., Zhu, Z., and Thiele, D. J.** (1997). Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J Biol Chem* *272*, 15951-8.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-5.
- Larin, D., Mekios, C., Das, K., Ross, B., Yang, A. S., and Gilliam, T. C.** (1999). Characterization of the interaction between the Wilson and Menkes disease proteins and the cytoplasmic copper chaperone, HAH1p. *J Biol Chem* *274*, 28497-504.
- Lee, J., Pena, M. M., Nose, Y., and Thiele, D. J.** (2002). Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem* *277*, 4380-7.
- Lin, C. M., and Kosman, D. J.** (1990). Copper uptake in wild type and copper metallothionein-deficient *Saccharomyces cerevisiae*. Kinetics and mechanism. *J Biol Chem* *265*, 9194-200.
- Lin, M. Y., Huang, K. J., and Kleven, S. H.** (1989). In vitro comparison of the activity of various antifungal drugs against new yeast isolates causing thrush in poultry. *Avian Dis* *33*, 416-21.
- Lin, S. J., and Culotta, V. C.** (1995). The ATX1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a small metal homeostasis factor that protects cells against reactive oxygen toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 3784-8.
- Lin, S. J., Pufahl, R. A., Dancis, A., O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C.** (1997). A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem* *272*, 9215-20.
- Linder, M. C.** (1991). *Biochemistry of Copper* (New York: Plenum Press).
- Lippincott-Schwartz, J.** (2001). The secretory membrane system studied in real-time. Robert Feulgen Prize Lecture, 2001. *Histochem Cell Biol* *116*, 97-107.
- Liu, X. F., Elashvili, I., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Lapinskas, P., and Culotta, V. C.** (1992). Yeast lacking superoxide dismutase. Isolation of genetic suppressors. *J Biol Chem* *267*, 18298-302.
- Llanos, R. M., and Mercer, J. F.** (2002). The molecular basis of copper homeostasis copper-related disorders. *DNA Cell Biol* *21*, 259-70.
- Low, R., and Rausch, T.** (1994). Sensitive, nonradioactive northern blots using alkaline transfer of total RNA and PCR-amplified biotinylated probes. *Biotechniques* *17*, 1026-8, 1030.
- Lyles, M. M., and Gilbert, H. F.** (1991). Catalysis of the oxidative folding of ribonuclease A by protein disulfide isomerase: pre-steady-state kinetics and the utilization of the oxidizing equivalents of the isomerase. *Biochemistry* *30*, 619-25.
- Macreadie, I. G., Castelli, L. A., Mehra, R. K., Thorvaldsen, J. L., and Winge, D. R.** (1994). Heterologous gene expression and protein secretion from *Candida glabrata*. *Biotechnol Appl Biochem* *19*, 265-9.
- Martin, W. J.** (1998). Cellular sequences in stealth viruses. *Pathobiology* *66*, 53-8.

- Meixenberger, K.** (2000). Praxissemesterbericht. In Institut für Biochemie (München: Ludwig - Maximilians-Universität).
- Menkes, J. H.** (1988). Kinky hair disease: twenty five years later. *Brain Dev* 10, 77-9.
- Messerschmidt, A., and Huber, R.** (1990). The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur J Biochem* 187, 341-52.
- Moller, J. V., Juul, B., and le Maire, M.** (1996). Structural organization, ion transport, and energy transduction of P- type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1286, 1-51.
- Mullis, K. B.** (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48, 579-82.
- Nelson, H., Mandiyan, S., and Nelson, N.** (1989). A conserved gene encoding the 57-kDa subunit of the yeast vacuolar H⁺- ATPase. *J Biol Chem* 264, 1775-8.
- Nyanhongo, G. S., Gomes, J., Gubitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., and Steiner, W.** (2002). Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Res* 36, 1449-56.
- O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C.** (2000). Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem* 275, 25057-60.
- Oh, W. J., Kim, E. K., Ko, J. H., Yoo, S. H., Hahn, S. H., and Yoo, O. J.** (2002). Nuclear proteins that bind to metal response element a (MREa) in the Wilson disease gene promoter are Ku autoantigens and the Ku-80 subunit is necessary for basal transcription of the WD gene. *Eur J Biochem* 269, 2151-61.
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., and Sannia, G.** (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol* 66, 920-4.
- Payne, A. S., and Gitlin, J. D.** (1998). Functional expression of the menkes disease protein reveals common biochemical mechanisms among the copper-transporting P-type ATPases. *J Biol Chem* 273, 3765-70.
- Pearce, D. A., and Sherman, F.** (1999). Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181, 4774-9.
- Pena, M. M., Lee, J., and Thiele, D. J.** (1999). A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr* 129, 1251-60.
- Perego, P., Jimenez, G., and Howell, S. B.** (1996). Isolation and characterization of a cisplatin-resistant strain of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Pharmacol* 50, 1080-6.
- Petris, M. J., Mercer, J. F., Culvenor, J. G., Lockhart, P., Gleeson, P. A., and Camakaris, J.** (1996). Ligand-regulated transport of the Menkes copper P-type ATPase efflux pump from the Golgi apparatus to the plasma membrane: a novel mechanism of regulated trafficking. *Embo J* 15, 6084-95.

- Portnoy, M. E., Rosenzweig, A. C., Rae, T., Huffman, D. L., O'Halloran, T. V., and Culotta, V. C.** (1999). Structure-function analyses of the ATX1 metallochaperone. *J Biol Chem* *274*, 15041-5.
- Portnoy, M. E., Schmidt, P. J., Rogers, R. S., and Culotta, V. C.** (2001). Metal transporters that contribute copper to metallochaperones in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* *265*, 873-82.
- Pufahl, R. A., Singer, C. P., Peariso, K. L., Lin, S. J., Schmidt, P. J., Fahrni, C. J., Culotta, V. C., Penner-Hahn, J. E., and O'Halloran, T. V.** (1997). Metal ion chaperone function of the soluble Cu(I) receptor Atx1. *Science* *278*, 853-6.
- Puig, S., Lee, J., Lau, M., and Thiele, D. J.** (2002). Biochemical and genetic analyses of yeast and human high-affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem* *30*, 30.
- Puig, S., and Thiele, D. J.** (2002). Molecular mechanisms of copper uptake and distribution. *Curr Opin Chem Biol* *6*, 171-80.
- Pukkila, P. J., and Casselton, L. A.** (1991). Molecular Genetics of the Agaric *Coprinus cinerius*. In *More Gene Manipulations in Fungi*, J. W. Bennett and L. L. Lasure, eds. (San Diego: Academic Press. Inc.), pp. 126 - 150.
- Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., and O'Halloran, T. V.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* *284*, 805-8.
- Reader, U., and Broda, P.** (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* *1*, 17-20.
- Reed, K. C., and Mann, D. A.** (1985). Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nucleic Acids Res* *13*, 7207-21.
- Rentzsch, A., Krummeck-Weiss, G., Hofer, A., Bartuschka, A., Ostermann, K., and Rodel, G.** (1999). Mitochondrial copper metabolism in yeast: mutational analysis of Sco1p involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase. *Curr Genet* *35*, 103-8.
- Rosenzweig, A. C., and O'Halloran, T. V.** (2000). Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr Opin Chem Biol* *4*, 140-7.
- Roy-Arcand, L., and Archibald, F. S.** (1991). Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* *13*, 194-203.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* *239*, 487-91.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* *230*, 1350-4.
- Sambrook, J., Maniatis, T., and Fritsch, E. F.** (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 2nd Edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

- Santoro, N. a. T., D. J.** (1997). Yeast Stress Response, S. Homann, and Marger, W. H., ed.: Springer-verlag), pp. 171-211.
- Sato, M., and Gitlin, J. D.** (1991). Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 266, 5128-34.
- Schagger, H., and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79.
- Schouten, A., Wagemakers, L., Stefanato, F. L., van der Kaaij, R. M., and van Kan, J. A.** (2002). Resveratrol acts as a natural profungicide and induces self- intoxication by a specific laccase. *Mol Microbiol* 43, 883-94.
- Schuren, F. H., Hessing, J., Muijlwijk, M. v., Zeijl, C. v., Pfaller, R., and Hondel, C. v. d.** (1999). Genetic transformation of the basidiomycete *Trametes versicolor*. In Abstracts of the 20th fungal genetics conference at Asilomar (Kansas City, Kansas: Fungal Genetics Stock Cente).
- Shatzman, A. R., and Kosman, D. J.** (1978). The utilization of copper and its role in the biosynthesis of copper- containing proteins in the fungus, *Dactylium dendroides*. *Biochim Biophys Acta* 544, 163-79.
- Shin, K. S., and Lee, Y. J.** (2000). Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys* 384, 109-15.
- Solioz, M., and Vulpe, C.** (1996). CPx-type ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci* 21, 237-41.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N., and te Heesen, S.** (1998). A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5187-92.
- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D., and Dancis, A.** (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271, 1552-7.
- Szeponik, J., Moller, B., Pfeiffer, D., Lisdat, F., Wollenberger, U., Makower, A., and Scheller, F. W.** (1997). Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. *Biosens Bioelectron* 12, 947-52.
- Tekere, M., Ncube, I., Read, J. S., and Zvauya, R.** (2002). Biodegradation of the organochlorine pesticide, lindane by a sub- tropical white rot fungus in batch and packed bed bioreactor systems. *Environ Technol* 23, 199-206.
- Thiele, D. J.** (1988). ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol Cell Biol* 8, 2745-52.
- Toone, W. M., Morgan, B. A., and Jones, N.** (2001). Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* 20, 2336-46.

- Voskoboinik, I., Greenough, M., La Fontaine, S., Mercer, J. F., and Camakaris, J.** (2001). Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 966-70.
- Voskoboinik, I., Mar, J., Strausak, D., and Camakaris, J.** (2001). The regulation of catalytic activity of the menkes copper-translocating P-type ATPase. Role of high affinity copper-binding sites. *J Biol Chem* 276, 28620-7.
- Wahl, G. M., Meinkoth, J. L., and Kimmel, A. R.** (1987). Northern and Southern blots. *Methods Enzymol* 152, 572-81.
- Wahleithner, J. A., Xu, F., Brown, K. M., Brown, S. H., Golightly, E. J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A. and Schneider, P.** (1996). The identification and characterization of four laccases from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet* 29, 395-403
- Weaver, R. F., and Weissmann, C.** (1979). Mapping of RNA by a modification of the Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15 S beta-globin mRNA precursor and mature 10 s beta-globin mRNA have identical map coordinates. *Nucleic Acids Res* 7, 1175-93.
- Winge, D. R., Jensen, L. T., and Srinivasan, C.** (1998). Metal-ion regulation of gene expression in yeast. *Curr Opin Chem Biol* 2, 216-21.
- Wu, M. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P., and Machen, T. E.** (2001). Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem* 276, 33027-35.
- Xu, F.** (1996). Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry* 35, 7608-14.
- Xu, F., Shin, W., Brown, S. H., Wahleithner, J. A., Sundaram, U. M., and Solomon, E. I.** (1996). A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Biochim Biophys Acta* 1292, 303-11.
- Yamaguchi-Iwai, Y., Serpe, M., Haile, D., Yang, W., Kosman, D. J., Klausner, R. D., and Dancis, A.** (1997). Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J Biol Chem* 272, 17711-8.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.
- Yuan, D. S., Dancis, A., and Klausner, R. D.** (1997). Restriction of copper export in *Saccharomyces cerevisiae* to a late Golgi or post-Golgi compartment in the secretory pathway. *J Biol Chem* 272, 25787-93.
- Yuan, D. S., Stearman, R., Dancis, A., Dunn, T., Beeler, T., and Klausner, R. D.** (1995). The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2632-6.
- Zervos, A. S., Gyuris, J., and Brent, R.** (1993). Mxi1, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* 72, 223-32.

- Zhou, B., and Gitschier, J.** (1997). hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 7481-6.
- Zhu, X., Gibbons, J., Garcia-Rivera, J., Casadevall, A., and Williamson, P. R.** (2001). Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect Immun* *69*, 5589-96.

CURRICULUM VITAE

Name: Andreas Uldschmid
Geburtsort: Fürstenfeldbruck
Geburtsdatum: 04.06.1970
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

1977-81 Grundschule in Fürstenfeldbruck
1981-90 Graf-Rasso-Gymnasium, Fürstenfeldbruck
6/1990 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1990-91 Grundwehrdienst

Studium:

1992-98 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
04/1994 Vordiplomprüfung
04/1997 Diplomprüfung
05/1997-02/1998 Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Karl Forchhammer am Institut für Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München. Thema: Untersuchungen zur GlnB-abhängigen Signaltransduktion in *Synechococcus* PCC 7942: P_{II}-Modifikation und P_{II}-Protein Protein-Interaktion.

07/1998-08/2002 Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. E.-L. Winnacker
Thema: Isolierung und Charakterisierung von Kupferhomeostase-Faktoren aus *Trametes versicolor* und deren Einfluss auf die Laccase-Expression