

VAAM-Promotionspreisträger 2002

Der CCAAT-bindende Komplex von *Aspergillus nidulans*

Stefan Steidl

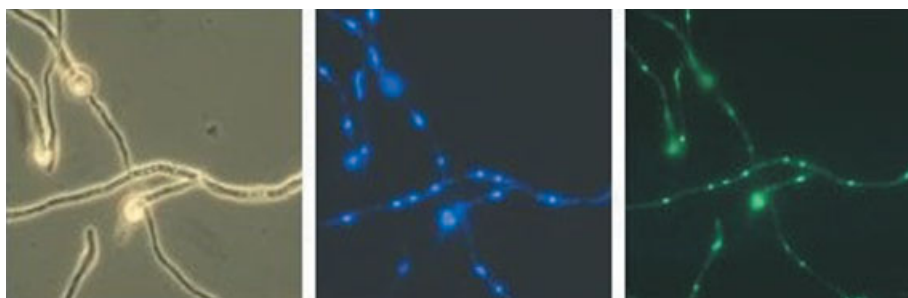


Abb. 1: Kernlokalisierung von HapE-GFP. Ein *A. nidulans*- Δ hapE-Stamm wurde durch hapE-gfp funktionell komplementiert. Von links nach rechts: Durchlichtaufnahme von Pilzhyphen, Färbung der Zellkerne durch DAPI und GFP-Fluoreszenz.

► Heteromere CCAAT-Bindekomplexe sind von Pilzen bis zum Menschen konserviert und an der Regulation vieler eukaryontischer Gene beteiligt. In dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* besteht die Funktion des CCAAT-Bindekomplexes (Hap2p/3p/5p) in der Aktivierung von Genen der Atmungskette. Die Untersuchung des homologen Komplexes am Beispiel des filamentösen Pilzes *Aspergillus nidulans* sollte Aufschlüsse darüber geben, welche Rolle dieser CCAAT-Bindekomplex (AnCF) in der Genregulation bei einem obligat aeroben Organismus spielt. Weiterhin sollten erstmals Erkenntnisse zur Regulation der Untereinheitsgene gewonnen und der Mechanismus der Kerntranslokation solcher Komplexe untersucht werden. Die *A. nidulans*-Gene, *hapB*, *hapC* und *hapE*, die große Ähnlichkeit zu den Genen *HAP2*, *HAP3* und *HAP5* von *S. cerevisiae* aufwiesen, konnten zuvor isoliert werden.

Mutanten mit Deletionen der Gene *hapB*, *hapC* und *hapE* wiesen jeweils stark verlangsamtetes Wachstum auf und bildeten weniger Konidien. Der identische Phänotyp der drei Deletionsmutanten lässt darauf schließen, dass die drei Genprodukte HapB, HapC und HapE *in vivo* interagieren, um einen funktionellen CCAAT-Bindekomplex bilden zu können. Der biochemische Nachweis der Interaktion der drei Untereinheiten gelang durch Rekonstitution eines CCAAT-Bindekomplexes mit rekombinant hergestellten und gereinigten HapB/C/E-Proteinen^[1].

Die Deletionsmutanten wurden verwendet, um den Einfluss von AnCF auf die Expression der Gene *amdS*, *lysF* und *hapB* zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass

AnCF bei der Genregulation in *A. nidulans* eine dualistische Funktion wahrnimmt. Das Gen *amdS* wurde durch AnCF aktiviert, während der CCAAT-Bindekomplex die Expression der Gene *lysF* und *hapB* unterdrückt^[2, 3].

Im *hapB*-Promotor wurden zwei CCAAT-Elemente (Box α und Box β) identifiziert. Da in Δ hapC- und Δ hapE-Stämmen im Vergleich zum Wildtyp sowohl erhöhte *hapB*-mRNA- als auch erhöhte HapB-Proteinmengen nachgewiesen wurden, liegt die

Vermutung nahe, dass AnCF als Repressor der *hapB*-Expression wirkt. Es erfolgte die Konstruktion von *hapB-lacZ*-Genfusionen, die verschiedene Punktmutationen in Box α und Box β trugen. Ein Modell zur Autoregulation von *hapB* wurde daraufhin abgeleitet: Die Besetzung von Box β durch AnCF führt zum Ausschluss der DNA-Bindung durch einen Transkriptionsaktivator und folglich zur Repression von *hapB*^[3].

Die intrazelluläre Lokalisation der drei Hap-Proteine wurde mit Hilfe von Hap-GFP-Fusionsproteinen untersucht. Die HapB-, HapC- und HapE-GFP-Proteine wurden in *hap*⁺-, Δ hapB-, Δ hapC- und Δ hapE-Stämmen analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass jedes der drei Hap-GFP-Proteine den entsprechenden Δ hap-Stamm funktionell komplementieren konnte und dass nur HapB-GFP unabhängig von den beiden anderen Untereinheiten aktiv in den Zellkern importiert wurde. Die Fusionsproteine HapC-GFP und HapE-GFP hingegen befanden sich im cytoplasmatischen Kompartiment, sofern sich kein HapB/C/E-Komplex zusammenschloss. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass der im Cytoplasma prä-assemblierte AnCF-Komplex in den Zellkern importiert wird, indem die NLS der HapB-Untereinheit von der Importmaschinerie erkannt wird. HapC und HapE werden somit durch einen „piggyback“-Mechanismus („huckepack“, nur im Komplex mit HapB) über die Kernmembran transloziert.

Literatur

[1] Steidl, S., Papagiannopoulos, P., Litzka, O., Andrianopoulos, A., Davis, M.A., Brakhage, A.A. & Hynes, M.J. (1999) AnCF, the CCAAT binding complex of *Aspergillus nidulans* contains products of the *hapB*, *hapC* and *hapE* genes and is required for activation by the pathway-specific regulatory gene *amdR*. *Molecular and Cellular Biology* 19: 99–106

[2] Weidner, G., Steidl, S. & Brakhage, A.A. (2001) The *Aspergillus nidulans* homoconitase gene *lysF* is negatively regulated by the multimeric CCAAT-binding complex AnCF and positively by GATA sites. *Archives of Microbiology* 175: 122–132

[3] Steidl, S., Hynes, M.J. & Brakhage, A.A. (2001) The *Aspergillus nidulans* multimeric CCAAT binding complex AnCF is negatively autoregulated via its *hapB* subunit gene. *Journal of Molecular Biology* 306: 643–653

Korrespondenzadresse

Dr. Stefan Steidl
Morphosys AG
Lena-Christ-Str. 48
82152 Martinsried
e-mail: steidl@morphosys.com



Stefan Steidl

(Jahrgang 1971) studierte von 1991 bis 1997 Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Er schrieb seine Diplomarbeit im Bereich Mikrobiologie („Klonierung eines potentiellen Regulatorgens der Penicillinbiosynthese von *Aspergillus nidulans*“) unter der Anleitung von Prof. Axel

Brakhage. Im Anschluss war er wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Brakhage am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt, wo er im Juni 2001 promovierte. 1997/98 arbeitete Steidl im Rahmen seiner Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Hynes am Department of Genetics der University of Melbourne in Australien. Seit August 2001 ist er bei der MorphoSys AG in Martinsried als Wissenschaftler im Bereich „Antibody Research“ angestellt.