

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung.....	1
1. Einleitung.....	1
2. Signaltransduktionswege bei der Glukoseinduktion in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
3. Glukoserepression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
3.1. Verschiedene Ebenen der Repression.....	4
3.2. Der SNF1-Komplex: „Zellenergie-Sensor“ bei der Derepression.....	5
3.3. Struktur des Transkriptionsregulators MIG1.....	7
3.4. Modell der Repression durch MIG1.....	8
3.5. Mehrfache Kontrollmechanismen der Repression.....	10
3.6. Beteiligung weiterer Glukoserepressoren an der Regulation der Genexpression.....	12
3.7. Bedeutung von cAMP für die Repression.....	12
4. Glukoseregulation in Hyphenpilzen	13
4.1. Signaltransduktionswege und glukoseregulierte Stoffwechselwege in <i>Aspergillus nidulans</i>	13
4.2. Klonierung des Transkriptionsregulators CREA.....	14
4.3. Mechanismen der Glukoserepression in <i>Aspergillus nidulans</i>	16
4.4. Identifizierung des Glukoserepressors aus <i>Trichoderma reesei</i> : CRE1.....	17
4.5. Aufbau und Regulation von CRE1.....	17
4.6. Aktivierung von CRE1 durch Phosphorylierung.....	18
5. Ausblick.....	19
II. Problemstellung.....	21
III. Material und Methoden.....	25
1. Material.....	25
1.1. Stämme.....	25
1.2. Genbibliothek.....	25
1.3. Plasmide.....	26
1.4. Oligonukleotide.....	26
1.5. Chemikalien.....	27
1.6. Enzyme.....	27
1.7. Häufig verwendete Puffer.....	27
1.8. Nährmedien	28
2. Methoden.....	28
2.1. Kulturbedingungen.....	28
2.2. Transformationen.....	29
2.3. Isolierung von Nukleinsäuren.....	29

2.4. Gelelektrophoresen.....	30
2.5. Southern-Blotting und DNA-DNA-Hybridisierungen.....	30
2.6. Northern-Blotting und DNA-RNA-Hybridisierungen.....	31
2.7. Untersuchungen der Transkriptstabilität in <i>A. chrysogenum</i>	31
2.8. Densitometrische Auswertung von Autoradiogrammen.....	31
2.9. Radioaktive Markierung von DNA.....	31
2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
2.11. DNA-Sequenzierung.....	32
2.12. Oligonukleotidsynthese.....	32
2.13. <i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	32
2.14. Auswertung von Nukleotidsequenzen.....	32
2.15. Nachweis von Zuckern im Kulturüberstand.....	33
2.16. Nachweis von β -Lactam-Antibiotika.....	33
2.17. Überexpression und Isolation von Proteinen und Proteinfragmenten in <i>E. coli</i>	34
2.18. Herstellung polyklonaler Antiseren.....	34
2.19. Proteinisolierung aus <i>A. chrysogenum</i>	34
2.20. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.21. Western-Blotting und Deglykosilierung.....	34
2.22. Immunodetektion.....	35
2.23. Quantitative Bestimmung der Aktivität von Reportergenen.....	35
2.24. Sicherheitsbestimmungen.....	35
IV. Ergebnisse.....	36
1. Wirkung von Glukose auf die Cephalosporin C-Biosynthese in <i>A. chrysogenum</i> ..	36
1.1. Auswahl eines zur Anzucht geeigneten Mediums.....	36
1.2. Beeinflussung der Produktion von β -Lactam-Antibiotika.....	39
1.3. Untersuchung der Transkriptmengen der Cephalosporin C-Biosynthesegene	41
1.4. Stabilität des <i>cefEF</i> -Transkripts in Gegenwart von Glukose.....	45
1.5. Beeinflussung der Proteinmengen der <i>pcbC</i> -, <i>cefEF</i> - und <i>cefG</i> -Genprodukte	47
1.5.1 Herstellung von polyklonalen Antiseren gegen die IPN-Synthase und DAC-Acetyltransferase.....	47
1.5.2 Nachweis der Cephalosporin C-Biosynthesegenprodukte in <i>A.</i> <i>chrysogenum</i>	48
2. Versuche zur Identifizierung von regulativ wirkenden <i>cis</i> -Elementen durch quantitative Reportergenmessungen.....	51
3. Isolierung potentiell <i>trans</i> -wirkender Faktoren bei der Glukoserepression in <i>A.</i> <i>chrysogenum</i>	54
3.1 Klonierung des <i>creA</i> -Gens.....	54
3.2 Regulation von <i>creA</i> in verschiedenen Stämmen von <i>A. chrysogenum</i>	60
3.3 Transformation von <i>A. chrysogenum</i> mit zusätzlichen Kopien des <i>creA</i> -Gens und Analyse der Transformanten.....	62
3.3.1 Auswahl geeigneter Kotransformanten.....	62
3.3.2 Wuchsgeschwindigkeit und Cephalosporin C-Produktion.....	64

3.3.3 Northern-Analysen der <i>pcbC</i> -, <i>cefEF</i> - und <i>creA</i> -Transkriptmengen in den Kotransformanten.....	65
V. Diskussion	70
1. Die β -Lactam-Biosynthese unterliegt einer negativen Glukoseregulation.....	70
1.1 Etablierung geeigneter Untersuchungsbedingungen.....	71
1.2 Die Expression des <i>pcbAB</i> -Gens weist in den β -Lactam-Produzenten artspezifische Unterschiede auf.....	72
1.3 Das <i>pcbC</i> -Gen ist in <i>A. chrysogenum</i> stammspezifisch auf transkriptionaler Ebene reguliert.....	73
1.4 Das <i>cefEF</i> -Gen ist in <i>A. chrysogenum</i> transkriptional reprimiert.....	75
1.5 Eine Glukoserepression des <i>cefG</i> -Gens konnte in <i>A. chrysogenum</i> nicht beobachtet werden.....	78
1.6 Glukose beeinflusst den pH-Wert des umgebenden Milieus.....	80
1.7 Die Glukoseregulation betrifft die Expression mehrerer Cephalosporin C-Biosynthesegene.....	82
2. Mechanismen der Glukoserepression bei der Cephalosporin C-Biosynthese.....	84
2.1 Reportergenanalysen sind in <i>A. chrysogenum</i> nur bedingt zum Nachweis von Regulationsereignissen geeignet.....	84
2.2 Die Promotoren der glukoseregulierten <i>pcbC</i> - und <i>cefEF</i> -Gene weisen putative CREA-Bindestellen auf.....	86
2.3 Das CREA-Protein aus <i>A. chrysogenum</i> : Einordnung in die Reihe bekannter pilzlicher Glukoserepressoren.....	89
2.4 CREA hat möglicherweise eine Aktivatorfunktion.....	95
2.5 CREA ist an der Regulation der Cephalosporin C-Biosynthese beteiligt.....	98
2.5.1 Die Kotransformanten sind in der Cephalosporin C-Produktion beeinträchtigt.....	99
2.5.2 CREA reprimiert die Transkription von <i>pcbC</i> und <i>cefEF</i>	100
2.5.3 Existieren weitere glukoseabhängige Regulatoren der Cephalosporin C-Biosynthese?.....	102
2.5.4 Modellvorstellung der Regulation durch CREA.....	104
VI. Zusammenfassung	106
VII. Summary	108
VIII. Literatur	110
IX. Anhang	130