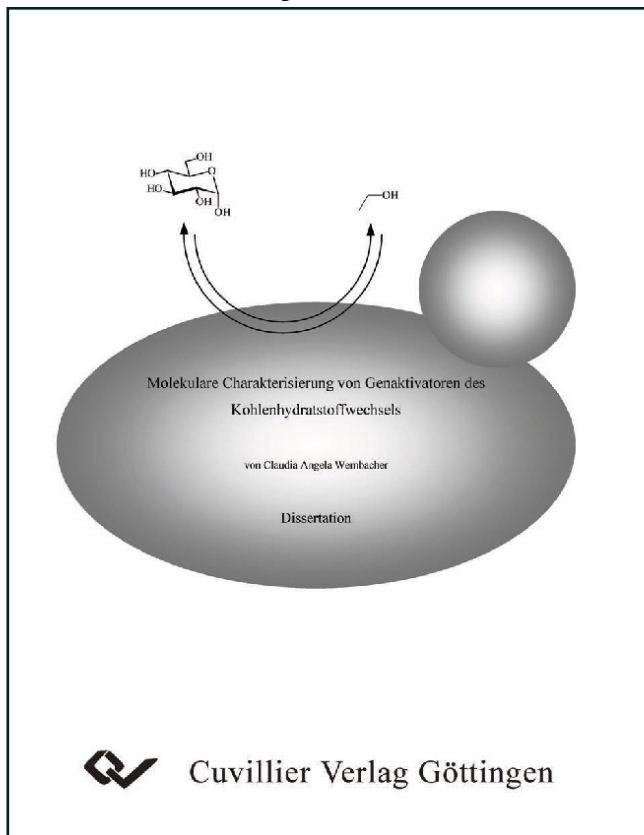




Claudia Angela Wembacher (Autor)
**Molekulare Charakterisierung von Genaktivatoren
des Kohlenhydratstoffwechsels**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3379>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zuckerstoffwechsel von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.2	Glucoseinaktivierung.....	2
1.3	Glucoseinduzierter gezielter mRNA-Abbau	3
1.4	Glucoserepression.....	3
1.5	Der Cat1/3p-Kinasekomplex	6
1.5.1	Cat1/3p- β -Untereinheiten.....	9
1.5.2	Weitere Komponenten des Cat1/3p-Kinasekomplexes.....	13
1.5.3	Substrate des Cat1/3p-Kinasekomplexes	15
1.6	Cat8p als Genregulator der Gluconeogenese und des Glyoxylat-Zyklus.....	17
1.6.1	Einfluß des Cat1/3p-Kinasekomplexes	19
1.6.2	Zielgene des Transkriptionsfaktors Cat8p.....	20
1.7	Computergestützte Analysen.....	22
1.7.1	Genome-wide expression patterns (<i>Microarray</i> Analysen)	22
1.7.2	Proteinanalyse	23
1.8	Zielsetzung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Stämme.....	25
2.1.1	<i>Escherichia coli</i>	25
2.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
2.2	Plasmide	28
2.3	Medien.....	29
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	29
2.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.4	Paarung, Sporulation und Tetradenanalyse	31
2.5	Molekularbiologische Techniken	32

2.5.1	Transformationen	32
2.5.2	Plasmidpräparationen	32
2.5.3	Enzymatische DNA Modifikationen	32
2.5.4	Auftrennen von DNA-Fragmenten im Agarose-Gel	32
2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	32
2.6.1	PCR mit chromosomaler DNA oder Plasmiden als <i>template</i> der Reaktion	34
2.6.2	PCR mit ganzen Zellen (<i>E. coli</i> oder <i>S. cerevisiae</i>)	35
2.6.3	Reinigung der PCR-Produkte	35
2.7	Stammkonstruktionen.....	35
2.7.1	Epitop-markierte Hefestämme	35
2.7.2	GFP-Fusionen.....	36
2.8	Kulturbedingungen.....	37
2.8.1	Anzucht zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	37
2.8.2	Anzucht zur Bestimmung der Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase-Inaktivierung (FBPase).....	38
2.8.3	Anzucht zur Rohextraktgewinnung für Coimmunopräzipitationen	38
2.8.4	Anzucht zur RNA-Isolierung	38
2.9	Rohextraktgewinnung	39
2.9.1	Rohextraktgewinnung für β -Galaktosidase- und Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase-Enzymtest.	39
2.9.2	Rohextraktgewinnung für Coimmunopräzipitationen.....	39
2.10	Proteinbestimmungen.....	39
2.10.1	Proteinbestimmung nach der Mikrobiuret-Methode	39
2.10.2	Proteinbestimmung nach der BCA-Methode	40
2.11	Enzymtests.....	40
2.11.1	Bestimmung der β -Galaktosidase	40
2.11.2	Bestimmung der Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase	40
2.12	Inaktivierung der Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase (FBPase).....	40
2.12.1	Inaktivierung	40
2.12.2	Reaktivierung	41
2.13	Wachstumstests	41

2.14	Coimmunopräzipitation.....	42
2.14.1	Präparation der α -HA- <i>beads</i>	42
2.14.2	Präzipitation.....	42
2.15	Kinaseassay	42
2.16	SDS-PAGE	43
2.16.1	Vorbereitung der Proben	43
2.16.2	SDS-Gele.....	43
2.17	<i>Western-blot</i>	43
2.17.1	<i>Semi-dry-blot</i>	43
2.17.2	<i>Tankblot</i>	44
2.18	Antikörperinkubation	44
2.19	Isolierung von RNA aus <i>S. cerevisiae</i> Zellen.....	44
2.20	<i>Northern-blot</i>	45
2.21	<i>Northern-Hybridisierung</i>	45
2.21.1	Sondenherstellung	45
2.21.2	Hybridisierung.....	45
2.22	Klonierungen	46
2.22.1	<i>Two Hybrid</i> Konstruktionen.....	46
2.22.2	Promotor- <i>lacZ</i> -Fusionen	47
2.22.3	Klonierung von <i>NPR1</i>	48
2.23	<i>Two Hybrid</i> System	49
2.23.1	Direktes <i>Two-Hybrid</i>	49
2.23.2	<i>Two-Hybrid</i> Analyse	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Untersuchungen zur <i>CAT8</i> -Promotoraktivität.....	52
3.1.1	Einfluß verschiedener nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen auf die Expression des <i>CAT8</i> Genes.....	53
3.1.2	Einfluß des Wachstumsverhaltens bezüglich nicht-fermentierbarer C-Quellen ...	54
3.1.3	Einfluß des Cat1/3p-Kinasekomplexes	56
3.1.4	Einfluß der Glucoserepression	57

3.2	Interaktionen zwischen dem Cat1/3p-Kinasekomplex und Cat8p	59
3.2.1	Interaktionen des Gal4p-Bindedomänen-Cat8p-Fusionsproteins im <i>Two-Hybrid</i> System	59
3.2.2	Coimmunopräzipitation mit einer HA ₃ -Epitop-markierten Variante von Cat8p..	61
3.2.3	Kinaseassay	64
3.3	Wachstumsverhalten verschiedener Stämme auf unterschiedlichen Medien.....	66
3.4	Weitere Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors Cat8p.....	69
3.5	Versuche zur Suppression verschiedener Deletionsmutanten mit einem konstitutiven Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase Allel	74
3.6	Einfluß der <i>cat8</i> Deletion auf die Glucoseinaktivierung.....	78
3.6.1	Ist <i>UBC8</i> ein Cat8p Zielgen?.....	78
3.6.2	Glucoseinaktivierung eines konstitutiven Fructose-1,6- <i>bis</i> -phosphatase Allels...	79
3.6.3	Glucoseinaktivierung der FBPase unter Verhinderung der Proteinbiosynthese durch Gabe von Cycloheximid.....	84
3.6.4	Reaktivierung von Fbp1p	84
3.6.5	<i>REG2</i> als Cat8p Zielgen	87
3.7	Suche nach neuen Zielgenen der Regulationskaskade	89
3.7.1	<i>Northern-blot</i> Analyse.....	91
3.7.2	Promotor- <i>LacZ</i> -Fusionen	92
3.7.3	Funktionsanalyse von <i>YCR010c</i> und <i>YGR067c</i>	93
4	Diskussion.....	99
4.1	Die <i>CAT8</i> -Promotoraktivität wird von Faktoren der Repression und Derepression beeinflusst.....	99
4.1.1	Einfluß des Wachstumsverhaltens der untersuchten Stämme auf die <i>CAT8-lacZ</i> Expression	99
4.1.2	Einfluß des Cat1/3p-Kinasekomplexes	101
4.1.3	Einfluß der Glucoserepression durch Mig1p und Mig2p.....	103
4.2	Der Cat1/3p-Kinasekomplex interagiert mit Cat8p.....	104
4.3	Weitere potentielle Interaktionspartner	109
4.4	Einfluß von <i>cat8</i> auf die Glucoseinaktivierung von Fbp1p.....	111

4.5	Neue Zielgene des Transkriptionsfaktors Cat8p	113
4.6	Einfluß verschiedener Deletionen auf das pseudohyphale Wachstum.....	116
4.7	Bedeutung der computergestützten Analysen für den Cat1/3p-Kinasekomplex.....	117
5	Zusammenfassung.....	133
6	Referenzen.....	135