

4541 - 540 1

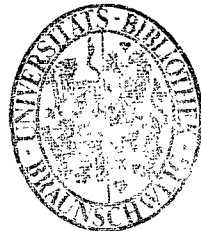
Identifikation, molekulare und funktionelle Charakterisierung des
cpc-3 Gens - ein Beitrag zur Aufklärung der Allgemeinen Kontrolle
der Aminosäurebiosynthesen von *Neurospora crassa*

Vom Fachbereich Biologie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte
DISSERTATION

von



Dipl.-Biol. Evelyn Sattlegger
geboren am 19. April 1967 in Dallas (USA)

1996

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Kurzfassung	i
Inhaltsverzeichnis	ii
Abkürzungsverzeichnis	iv

I. Einleitung

1. Die Kontrolle der Aminosäurebiosynthesen in niederen Eukaryoten	1
2. Der Mechanismus der Allgemeinen Kontrolle der Aminosäurebiosynthesen	2
2.1 Kontrollelemente in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
2.2 Kontrollelemente in <i>Neurospora crassa</i>	5
3. Regulation der Translationsinitiation durch eIF-2 α Kinasen, am Beispiel des <i>GCN2</i> der Hefe	6
4. Aminoacyl-tRNA Synthetasen und die Erkennung von Aminosäuremangel	9
5. Aufgabenstellung: Gibt es ein dem <i>GCN2</i> der Hefe homologes Gen in <i>N. crassa</i> ?	10

II. Material und Methoden

1. Verwendete Organismen und Nucleinsäuren	12
1.1 <i>Neurospora crassa</i> Stämme	12
1.2 <i>Escherichia coli</i> Stämme	13
1.3 Vektoren und Plasmide	13
1.4 DNA-Banken	15
2. <i>Neurospora crassa</i>, Kulturbedingungen und Methoden	16
2.1 Der Organismus <i>Neurospora crassa</i>	16
2.2 Kulturbedingungen und Stammhaltung	17
2.3 Wachstumsuntersuchungen	18
2.4 Kreuzungen	19
2.5 Komplementationstest	20
2.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten	20
2.7 Transformation von <i>N. crassa</i>	22
3. <i>Escherichia coli</i>, Kulturbedingungen und Methoden	25
3.1 Kultur und Stammhaltung	25
3.2 Transformation von <i>E. coli</i>	25
4. DNA-Techniken	27
4.1 Plasmid- und Cosmid-DNA Isolation aus <i>E. coli</i>	27
4.2 Isolation genomischer DNA aus <i>N. crassa</i>	28
4.3 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	29
4.4 Ligation von DNA-Fragmenten	29
4.5 Polymerase Kettenreaktion und verwendete Primer	30
4.6 Southern-blot und Dot-blot Experimente	34
4.7 Markierung von DNA	35
4.8 Screening von DNA-Bibliotheken	36
4.9 DNA-Sequenzierung und Sequenzermittlung von DNA und Proteinen	37
5. RNA-Techniken	39
5.1 Isolation von RNA aus <i>N. crassa</i>	39
5.2 Agarose-Gelelektrophorese von RNA	40
5.3 Northern-blot Experimente	40

III. Ergebnisse

1. Identifikation und molekulare Charakterisierung des <i>cpc-3</i> Gens von <i>N. crassa</i>	42
1.1 <i>N. crassa</i> besitzt eine exprimierte eIF-2α Kinase-charakteristische Sequenz	42
1.1.1 Nachweis einer eIF-2 α Kinase-typischen Sequenz mit Hilfe der PCR	42
1.1.2 Nachweis der identifizierten Sequenz in einem Transkript	47
1.1.3 Nachweis eines single-copy Gens mit der identifizierten Sequenz	49
1.1.4 Genomische Kartierung der identifizierten Sequenz	50
1.2 Ermittlung des vollständigen offenen Leserahmens des <i>cpc-3</i> Gens	51
1.2.1 Subklonierung von DNA-Fragmenten mit <i>cpc-3</i> Sequenzen	51
1.2.2 DNA-Sequenzanalyse des <i>cpc-3</i> Gens	55
1.3 Das postulierte <i>cpc-3</i> Genprodukt ist dem GCN2 strukturell homolog	64
1.3.1 Die eIF-2 α Kinasedomäne	65
1.3.2 Die Histidyl-tRNA Synthetase (HisRS)-ähnliche Domäne	68
1.3.3 Die C-terminale Region	70
1.3.4 Die N-terminale Region	71
2. Untersuchungen zur Funktion des <i>cpc-3</i> Gens in <i>N. crassa</i>	72
2.1 Herstellung einer <i>cpc-3::hph</i> Disruptionsmutante	72
2.1.1 Strategie zur Disruption des Gens und der selektiven Identifikation von Disruptionsmutanten	73
2.1.2 Herstellung eines disruptierten <i>cpc-3</i> Allels	74
2.1.3 Identifikation von <i>N. crassa</i> Transformanden mit disruptiertem <i>cpc-3</i> Allel	76
2.1.4 Herstellung und Überprüfung homokaryotischer <i>cpc-3::hph</i> Disruptionsstämme	78
2.2 Studium der <i>cpc-3::hph</i> Disruptionsmutante	81
2.2.1 Phänotypische Charakterisierung unter regulären Wachstumsbedingungen	81
2.2.2 Studien zur Allgemeinen Kontrolle der Aminosäurebiosynthesen	83
2.3 Untersuchungen zum Wirkort des CPC3 in der Allgemeinen Kontrolle der Aminosäurebiosynthesen	86
2.3.1 Komplementationsstudien	86
2.3.2 Herstellung und Untersuchung von <i>cpc-3, cpc-1</i> und <i>cpc-3, cpc-2</i> Doppelmutanten	87
2.3.3 Transkriptstudien	88
2.3.4 Beeinflusst <i>cpc-3</i> die Translation des <i>cpc-1</i> ?	89

IV. Diskussion

94

Zusammenfassung

103

Summary

105

Literaturverzeichnis

107