

Extrachromosomale DNA-Elemente als Grundlage für die Entwicklung von Vektorsystemen bei Hefen

Inhaltsverzeichnis

A.	Extrachromosomale DNA-Elemente als Grundlage für die Entwicklung von Vektoren bei Hefen	
I.	Einführung	1
II.	Die 2 µm DNA von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
	1. Struktur und Organisation	4
	2. Lokalisation und Replikation	6
	3. Verteilungsmechanismus	7
	4. Anwendung des Verteilungsmechanismus	8
	5. Amplifikationsmechanismus	9
	a. Erhöhung der Kopiezahl durch Rekombination	9
	b. Regulation	11
	6. Auswirkungen des Amplifikationssystems auf 2µm Vektoren	13
	a. Instabilität durch Rekombination	13
	b. Stabilisierung durch Amplifikation	14
	c. Vektoren frei von bakteriellen Bereichen	15
III.	2µm DNA-verwandte Plasmide	15
IV.	3µm Plasmide	16
V.	Killerplasmide bei <i>Kluyveromyces lactis</i>	17
	1. Allgemeine Eigenschaften	17
	2. Überführung der Plasmide in andere Hefen	18
	3. Struktur und Organisation	18
	4. Replikation	21
	5. Killertoxin	22
	a. Struktur und Wirkung	22
	b. Expression	23
	6. Mutationen	24
	7. Verwendung als Vektorsystem	25

VI.	Lineare Plasmide in anderen Hefen	26
VII.	Anwendung von Hefe-Transformationssystemen	27
B.	Konstruktion linearer Vektoren auf der Basis der linearen DNA-Killerplasmide aus <i>Kluyveromyces lactis</i>	
	Einführung und Problemstellung	30
C.	Material und Methoden	33
I.	Material	33
II.	Methoden	35
D.	Ergebnisse	40
1.	Konstruktion von linearen Plasmiden durch <i>in vivo</i> Rekombination	40
2.	Entmischung von Plasmiden	41
a.	Subkultivierung von TL157	41
b.	Transformation mit pLS1 und pLB1	42
3.	Restriktionskartierung von pLS1 und pLB1	43
4.	Ableitung von pLS1 aus pLB1	47
5.	Charakterisierung der Endfragmente	47
a.	Untersuchung auf terminale Proteine	47
b.	Restriktionsfeinkartierung	48
c.	Nachweis Telomer-spezifischer Sequenzen	49
d.	Sequenzanalyse der Endfragmente	49
6.	Lokalisierung von pLS1 und pLB1	51
7.	Konstruktion eines Vektors zur <i>in vivo</i> -Rekombination mit einem zytoplasmatischen <i>LEU2</i> -Gen	53
a.	Vorbereitung des Promotor-Bereichs	53
b.	Fusion des Promotors mit dem <i>LEU2</i> -Gen	55
c.	Einfügen eines Terminatorbereichs	56
8.	Transformation mit dem zytoplasmatischen <i>LEU2</i> -Fragment	58
9.	Physikalische Charakterisierung der linearen Hybridplasmide	59
10.	Stabilitätsuntersuchungen	63
11.	Lokalisierung von pJKL1	66

12.	Transkriptanalyse des zytoplasmatischen <i>LEU2</i> -Gens	67
a.	Transkriptnachweis	68
b.	Kartierung des Transkriptstartpunktes	69
13.	Transformation mit pJKL1	71
E.	Diskussion	74
1.	Rekombination von linearen Plasmiden mit Fremd-DNA	74
2.	Replikation der Plasmide pLS1 und pLB1	75
3.	Lokalisierung der Telomerplasmide pLS1 und pLB1	77
4.	Anheften von Telomerstrukturen	78
5.	Bildung von Telomerplasmiden	83
6.	Inkompatibilität von pLB1 und pLS1 mit pGKL1 und pGKL2	84
7.	<i>In vivo</i> -Rekombination mit dem zytoplasmatischen <i>LEU2</i> -Gen	84
8.	Transkript-Untersuchungen	89
a.	Initiation der Transkription	89
b.	Termination	90
c.	Promotor-Aktivität	91
9.	Transformation	92
10.	Stabilität	93
11.	Eignung als Vektorsystem	94
F.	Zusammenfassung	96
G.	Literatur	98

Anhang: Vorveröffentlichungen