



Doctoral Thesis

Das TRP4-Gen von *Saccharomyces cerevisiae* Klonierung, Struktur und Regulation

Author(s):

Furter, Rolf

Publication Date:

1986

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000360717> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 7977

DAS TRP4-GEN VON SACCHAROMYCES CEREVISIAE:

KLONIERUNG, STRUKTUR UND REGULATION

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften

EIDGENOESSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZUERICH

vorgelegt von

ROLF FURTER

dipl. Natw. ETH

geboren am 20. Juni 1956

von Staufen (Kt. Aargau)

Angenommen auf Antrag von:

Prof. Dr. R. Hütter, Referent

Prof. Dr. H. Hennecke, Korreferent

1986

ZUSAMMENFASSUNG

=====

Struktur, Expression, Regulation und Transkription des TRP4-Gens von Saccharomyces cerevisiae, für die Phosphoribosyltransferase kodierend, wurden untersucht.

Durch funktionelle Komplementation einer trp4-Mutation ist ein 6kb langes RglII-Hefe-DNA-Fragment isoliert worden. Die trp4-komplementierende Aktivität konnte auf einem 2kb langen Sall-EcoRV-Fragment lokalisiert werden (Rigling, 1982). Das isolierte Fragment ist im Hefegenom einmalig und wurde während der Isolierung nicht verändert. Es integrierte durch homologe Rekombination in den TRP4-Lokus auf Chromosom IV.

Die DNA-Sequenz eines 2kb-Fragmentes wurde bestimmt. Der einzige, grosse offene Leseraster kodiert für ein Polypeptid von 380 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 41'370. Die Aminosäuresequenz zeigt in zwei Bereichen hohe Homologie zu den Phosphoribosyl-Transferasen aus Escherichia coli und Bacillus subtilis.

In der Promotorregion wurden auf Grund der Primärsequenz verschiedene Elemente für die basale Expression und für die Regulation postuliert, u.a. ein "UAS"-Element mit der Sequenz TGACTC, für die Regulation unter der "Allgemeinen Kontrolle der Aminosäurebiosynthese".

Die Expression und Regulation von plasmidkodierten TRP4-Derivaten auf der Basis der 2µm-Vektoren pJNR207 und YEp24 unterscheiden sich nicht vom chromosomal kodierten TRP4-Gen. Die erhöhte Expression der Plasmidderivate beruht hauptsächlich auf der erhöhten Gendosis. Das Initiationsmuster der TRP4-Transkripte vom chromosomal und episomal kodierten Gen ist identisch. Für eine Deletionsanalyse am plasmidkodierten TRP4-Gen wurde ein Plasmid verwendet, das für die Phosphoribosyl-Transferase und die Indol-3-glycerolphosphat-Synthase (TRP3) kodiert. Die Indol-3-glycerolphosphat-Synthaseaktivität wurde als interner Standard für die routinemässige Konienzahlabbestimmung verwendet. Die Deletionsanalyse, kombiniert mit den mRNA-Kartierungen zeigte, dass "upstream" der Position -279 (ATG = +1) keine wichtigen Promotorelemente liegen. In der Region -161 bis -127 liegen vermutlich wichtige Sequenzen für die basale Expression.

Die Regulation unter der Allgemeinen Kontrolle der Aminosäure-Biosynthese findet auf transkriptioneller Ebene statt. Die Erhöhung der mRNA-Niveaus beruht auf einer verstärkten Initiation der mRNA. Die Initiation der mRNA unter dereprimierenden Bedingungen findet an Startpunkten statt, die näher beim Startkodon liegen (-31 bis -26; -14 bis -12), als die unter reprimierten Bedingungen verwendeten Startstellen (-127 bis -123). Auf Grund dieses Resultates und Vergleichen über die räumliche Anordnung der Promotorelemente in den HIS-Genen, wurde eine sterische Hinderung der Initiationssequenzen im TRP-Promotor durch das GCN4-Regulatorprotein postuliert.

SUMMARY

=====

Structure, expression, regulation, and transcription of the TRP4 gene of Saccharomyces cerevisiae, encoding the phosphoribosyl transferase, were investigated. A 6kb RglII fragment was isolated by functional complementation of a trp4 strain. The complementing activity was located on a 2kb SalI-EcoRV fragment. This fragment is a genuine fragment of the yeast genome. It was able to integrate by homologous recombination into the TRP4 locus of chromosome IV.

The 2kb fragment was sequenced. The only long open reading frame encoded a polypeptide of 380 amino acids with a calculated molecular weight of 41'370d. In two regions its amino acid sequence shows a high degree of homology to the phosphoribosyl transferases of Escherichia coli and Racilus subtilis. In the promoter region several elements for basal expression and regulation were postulated: apart from several TATA elements also a "TAS" element with the sequence TGACTC was found. This element is necessary for the regulation under the general control of amino acid biosynthesis.

Expression and regulation of plasmidborne TRP4 derivatives of YEp24 or pJDR207 are identical to the chromosomal copy of the gene. The higher expression is mainly due to the gene dosage. The initiation pattern of transcripts is the same for the chromosomally and plasmid encoded TRP4 gene.

For the deletion analysis, done with plasmid-encoded TRP4 gene, a chimeric, TRP3/TRP4-carrying plasmid was used. The TRP3 gene, encoding the Indol-3-glycerolphosphate synthase was used as an internal standard for the routine estimation of copy numbers.

Deletion analysis, supported by S1 mapping data, revealed no important promoter sequences upstream of position -279 (ATG = +1). An essential element for the basal expression seems to be located between -161 and -127. The regulation under the general control acts at the transcriptional level by increasing the rate of initiation. Under derepressing conditions the transcripts are initiated primarily from two start sites near the ATG (-31 to -26; -14 to -12), whereas the start point of mRNA at -127 to -123, which is used under repressed conditions is hardly used anymore. With this result, and with comparative studies of several HIS promoters, a steric blockage of the TRP4 promoter by the GCN4 regulatory protein was postulated.