

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	1
1. Einleitung	1
2. Transposonen in Hyphenpilzen	3
2.1 Klasse 1-Elemente	4
2.2 Klasse 2-Elemente	5
2.2.1 <i>Tc1/mariner</i> -Elemente	5
2.2.2 <i>Fot1/pogo</i> -Elemente	6
2.2.3 <i>hAT</i> -Elemente	7
2.2.4 MITE-Elemente	8
3. Einfluß von Transposonen auf die Struktur und Variabilität von Hyphenpilzgenomen	8
3.1 Sequenzveränderungen nach Exzisionen von DNA-Transposonen	9
3.2 Insertion von Transposonen in Telomer- und Centromerregionen	11
4. „RIP“ und „MIP“: Mechanismen zur Inaktivierung von Transposonen?	12
5. Anwendung von Transposonen als spezifische Markersequenzen	15
6. Zusammenfassung und Ausblick	16
II. Problemstellung	19
III. Material und Methoden	23
1. Material	23
1.1 Stämme	23
1.2 Plasmide	24
1.3 Oligonukleotide	24
1.4 Chemikalien	25
1.5 Enzyme	25
1.6 Nährmedien	26
1.7 Häufig verwendete Puffer	26
2. Methoden	27
2.1 Kulturbedingungen	27
2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	27
2.3 DNA-Transformationen	28
2.4 Selektion putativer Exzisionsereignisse in <i>T. inflatum</i> -Transformanten	29
2.5 Gelelektrophorese	29
2.6 Southern-Blots und DNA/DNA-Hybridisierungen	29
2.7 Radioaktive Markierung von DNA	30
2.8 DNA-Sequenzierung	30
2.9 Oligonukleotid-Synthese	30
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.10.1 Standard-PCR-Reaktionen	30
2.10.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR-Reaktionen	31
2.10.3 Inverse PCR-Reaktionen	31

2.10.4 Asymmetrische PCR-Reaktionen	31
2.11 Auswertung von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	32
2.12 Sicherheitsbestimmungen	32
IV. Ergebnisse	33
1. Molekulare Charakterisierung der untersuchten Stämme	33
1.1 RAPD-Analysen zur Unterscheidung morphologisch einheitlicher Stämme	33
1.2 Sequenzvergleiche zur phylogenetischen Analyse der verschiedenen Stämme	36
1.2.1 Sequenzanalyse des α -Tubulin-Gens	36
1.2.2 Sequenzanalyse der ITS (internal transcribed spacer)-Bereiche der rDNA	39
2. Verbreitung des <i>Restless</i> -Transposons	44
2.1 Southern-Hybridisierungen mit <i>Restless</i> -spezifischen Sonden	44
2.2 Analyse der unvollständigen Kopie <i>Restless</i> -d1 im Stamm <i>B. nivea</i> ATCC 42437	50
2.3 Analyse der das <i>Restless</i> -d1-Element flankierenden DNA-Sequenzen	55
3. Versuche zur Etablierung eines „Transposon Tagging“-Systems mit dem <i>Restless</i> -Element	60
3.1 Herstellung transgener Pilzstämme zur Analyse der Aktivität der <i>Restless</i> -Kopie in dem Vektor pFW128	60
3.2 Phänotypische Detektion putativer Exzisionsereignisse durch Selektion auf Phleomycinresistenz bei ausgewählten <i>T. inflatum</i> -Transformanten	63
3.3 Molekulare Analyse Phleomycin-resistenter Sporenisolate	67
3.3.1 Nachweis veränderter Hybridisierungsmuster nach putativen Exzisionsereignissen	67
3.3.2 Nachweis von Exzisionsereignissen durch PCR und Sequenzanalyse der Exzisionsorte	70
V. Diskussion	73
1. Die untersuchten Pilzstämme der Gattungen <i>Tolypocladium</i> und <i>Beauveria</i> stellen eine sehr eng verwandte Gruppe dar	73
1.1 Die RAPD-PCR ermöglicht eine Unterscheidung der bei Sequenzanalysen nahezu identischen <i>T. inflatum</i> -Gruppe	74
1.2 Anhand von Intronsequenzen aus dem α -Tubulin-Gen kann die <i>T. inflatum</i> -Gruppe von anderen <i>Tolypocladium</i> -Arten abgegrenzt werden	75
1.3 Die Sequenzanalysen der ITS-Bereiche der rDNA bestätigen die taxonomische Einordnung der <i>T. inflatum</i> -Gruppe in die Gattung <i>Tolypocladium</i>	78
1.4 Das <i>Restless</i> -Transposon weist innerhalb der <i>T. inflatum</i> -Gruppe eine diskontinuierliche Verbreitung auf	81

2. Zwei Pilzstämme besitzen <i>Restless</i> -Kopien mit Deletionen des 5'-Bereichs	84
2.1 Das 5'-deletierte Element <i>Restless</i> -d1 weist eine hohe Sequenzdivergenz im Vergleich zu intakten <i>Restless</i> -Kopien auf	86
2.2 Die flankierenden Sequenzen am Insertionsort des <i>Restless</i> -d1-Transposons weisen charakteristische Kennzeichen pilzlicher <i>hAT</i> -Elemente auf	89
2.3 Der Insertionsort des Elements <i>Restless</i> -d1 entspricht einer komplexen Anordnung ineinander-inserterter <i>hAT</i> -Elemente	91
3. Die kloniert vorliegende <i>Restless</i> -Kopie weist in <i>T. inflatum</i> -Stämmen Transpositionsaktivität auf	94
3.1 Der Vektor pFW128 ermöglicht die phänotypische Detektion von Exzisionsereignissen des <i>Restless</i> -Transposons	94
3.2 Putative Reinsertionen der exzisierten <i>Restless</i> -Kopien konnten im Stamm Ti2 detektiert werden	97
3.3 Die Exzisionsraten in den Rezipientenstämmen Ti1, Ti2 und Ti3 zeigen vermutlich keine signifikanten Unterschiede	98
3.4 Exzisionen der klonierten <i>Restless</i> -Kopie sind relativ selten	99
3.5 Die Exzision des <i>Restless</i> -Transposons aus der Plasmidsequenz des Vektors pFW128 erzeugt zwei verschiedene „footprint“-Sequenzmuster	100
VI. Zusammenfassung	106
VII. Literatur	109
VIII. Anhang	124