

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung.....	1
1.1 <i>Claviceps purpurea</i>	1
1.2 Verlauf der Infektion	1
1.3 Enzymatische Hydrolyse von Cellulose	6
1.4 Gezielte Geninaktivierung zur Analyse möglicher Pathogenitätsfaktoren.....	8
1.5 Ploidie bei Pilzen.....	10
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht	13
2.2 <i>Claviceps purpurea</i> -Stämme und ihre Anzucht	13
2.3 <i>Secale cereale</i>	14
2.4 Plasmide	14
2.5 Primer	15
2.6 Chemikalien	16
2.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen.....	17
2.8 Präparation von Nukleinsäuren	18
2.8.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	18
2.8.2 Isolation von Lambda-DNA.....	18
2.8.3 Isolation von Gesamt-DNA aus <i>C. purpurea</i>	19
2.8.4 Isolation von Gesamt-RNA aus <i>C. purpurea</i>	20
2.9 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	20
2.9.1 Gelelektrophorese von DNA.....	20
2.9.2 Gelelektrophorese von RNA.....	21
2.10 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	21
2.11 Screening der chromosomalen EMBL3-Genbank.....	21
2.12 Konstruktion rekombinanter DNA (Klonierungen)	21

2.13	Hybridisierungen	22
2.13.1	Markierung von DNA	22
2.13.2	Southern-Blots und DNA-DNA-Hybridisierungen	23
2.13.3	Northern-Blots und DNA-RNA-Hybridisierungen	23
2.14	DNA-Sequenzierung	24
2.15	Benomylbehandlung von <i>C. purpurea</i> zur Erzeugung von Stämmen mit verändertem DNA-Gehalt	24
2.16	DNA-Gehaltsbestimmungen mit Kernfärbungen	24
2.17	UV-Überlebenskurven	25
2.18	Transformation von <i>C. purpurea</i>	26
2.19	Genetische Reindarstellung der Transformanten	27
2.20	PCR	27
2.20.1	PCR-Reaktion zur Amplifizierung genomischer DNA	27
2.20.2	Transkriptionsnachweis mittels RT-PCR	27
2.21	Plattentests zum Nachweis cellulolytischer Aktivität	28
2.22	Infektion von <i>Secale cereale</i>	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Untersuchungen zur Ploidie von <i>Claviceps purpurea</i>	29
3.1.1	Bestimmung der relativen Kern-DNA-Gehalte verschiedener Benomylisolate von <i>C. purpurea</i>	29
3.1.2	UV-Überlebenskurven	34
3.2	Isolierung eines Cellulase-codierenden Gens von <i>C. purpurea</i>	35
3.2.1	Isolierung einer Cellulase-homologen Region aus einer genomischen Genbank von <i>C. purpurea</i>	36
3.2.2	Nukleotidsequenz des <i>Cell</i> -Gens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz	41
3.2.3	Bestimmung der im Genom von T5 und T5-20.2 vorhandenen <i>Cell</i> -Kopien	49
3.3	Transkription des <i>Cell</i> -Gens von <i>C. purpurea</i>	50
3.3.1	Transkription des <i>C. purpurea Cell</i> -Gens in axenischer Kultur	50
3.3.2	Transkription des <i>C. purpurea Cell</i> -Gens in infizierten Roggenfruchtknoten	53
3.4	Erzeugung <i>cell</i> -negativer Transformanten mit Hilfe homologer Integration	55
3.4.1	Konstruktion des Genausschaltungsvektors p <i>Δcell</i> phleo ^R	55
3.4.2	Transformation von <i>C. purpurea</i> mit p <i>Δcell</i> phleo ^R	56

3.5	Analyse der <i>cell</i> -negativen Transformanten	59
3.5.1	Cellulolytische Aktivität der <i>cell</i> -negativen Transformanten	59
3.5.2	Pathogenitätstests mit <i>cell</i> -negativen Transformanten auf <i>Secale cereale</i>	59
3.6	Komplementation eines <i>cell</i> -negativen Transformanten mit dem intakten Cellulase-Gen	64
3.6.1	Konstruktion des Komplementationsvektors <i>pcellhyg^R</i>	64
3.6.2	Transformation der <i>cell</i> -negativen Transformante 129 mit <i>pcellhyg^R</i>	65
3.6.3	Transkription des <i>Cell</i> -Gens in komplementierten Transformanten	67
4.	Diskussion	69
4.1	Ploidie bei <i>C. purpurea</i>	69
4.2	Sequenzanalysen von <i>cell</i>	71
4.2.1	<i>C. purpurea cell</i> im Vergleich zu anderen pilzlichen Cellulasen	71
4.2.2	Fehlende Substratbindungsdomäne	76
4.2.3	Konservierte Intronpositionen	78
4.3	Transkription des <i>Cell</i> -Gens von <i>C. purpurea</i>	79
4.4	Ausschaltung des <i>Cell</i> -Gens mit homologer Integration	84
4.5	Hinweise auf weitere Cellulase-codierenden Gene bei <i>C. purpurea</i>	86
4.6	Mögliche Funktion von <i>C. purpurea cell</i> während der Infektion von <i>Secale cereale</i>	87
5.	Zusammenfassung	91
6.	Abstract	92
7.	Literatur	93