

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

 1.1 Die Gattung *Claviceps* 1

 1.2 *Claviceps* als Alkaloidproduzent 1

 1.2.1 Struktur und Biosynthese 1

 1.2.2 Eigenschaften 8

 1.2.3 Alkaloide in der Industrie 11

 1.2.4 Regulation und Physiologie der Biosynthese 13

 1.3 Hydrophobine 18

 1.4 Zielsetzung der Arbeit 24

2 Material und Methoden 25

 2.1 Bakterienstämme und ihre Anzucht 25

 2.2 *Claviceps*-Stämme und ihre Anzucht 25

 2.3 Nukleinsäuren 27

 2.4 Chemikalien, Enzyme und Kits 28

 2.5 Häufig verwendete Puffer und Lösungen 29

 2.6 Präparation von Nukleinsäuren 30

 2.6.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E.coli* 30

 2.6.2 Isolation von Lambda-DNA 31

 2.6.3 Isolation von pilzlicher Gesamt-DNA 31

 2.6.4 Isolation von pilzlicher Gesamt-RNA 32

 2.6.5 Isolation von pilzlicher mRNA 33

 2.7 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren 33

 2.7.1 Gelelektrophorese von DNA 33

 2.7.2 Gelelektrophorese von RNA 33

 2.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 33

 2.9 Klonierung von DNA-Fragmenten 33

2.10 Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen	34
2.10.1 Transfer von DNA auf Membranen	34
2.10.2 Transfer von RNA auf Membranen	34
2.11 Hybridisierungen	35
2.11.1 Markierung von DNA	35
2.11.2 DNA-DNA Hybridisierung	35
2.11.3 RNA-DNA-Hybridisierung	35
2.12 Erstellung einer cDNA-Bank	36
2.13 Differentielles cDNA-Bank-Screening	36
2.14 Erstellung einer genomischen Bank	38
2.15 Screening der chromosomalen EMBL3-Genbank von <i>C. purpurea</i>	38
2.16 DNA-Sequenzierung	39
2.17 PCR	39
2.18 Differential Display	40
2.19 Alkaloidbestimmung	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Ansätze zur Identifizierung von Genen, die unter Alkaloidsynthese- Bedingungen induziert sind	42
3.1.1 Differential Display	42
3.1.2 PCR mit Prenyltransferase-Primern	43
3.1.3 Differentielles cDNA-Bank Screening	44
3.1.3.1 Erstellung einer cDNA-Bank	44
3.1.3.1.1 Kultivierung des Pilzes und RNA-Isolation	44
3.1.3.1.2 Erstellung und Analyse der cDNA-Bank	45
3.1.3.2 Differentielle Analyse der cDNA-Bank	46
3.1.3.3 Sequenzierung der cDNA-Fragmente	48
3.1.3.3.1 DMATS-Gen	48
3.1.3.3.2 Streß-Gen	49
3.1.3.3.3 Hydrophobin-Gen	50
3.2 Gründe für den Wechsel des untersuchten <i>Claviceps</i> -Stammes	52
3.3 Isolation und Charakterisierung der unter Alkaloidsynthese-Bedingungen induzierten Gene	56
3.3.1 Isolation der genomischen Kopien	56
3.3.1.1 DMATS	56
3.3.1.1.1 Isolation, Klonierung und Sequenzierung eines genomischen DMATS-Klons aus <i>C. purpurea</i> T5	56

3.3.1.1.2 Isolation, Klonierung und Sequenzierung eines genomischen Klons aus <i>C. purpurea</i> 1029/N5	64
3.3.1.2 Trihydrophobin	70
3.3.2 Kopiezahlbestimmung der isolierten Gene	72
3.3.2.1 DMATS	72
3.3.2.2 <i>cgg-1</i> -homologes Gen	74
3.3.2.3 Trihydrophobin-Gen	75
3.3.3 Einfluß von Phosphat auf die Expression des Trihydrophobin- und des DMATS-Gens von <i>C. purpurea</i> 1029/N5	75
3.3.3.1 Trihydrophobin	76
3.3.3.2 DMATS	78
3.4 Nachbarschaftsanalysen bei den DMATS-Genen	80
4 Diskussion	83
4.1 Sequenz- und Regulationsanalysen	84
4.1.1 Trihydrophobin	84
4.1.2 DMATS	92
4.2 Die stille Kopie der DMATS bei <i>C. purpurea</i> 1029/N5	101
4.3 Nachbarschaftsanalyse der DMATS-Gene	108
4.4 Die isolierten Gene im Kontext der Differenzierung	114
5 Zusammenfassung	123
6 Literaturverzeichnis	124
7 Anhang	141

Danksagung