

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung.....	1
1. Einleitung.....	1
2. Funktionelle Charakterisierung des Transposase-Proteins.....	3
2.1 Struktur des Proteins.....	3
2.2 DNA-Bindung der Transposase.....	5
3. Regulation der Transposition.....	8
3.1 Transkriptionelle Regulation der Transposase-Gen-Expression.....	8
3.2 Einfluss der Transposase-Konzentration auf die Transposition.....	10
3.3 Wirtsspezifische Faktoren.....	11
4. Ausblick.....	13
II. Problemstellung	17
III. Material und Methoden.....	20
1. Material.....	20
1.1 Stämme.....	20
1.2 Nährmedien.....	20
1.3 Plasmide.....	20
1.4 Oligonukleotide.....	22
1.5 Sonden.....	22
1.6 Chemikalien.....	23
1.7 Enzyme.....	23
1.8 Häufig verwendete Puffer.....	23
2. Methoden.....	24
2.1 Kulturbedingungen.....	24
2.2 Isolierung von Nukleinsäuren.....	24
2.3 Transformationen.....	25
2.4 Gelelektrophorese.....	26
2.5 Elution von DNA aus Agarosegelen.....	26
2.6 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA.....	26
2.7 Southern Blots und DNA/DNA-Hybridisierungen.....	26
2.8 Radioaktive Markierung von DNA.....	27
2.9 Oligonukleotid-Synthese.....	27
2.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.11 DNA-Sequenzierung.....	29
2.12 Deletionen mit Exonuklease III / Nuklease S1.....	30
2.13 Auswertung von Nukleotidsequenzen.....	30

2.14 Selektion von <i>Restless</i> -Exzisionsereignissen nach Überexpression des Transposase-Gens aus <i>T. inflatum</i> in <i>P. chrysogenum</i>	30
2.15 Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase-Expression in <i>A. chrysogenum</i>	31
2.16 Digitale Bildbearbeitung	31
2.17 Sicherheitsmaßnahmen	31
IV. Ergebnisse	32
1. Aktivität und Expression des Transposons <i>Restless</i> in <i>Penicillium chrysogenum</i>	32
1.1 Transposonaktivität	32
1.1.1 Kotransformation von <i>P. chrysogenum</i> mit verschiedenen Transposon-Vektoren und Analyse der Transformanten	34
1.1.2 Detektion putativer Exzisionsereignisse durch Selektion auf Phleomycin-Resistenz	36
1.1.3 Molekularer Nachweis von Exzisionsereignissen	38
1.2 Überexpression des Transposase-Gens in <i>P. chrysogenum</i>	41
1.2.1 Konstruktion von Expressionsvektoren	41
1.2.2 Tripletransformation von <i>P. chrysogenum</i> und Analyse der Transformanten	43
1.2.3 Transkriptionelle Expression des Transposase-Gens	45
1.2.4 Alternatives Spleißen des Transposase-Transkriptes	47
1.2.5 Aktivität des Transposons <i>Restless</i> nach Überexpression des Transposase-Gens	49
1.3 Analyse der Transposon-Deletionen	53
2. Regulation der Genexpression in <i>Acremonium chrysogenum</i>	55
2.1 Transkriptionelle Expression des Transposase-Gens in <i>A. chrysogenum</i>	56
2.2 Funktionsanalyse des <i>cefEF</i> -Promotors aus <i>A. chrysogenum</i>	58
2.2.1 Konstruktion von Vektoren zur Reportergenanalyse	58
2.2.2 Kotransformation von <i>A. chrysogenum</i> und Identifizierung von Transformanten	60
2.2.3 Charakterisierung des <i>cefEF</i> -Promotors durch Analyse der Reportergenexpression	62
V. Diskussion	65
1. Das Transposon <i>Restless</i> exzidiert in <i>P. chrysogenum</i>	66
1.1 Die Exzision des Transposons <i>Restless</i> in <i>P. chrysogenum</i> ist ein sehr seltenes Ereignis	66
1.2 Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Faktoren auf die Exzisionsrate des Transposons	69
1.3 Das exzidierte <i>Restless</i> Element erzeugt in <i>P. chrysogenum</i> einen „footprint“	71
1.4 Das exzidierte <i>Restless</i> Element integriert nicht wieder ins Genom	74

2. Das Transposase-Gen des <i>Restless</i> Elementes wird in <i>P. chrysogenum</i> exprimiert.....	76
2.1 Eine gleichzeitige Transformation von drei verschiedenen Vektoren ist in <i>P. chrysogenum</i> möglich.....	77
2.2 Das Transposase-Gen wird in <i>P. chrysogenum</i> und <i>A. chrysogenum</i> transkribiert	78
2.3 In <i>P. chrysogenum</i> findet eine korrekte, jedoch nicht vollständige Prozessierung des <i>Restless</i> -Transkriptes statt	79
2.4 Heterologe Genexpression auf der Basis des <i>phoA</i> -Promotors ist in <i>P. chrysogenum</i> und <i>A. chrysogenum</i> möglich.....	81
2.5 Beide vom Transposase-Gen kodierten Proteine sind für die Transposon-Aktivität notwendig.....	83
2.6 Die Überexpression des Transposase-Gens zeigt keinen Einfluss auf die Aktivität des <i>Restless</i> Elementes.....	86
3. Rekombinationen zwischen direkten Sequenzwiederholungen erzeugen Deletionen im <i>Restless</i> Element	88
4. Durch Deletionsanalysen des <i>cefEF</i> -Promotors aus <i>A. chrysogenum</i> werden regulatorisch wirksame Sequenzbereiche identifiziert.....	90
VI. Zusammenfassung.....	95
VII. Summary	98
VIII. Literatur.....	100
IX. Anhang	119