

Grundlagen, Anwendungen und Möglichkeiten der Stammverbesserung
biotechnologisch relevanter Hyphenpilze durch die Gentechnik:
Integrative Transformation von Aspergillus niger

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Grundlagen, Anwendungen und Möglichkeiten der Stammverbesserung biotechnologisch relevanter Hyphenpilze durch die Gentechnik	
A: Einleitung	1
B: Transformationssysteme bei Hyphenpilzen	2
1. Modellsystem <u>Aspergillus nidulans</u>	2
a) Selektionsmarken und Rezipientenstämme	2
b) Vektorintegration	4
c) Transformationsraten und "Enhancer"	6
d) Stabilität integrierter Vektoren	7
2. Einsatz der Transformation in der Grundlagenforschung	8
a) Isolation und Analyse von Genen und deren Regulation	8
b) Genaustausch	11
3. Einsatz der Transformation in der Biotechnologie	14
a) Sekretion heterologer Proteine mit <u>Aspergillus nidulans</u>	14
b) Stammverbesserung	18
c) Transformation industriell bedeutender Hyphenpilze	19
d) Transformation pflanzenpathogener Hy- phenpilze	22
C: Vergleichende Betrachtung der Gentechnik und klassischer Methoden der Stammverbesserung	25
II. Integrative Transformation von <u>Aspergillus niger</u> : Einleitung und Problemstellung	29
III. Material und Methoden	31
IV. Ergebnisse	37
A: Vektorkonstruktion	37
B: Grundlagen der Transformation von <u>Aspergillus niger</u>	41
1. Allgemeine Charakteristika	41
2. Molekulare Analyse von Transformanten und deren Stabilität	46
3. Expression heterologer Gene in <u>Aspergillus</u> <u>niger</u>	51
a) Transkriptanalyse integrierter Vektoren	52
b) Nachweis der Acetamidase in <u>Aspergillus</u> <u>niger</u> Transformanten	54
c) Nachweis der Hygromycin B-Phosphotrans- ferase in <u>Aspergillus niger</u>	56

C: Einsatz der Transformation zur Aufklärung von Fragestellungen aus der Grundlagenforschung	59
1. Analyse des 5'-Bereichs des <u>amdS⁺</u> -Gens	59
2. Analyse des 3'-Bereichs des <u>amdS⁺</u> -Gens	63
3. Vergleichende Charakterisierung von Transformanten	64
D: Genomanalyse von <u>Aspergillus niger</u>	66
1. Auftrennung der Chromosomen von <u>Aspergillus niger</u>	67
2. Markierung von Chromosomen durch Vektorintegration	72
V. Diskussion	76
A: Transformation von <u>Aspergillus niger</u>	76
1. Einfluß von Stämmen und Selektionsverfahren	76
2. Molekulare Analyse von Transformanten	78
3. Genexpression mittels heterologer Promotoren und Nachweis Vektor-kodierter Proteine	80
B: Einsatz der Transformation zur Aufklärung von Fragestellungen aus der Grundlagenforschung	83
1. Deletionsanalyse des <u>amdS⁺</u> -Gens	83
2. Vergleichende Charakterisierung von Transformanten	87
C: Elektrophoretische Trennung der Chromosomen von <u>Aspergillus niger</u>	89
D: Ausblick	96
VI. Zusammenfassung	98
VII. Literaturverzeichnis	100
VIII. Anhang	114
Vorveröffentlichungen	114