

---

## Inhaltsverzeichnis

		Seite
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1.	Die Codierungskapazität linearer Plasmide	1
1.2.	Replikation und terminale Proteine linearer DNAs	3
1.3.	Funktion linearer Plasmide	7
1.4.	Interaktion linearer Plasmide mit mitochondrialer DNA	9
1.5.	Lineare Plasmide von <i>Claviceps purpurea</i>	9
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	12
2.1.	Bakterienstämme und ihre Anzucht	12
2.2.	<i>Claviceps purpurea</i> -Stämme und ihre Anzucht	12
2.3.	Plasmide	13
2.4.	Primer	13
2.5.	Chemikalien und Enzyme	14
2.6.	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	15
2.7.	Präparation von Nukleinsäuren	15
2.7.1.	Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	15
2.7.2.	Isolation von mitochondrialer DNA aus <i>Claviceps purpurea</i>	15
2.7.3.	Schnellverfahren zur DNA-Isolation aus <i>Claviceps purpurea</i>	15
2.7.4.	Isolation von mitochondrialer RNA aus <i>Claviceps purpurea</i>	16
2.7.5.	Isolation von Gesamt-RNA aus <i>Claviceps purpurea</i>	16
2.8.	Konstruktion rekombinanter DNA (Klonierungen)	16
2.9.	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	17
2.9.1.	Gelelektrophorese von DNA	17
2.9.2.	Gelelektrophorese von RNA	17
2.10.	Hybridisierungen	17
2.10.1.	Markierung von DNA	17
2.10.2.	Southern-Blots und Hybridisierungen	17
2.10.3.	Herstellung strangspezifischer RNA-Sonden	18
2.10.4.	Northern-Blots und Hybridisierung	18
2.11.	Transkriptstartpunkt-Bestimmung	18
2.12.	PCR-Experimente	19
2.12.1.	Plasmid-DNA-Nachweis	19
2.12.2.	Transkriptnachweis mittels PCR-Technik	19

---

2.13.	<b>Isolierung und Analyse von Proteinen</b>	19
2.13.1.	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>Escherichia coli</i>	19
2.13.2.	Herstellung von Antikörpern	20
2.13.3.	Präparation von Mitochondrien-Rohextrakten von <i>Claviceps purpurea</i>	20
2.13.4.	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	20
2.13.5.	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine	21
2.13.6.	Isolierung des terminalen Proteins	21
2.13.7.	Jodierung gereinigter Proteine	21
2.13.8.	Komplex-Bildungs-Versuche (Terminales Protein-dNTP)	22
2.14.	Infektion von <i>Secale cereale</i>	22
2.15.	Fusion von <i>Claviceps purpurea</i> -Protoplasten	22
3.	<b>Ergebnisse</b>	24
A:	<b>Molekulare Expressionsanalyse des linearen Plasmides pCIK1</b>	24
3.1.	Analyse der Haupttranskripte	24
3.1.1.	Überprüfung der Strangspezifität	24
3.1.2.	Bestimmung der Transkriptstartpunkte von ORF1 und ORF2	27
3.2.	Proteinnachweis für ORF1 und ORF2 von pCIK1	29
3.2.1.	Expression von Plasmidabschnitten in <i>Escherichia coli</i> und Herstellung von Antiseren	30
3.2.2.	Immunologischer Nachweis der Proteinprodukte von ORF1 und ORF2 von pCIK1 in <i>Claviceps purpurea</i>	33
3.3.	Nachweis zusätzlicher Transkripte von pCIK1	36
3.3.1.	Transkripte im Bereich von ORF1 und ORF2	36
3.3.2.	PCR-Analyse von ORF3	38
3.4.	Codierung des terminalen Proteins von pCIK1	41
3.4.1.	Aufreinigung des terminalen Proteins für die Sequenzierung	42
3.4.2.	Komplex-Bildungs-Versuche	44
3.4.3.	Überprüfung des ORF1 als möglichen, das terminale Protein codierenden Plasmidabschnitt	45
B:	<b>Untersuchungen zur Funktion von pCIK1</b>	48
3.5.	Entstehung und Charakterisierung eines plasmidfreien Derivates vom Stamm K	48
3.6.	Vergleichende Infektionsversuche der <i>Claviceps</i> -Stämme K und K <sup>-</sup>	50

---

3.7.	<b>Versuche zur Übertragbarkeit linearer, mitochondrialer Plasmide zwischen verschiedenen <i>Claviceps</i>-Stämmen</b>	53
3.7.1.	<b>Fusionsexperimente mit <i>Claviceps</i></b>	53
4.	<b>Diskussion</b>	56
<b>A:</b>	<b>Molekulare Analyse von pCIK1</b>	56
4.1.	<b>Expressionsprodukte: Transkripte und Proteine von pCIK1</b>	56
4.1.1.	<b>ORF1- und ORF2-Expressionprodukte</b>	56
4.1.2.	<b>Zusätzliche Transkripte von pCIK1</b>	59
4.2.	<b>Codierung des terminalen Proteins</b>	61
<b>B:</b>	<b>Funktion und Erhaltung von pCIK1</b>	67
4.3.	<b>Funktion des linearen Plasmides pCIK1</b>	67
4.4.	<b>Übertragbarkeit und Erhaltung linearer mitochondrialer Plasmide</b>	69
5.	<b>Zusammenfassung</b>	73
6.	<b>Literatur</b>	75