

2733-4144

BIBLIOTHECA MYCOLOGICA

BAND 147

Molekulare Analysen zur Expression von β -Lactam-Genen bei *Acremonium chrysogenum*

von

MARKUS WALZ

Mit 23 Abbildungen und 11 Tabellen



J. CRAMER

in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung

BERLIN · STUTTGART 1992

Molekulare Analysen zur Expression von β -Lactam-Genen bei *Acremonium chrysogenum*

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung	1
1. Einleitung	1
2. Antibiotika und ihre Produzenten	2
3. Die Biosynthese von β -Lactam-Antibiotika	4
4. Untersuchungen zur Regulation der Antibiotika-Synthese	7
5. Die Evolution der β -Lactam-Biosynthese	11
6. Halbsynthetische Antibiotika	13
7. Zusammenfassung und Ausblick	16
II. Problemstellung	17
III. Material und Methoden	20
1. Material	20
1.1 Organismen	20
1.1.1 Bakterien	20
1.1.2 Pilze	20
1.2 Medien	21
1.3 Plasmide	21
1.4 Chemikalien	21
1.5 Enzyme	22
1.6 Oligonukleotide	22
1.7 Häufig verwendete Puffer	22
2. Methoden	23
2.1 Kulturbedingungen	23
2.1.1 Bakterien	23
2.1.2 Pilze	23
2.2 DNA-Isolierung	23
2.3 RNA-Isolierung	23
2.4 Restriktion von DNA und DNA-Gelelektrophoresen	23
2.5 Southern-Blots und DNA-DNA-Hybridisierungen	23
2.6 Northern-Blots und RNA-DNA-Hybridisierungen	24
2.7 Radioaktive Markierung	24
2.8 DNA-Sequenzierung	24
2.9 Transformation von <i>A. chrysogenum</i>	24
2.10 Bestimmung der mitotischen Stabilität der rekombinanten DNA	24
2.11 Mikrobiologische Bestimmung von Cephalosporin C	25
2.12 Gelelektrophoretische Trennung intakter Chromosomen	25
2.12.1 Präparation intakter Chromosomen	25
2.12.2 Pulsfeld-Gelelektrophorese	25
2.13 Computerprogramme zur DNA-Analyse	26
2.14 Sicherheitsmaßnahmen	26

IV. Ergebnisse	27
1. Genomanalyse durch gelelektrophoretische Trennung von Chromosomen	27
2. Analysen zur Expression von β -Lactam-Genen	33
2.1 Klonierung von β -Lactam-Genen aus <i>A. chrysogenum</i>	33
2.2 Transkriptanalysen von β -Lactam-Genen	35
3. Transformation der <i>Acremonium</i> -Stämme Ac2 und Ac3	37
3.1 Expression des bakteriellen Hygromycin B- Phosphotransferase Gens (<i>hph</i>) in <i>A. chrysogenum</i>	38
3.2 Nachweis rekombinanter DNA in <i>A. chrysogenum</i> -Transformanten	39
4. Amplifizierung des <i>pcbC</i> -Gens	42
4.1 Integrative Transformation zur Erhöhung der Kopiezahl	42
4.2 Karyotyp-Analyse transgener Pilze	44
4.3 Expression des amplifizierten <i>pcbC</i> -Gens	48
5. Sequenzspezifische Integration der Vektor-DNA	52
5.1 Transformation mit unterschiedlichen Vektoren	52
5.2 Nachweis sequenzspezifischer Rekombination	55
5.3 Nachweis des <i>pcbC</i> -Transkriptes	58
V. Diskussion	60
1. Genomanalyse durch gelelektrophoretische Trennung von Chromosomen	60
1.1 Die Anzahl und Größe der Chromosomen variiert in <i>Acremonium</i> -Arten und verwandten Semiproduzenten	61
2. Analysen zur Genexpression von β -Lactam-Genen	65
2.1 Die <i>pcbAB</i> -und <i>pcbC</i> -Gene liegen in <i>A. chrysogenum</i> direkt benachbart vor	65
2.2 Korreliert der Gehalt der <i>pcbC</i> -mRNA mit der Cephalosporin C-Produktivität?	67
3. Transformation von <i>A. chrysogenum</i>	69
3.1 Expression des bakteriellen <i>hph</i> -Gens in <i>A. chrysogenum</i> nach heterologer Integration der rekombinanten DNA	69
4. Die Amplifikation des <i>pcbC</i> -Gens	75
4.1 Methylierungen der rekombinanten DNA können weitestgehend ausgeschlossen werden	75
4.2 Die rekombinante DNA wird in <i>A. chrysogenum</i> in Abhängigkeit vom Integrationsort transkribiert	76
5. Sequenzspezifische Integration der Vektor-DNA	79
5.1 Die Rekombinationsprozesse sind von der Länge der homologen DNA im Vektor abhängig	80
5.2 Das Transkript des <i>pcbC</i> -Gens fehlt in den Transformanten	85
VI. Zusammenfassung	87
VII. Literatur	89
VIII. Anhang	101