

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
2 Theorie.....	3
2.1 <i>Aspergillus niger</i>	3
2.1.1 Taxonomie.....	3
2.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung.....	3
2.2 Genexpression und Regulation in Eukaryonten.....	4
2.2.1 Genexpression.....	4
2.2.2 Genregulation.....	7
2.2.3 Genexpression und -regulation der Glucoamylasesynthese.....	9
2.2.4 Methoden zur Analyse der Genexpression.....	13
2.3 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Echtzeit-PCR).....	14
2.3.1 Funktionsweise.....	14
2.3.2 Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR.....	21
2.4 Normalisierung von Genexpressionsdaten.....	25
2.5 Bestimmung von Referenzgenen.....	28
3 Material und Methoden.....	31
3.1 Verwendeter Stamm <i>A. niger</i> AB1.13.....	31
3.2 Modellprotein und -transkript.....	31
3.3 Kultivierungsbedingungen.....	32
3.4 Kultivierungsbegleitende Analytik.....	34
3.4.1 Bestimmung der Biotrockenmasse.....	34
3.4.2 Bestimmung der Glucoamylaseaktivität.....	34
3.4.3 Konzentrationsbestimmung von Kohlenstoffquellen.....	35
3.5 Probenvorbereitung.....	36
3.5.1 Probennahme.....	36
3.5.2 Zellaufschluss.....	37
3.5.3 DNA-Aufreinigung.....	37
3.5.4 RNA-Aufreinigung.....	38
3.5.5 Reverse Transkription zur cDNA-Synthese.....	38
3.6 Sequenzsuche.....	40

3.7	Primerdesign	42
3.8	Echtzeit-PCR.....	45
3.8.1	Protokoll der qualitativen PCR.....	45
3.8.2	Herstellung der Standards für die Kalibrierung.....	46
3.8.3	Protokoll der quantitativen Echtzeit-PCR.....	48
3.8.4	Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten.....	49
3.8.5	mRNA-Quantifizierung durch Echtzeit-PCR	52
3.9	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	53
3.10	Schmelzpunktanalyse	53
3.11	Agarosegel-Elektrophorese	54
3.12	Datenverarbeitung zur Auswahl von Referenzgenen	55
4	Ergebnisse	57
4.1	Entwicklung und Optimierung einer Methode zur Genexpressionsanalyse mittels Echtzeit-PCR	57
4.1.1	Probenaufbereitung.....	58
4.1.2	Reverse Transkription (RT).....	64
4.1.3	Echtzeit-PCR	64
4.1.4	Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten.....	66
4.1.5	Reproduzierbarkeit der Genexpressionsanalyse	68
4.2	Bezugssysteme zur Normalisierung von Echtzeit-PCR-Daten.....	71
4.3	GlaA-Genexpression bei verschiedenen Kultivierungsstrategien	89
4.3.1	Batch-Kultivierung mit Xylose und ohne Induktion.....	90
4.3.2	Batch-Kultivierung mit Xylose und Induktion durch Maltosepuls	91
4.3.3	Fedbatch-Kultivierung mit Induktion durch Glucose zu Kultivierungsbeginn	94
4.3.4	Vergleich der Kultivierungen hinsichtlich der <i>glaA</i> - Transkriptmenge.....	96
4.3.5	Untersuchung zur Rückkopplungshemmung der Glucoamylasessynthese	98
5	Zusammenfassung	103
6	Anhang	107
6.1	Verwendete Geräte, Kits und Chemikalien	107
6.2	Zusammensetzung verwendeter Lösungen	110
6.3	Formeln und Deffinitionen.....	112
6.4	Abkürzungsverzeichnis	113
7	Literaturverzeichnis.....	116