

1 Einleitung

Der filamentöse Pilz *Aspergillus niger* ist nicht nur als Saprophyt im Naturkreislauf ökologisch bedeutsam, sondern wird auch seit vielen Jahren zur industriellen Produktion von Citronensäure und Proteinen eingesetzt. *A. niger* ist dabei nicht nur für die Produktion von homologen Proteinen interessant, sondern gewinnt zunehmend für die biotechnologische Herstellung von heterologen Proteinen an Bedeutung. Ein wesentlicher Grund hierfür ist die Fähigkeit dieses Pilzes, Proteine mit einer sehr hohen Effizienz zu sekretieren. Dies ist auch ein Grund, weshalb gerade das in *A. niger* effiziente Glucoamylase-expressionssystem zur Herstellung von heterologen Proteinen von großem Interesse ist. Dieses Expressionssystem hat außerdem den Vorteil, dass es durch einen starken und induzierbaren Promotor kontrolliert wird.

Die Ausbeuten solcher biotechnologischen Produktionsprozesse können allerdings sehr gering ausfallen, was die Entwicklung von Verfahren zur Optimierung der Produktivität erfordert. In der industriellen Biotechnologie wird zur Herstellung von verschiedenen Stoffen mit diesem Pilz oft nur das Endergebnis, d.h. die gewonnene Menge an Produkt für die Optimierung der Produktausbeuten herangezogen. Neue molekularbiologische Analysemethoden ermöglichen zusätzlich die Betrachtung verfahrensrelevanter Prozesse auf molekularer Ebene. Hier besteht die Möglichkeit, die Bildung des biotechnologisch interessanten Produktes im Mikroorganismus selbst bereits auf genetischer Ebene zu betrachten und auftretende Limitierungen in der Zelle auf Ebene der Transkription über die Menge an spezifischer mRNA aufzuklären.

Um nun solche transkriptionellen Veränderungen zu untersuchen, werden sehr sensitive und leistungsstarke Methoden benötigt. Eine solche Methode stellt die

Echtzeit-PCR dar, welche seit einigen Jahren in vielen Bereichen, wie der medizinischen Diagnostik, routinemäßig angewandt wird und nun auch hier für Genexpressionsstudien in *A. niger* eingesetzt werden soll. Dabei ist besonders das für die Industrie interessante Glucoamylaseexpressionssystem unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen des Pilzes zu untersuchen, um noch unbekannte Regulationsmechanismen aufzudecken und eventuelle Limitierungen auf dem Weg von der mRNA bis hin zur Bildung des Proteins festzustellen und den Kultivierungsprozess mit dem Ziel einer höheren Ausbeute anzupassen. Im Falle des Expressionssystems der Glucoamylase wurde bereits vor Jahren festgestellt, dass die Menge an *glaA*-mRNA mit der Menge an gebildeter Glucoamylase korreliert. Aufgrund dessen kann hier zusätzlich durch die Menge an mRNA eine Aussage über die zu erwartende Menge an Protein getroffen und bereits an dieser Stelle der Genexpression mit Optimierungsstrategien angesetzt werden.

Um eine exakte Quantifizierung der sehr empfindlichen mRNA-Moleküle zu gewährleisten, müssen die Arbeitsschritte von der Probenahme über den Zellaufschluss und die RNA-Aufreinigung bis hin zur Quantifizierung mittels Echtzeit-PCR hinsichtlich der Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Messung optimiert werden. In dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, um spezifische mRNA von *A. niger* mittels Echtzeit-PCR zu quantifizieren. Da die korrekte Quantifizierung von mRNA durch viele Parameter, wie Verluste von RNA während der Aufreinigung sowie Effizienzunterschiede bei der für die PCR erforderliche cDNA-Synthese und Echtzeit-PCR selbst beeinflusst wird, wurde nach einem Bezugssystem gesucht, welches die gleichen Arbeitsschritte durchläuft wie die zu quantifizierende mRNA. Hierfür wurde die Gesamt-RNA als Bezugssystem eingesetzt und deren Brauchbarkeit untersucht. Ein weiteres Bezugssystem stellen Gene dar, die sich durch einen stabilen Expressionslevel auszeichnen. Hier wurden zehn Gene aus der Fraktion der Housekeeping-Gene von *A. niger* mittels Echtzeit-PCR analysiert und ihre Eignung nach Vandesompele et al. [1] bestimmt.

2 Theorie

2.1 *Aspergillus niger*

2.1.1 Taxonomie

Aspergillus niger ist ein Schimmelpilz der Gattung *Aspergillus*. Dieser Eukaryont gehört zu den höheren Pilzen (Eumyceten) und zur Gruppe der Deuteromycetes. Der Vegetationskörper gliedert sich in einzelne Hyphen, die sich vielfach verzweigen. Diese Hyphen bestehen aus dem Cytoplasma sowie dessen Einschlüssen und sind von einer festen Zellwand umschlossen. Ihre Zellwand setzt sich unter anderem aus Polysacchariden, Chitin und Chitin-Glucankomplexen zusammen, was der Zelle eine hohe Stabilität gegenüber mechanischer Beanspruchung verleiht [2]. Die Gesamtheit dieser Pilzhypen wird als Myzel bezeichnet. Die Vermehrung von *A. niger* erfolgt asexuell durch Sporenbildung, dabei werden an den Enden der Hyphen so genannte Konidiosporen abgeschnürt, die auskeimen und ein Myzel bilden können [3].

2.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Filamentöse Pilze haben in der Biotechnologie eine große wirtschaftliche Bedeutung, unter anderem bei der Herstellung von Antibiotika, Enzymen, organischen Säuren und Polysacchariden [4]. *Aspergillus niger* ist bekannt als der wichtigste Citronensäureproduzent und wird bereits seit 1919 zur Produktion dieser organischen Säure eingesetzt. Dabei stellt die Citronensäure das am häufigsten verwendete Säuerungsmittel in der Lebensmittelindustrie dar, was ihre

und damit die wirtschaftliche Bedeutung von *A. niger* deutlich macht. Extrazelluläre Enzyme, wie beispielsweise Pektin spaltende Enzyme, Proteasen und Glucoamylase, werden ebenfalls von *A. niger* effizient synthetisiert. Die Glucoamylase spielt dabei vorwiegend in der Stärke verarbeitenden Industrie eine große Rolle. *A. niger* ist als gesundheitlich unbedenklich eingestuft, dieser Pilz besitzt den so genannten GRAS-Status (engl., **g**enerally **r**egarded **a**s **s**afe) und ist somit als Produzent für pharmazeutische Produkte und Lebensmittelzusätze geeignet.

Für eine Verbesserung der Produktivität dieser Pilzstämmen werden neben den klassischen Methoden vermehrt gentechnische Methoden eingesetzt, um so genannte rekombinante Stämme zu erhalten. Diese modifizierten Stämme sind in der Lage, pilzeigene (homologe) native Proteine vermehrt zu produzieren. Weitere neue Techniken wie die Klonierung ermöglichen die Transformation fremder Gene in das Genom dieser Eukaryonten, was die Produktion von pilzfremden (heterologen) nativen Proteinen ermöglicht. Ein wesentlicher Vorteil gegenüber prokaryontischen Expressionssystemen ist hier die Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation von Proteinen, welche für die Stabilität und Aktivität von Proteinen wichtig ist. Außerdem werden Proteine von diesen filamentösen Pilzen effizient sekretiert, was die Gewinnung und Aufreinigung dieser Stoffe wesentlich erleichtert.

2.2 Genexpression und Regulation in Eukaryonten

2.2.1 Genexpression

Genexpression ist die Umsetzung der in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) enthaltenen genetischen Information eines Gens zur Bildung eines Proteins. Die DNA-Moleküle einer Zelle bestehen aus unverzweigten Polynukleotid-Ketten und bilden einen Doppelstrang. Dabei setzt sich jeder Einzelstrang aus einer

Kombination von vier verschiedenen Nukleotiden zusammen. Diese bestehen jeweils aus einer Desoxyribose-(Zucker) Einheit, einer Phosphatgruppe am 5'-C-Atom des Zuckers und einer am 1'-C-Atom des Zuckers gebundenen Stickstoffbase (Guanin (G), Adenin (A), Cytosin (C), Thymin (T)). Dabei bilden die außen liegenden Zucker-Phosphat-Einheiten das Rückrat des DNA-Moleküls.

Die Genexpression beginnt zunächst mit der Transkription, bei welcher die Übertragung der Desoxyribonukleotidsequenz eines Gens in die mRNA-Sequenz erfolgt. Die mRNA besteht aus einem Nukleinsäurestrang und ebenfalls aus den vier Nukleotiden wie die DNA, allerdings ist hier statt der Stickstoffbase Thymin die Stickstoffbase Uracil enthalten.

Die Übersetzung der kodierenden Sequenz eines Gens in die RNA, also die Transkription, wird von DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert, zu denen unter anderen die RNA-Polymerase II zählt, welche die Synthese der mRNA katalysiert. Hierfür bindet dieses Enzym zunächst in einer Region der DNA, die als Promotor bezeichnet wird und bei der Steuerung der Transkription eine wesentliche Rolle spielt (siehe Kapitel 2.2.2). Die Bindungsaffinität der RNA-Polymerase zum Promotor wird dabei in den meisten Fällen von mehreren, miteinander agierenden Transkriptionsfaktoren beeinflusst, wobei zusätzliche Faktoren diesen Vorgang fördern oder hemmen und somit die Transkription kontrollieren. Nach Bindung der RNA-Polymerase entwindet diese die DNA-Doppelhelix in einem Bereich von ca. 12 bp um den Transkriptionsstartpunkt herum und beginnt mit der Synthese eines RNA-Stranges, während sie sich am DNA-Strang entlang bewegt. Dabei werden komplementär zur jeweiligen DNA-Matrize in 5'-3'-Richtung Nukleotide an das 3'-Ende des wachsenden RNA-Moleküls angefügt. Dieser Vorgang wird als Elongation (lat., longus, „lang“) bezeichnet. Generell kann ein einzelnes Gen gleichzeitig von mehreren RNA-Polymerasen abgelesen werden, was die Anzahl der, innerhalb eines Zeitraumes gebildeten mRNA-Moleküle vergrößert und der Zelle ermöglicht, ein bestimmtes Protein in großen Mengen zu synthetisieren [5]. Die Transkriptionsrate eines bestimmten Gens hängt dabei vom Typ, der Menge und der Leistung der

beteiligten Transkriptionsfaktoren ab [6]. Dabei spielt die Kombination aus stimulierenden und inhibierenden spezifischen Faktoren eine wichtige Rolle. Der Prozess der Transkription setzt sich so lange fort, bis die RNA-Polymerase eine bestimmte Basensequenz der DNA, die Terminationsstelle, erreicht hat, welche das Signal zur Beendigung der Anlagerung von Nukleotiden an den wachsenden RNA-Strang enthält. Hier erfolgt zunächst die Freisetzung der prä-mRNA. Bevor das RNA-Molekül den Zellkern als fertige mRNA verlässt, wird sie noch weiterverarbeitet (prozessiert). Diese Prozessierung der eukaryontischen mRNA umfasst mehrere Schritte, die bereits während des Transkriptionsprozesses erfolgen. So wird beim Start der Transkription die endständige Base am 5'-Ende über eine 5'-5'-Triphosphatgruppe mit Methylguanosin verknüpft. Diese so genannte cap-Struktur schützt die mRNA vor Abbau an diesem Ende und erleichtert unter anderem den späteren Transport der mRNA in das Cytoplasma. Weiterhin besitzen die meisten prä-mRNA-Moleküle einen Poly-A-Schwanz, der aus 150–250 Adenosin-Molekülen besteht und durch eine Poly-A-Polymerase an das 3'-Ende des Moleküls angefügt wird. Diese Polyadenylierung hat ebenfalls einen Einfluss auf die Stabilität und die Stärke der Expression von mRNA-Molekülen.

Die meisten Gene von Eukaryonten enthalten auch nicht-kodierende Bereiche, sogenannte Introns, die zwischen kodierenden DNA-Sequenzen liegen. Diese Introns werden im Zuge der prä-mRNA-Prozessierung mit Hilfe von speziellen Kernproteinen (snRNP, engl.: **s**mall **n**uclear **r**ibonucleoproteins) entfernt. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und erfolgt bereits während der Transkription dieser mRNA-Moleküle. Danach wird die reife mRNA in das Cytoplasma transportiert, wo die Übersetzung der in der RNA-Sequenz enthaltenen Information in die Aminosäuresequenz stattfindet. Dazu wird die mRNA von zwei ribosomalen Untereinheiten gebunden, und durch Interaktion mit anderen RNA-Molekülen (tRNA, rRNA) und ribosomalen Proteinen erfolgt die Übersetzung der in der mRNA enthaltenen Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz, welche teilweise noch modifiziert und gefaltet wird, was letztlich zu einem funktionsfähigen Protein führt.

2.2.2 Genregulation

Um auf äußere Veränderungen, wie beispielsweise auf wechselnde Nahrungsangebote, reagieren zu können, müssen Organismen ihre zellulären Prozesse an die jeweiligen Bedingungen anpassen, wobei unterschiedliche biochemische Reaktionen ausgelöst werden. Die Art und Geschwindigkeit dieser zellulären Prozesse werden auf der genetischen Ebene durch die Kontrolle der Aktivität bestimmter Gene reguliert. Die Regulation der Genexpression kann prinzipiell auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden. Auf der Ebene der DNA hängt die Aktivität eines Gens beispielsweise vom organisatorischen Zustand der DNA ab. Auf RNA-Ebene wird die Aktivität eines Gens über den Zeitpunkt des Beginns und die Häufigkeit der Transkription bestimmt. Dabei wirkt sich die Regulation der Transkription am stärksten auf die Genexpression aus. Hier erfolgt die Kontrolle über die Bindung von Regulatorproteinen an bestimmte DNA-Sequenzen. Die Funktion dieser DNA-Sequenzen wurde bereits von F. Jacob und J. Monod in den 60er Jahren in prokaryontischen Zellen erforscht [7]:

1. Promotor: DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens gesteuert wird. Hier erfolgt die Bindung der RNA-Polymerase zur Initiation der Transkription.
2. Operator: Regulationselement von Transkriptionseinheiten, an das Regulatorproteine (Aktivatoren und Repressoren) binden können.
3. Enhancer: DNA-Sequenz, an die aktivierende Faktoren binden und dadurch die Transkription eines Gens steigern.

Proteine, die an diese Elemente binden, können einerseits die Transkription begünstigen (Induktoren) oder unterdrücken (Repressoren).

Das Spleißen der mRNA trägt ebenfalls zur Genregulation bei. So können beispielsweise Transkripte von eukaryontischen Genen auf unterschiedliche

Weise zu verschiedenen mRNA-Molekülen gespleißt werden (alternatives Spleißen). Dadurch können aus einem Gentranskript verschiedene Proteine synthetisiert werden. Die Genexpression wird zusätzlich über den Transport der mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in das Cytoplasma reguliert. Der Transport der mRNA wird durch den Kernporenkomplex kontrolliert und ist hoch selektiv. Bei diesem Vorgang werden ausschließlich mRNA-Moleküle aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert, die vollständig prozessiert wurden.

Eine weitere Kontrolle der Genexpression findet auf posttranskriptioneller Ebene statt. Hierbei spielt unter anderem die mRNA-Stabilität eine wichtige Rolle. Die Lebensdauer von mRNA bestimmt die Syntheserate des zugehörigen Proteins. Die mRNA-Moleküle weisen dabei je nach Sequenz und Syntheserate des darin verschlüsselten Proteins eine unterschiedliche Halbwertszeit von wenigen Minuten bis mehr als 10 Stunden auf. So können zum Beispiel mit Adenin- und Uracil-Nukleotiden angereicherte Sequenzen im nicht-translatierten 3'-Abschnitt der mRNA-Sequenz den Abbau des Poly-A-Schwanzes, welcher das mRNA-Molekül an diesem Ende vor enzymatischem Abbau schützt, begünstigen. Weiterhin unterliegt die mRNA einem an die Translation gekoppelten selektiven Abbau. Zusätzlich ist die Länge des Poly-A-Schwanzes der mRNA wichtig für die Stabilität dieser Moleküle. Dabei wird die Länge der Poly-A-Sequenz entweder durch selektive Poly-A-Anheftung oder durch selektive Poly-A-Entfernung durch bestimmte Enzyme reguliert. Der Abbau dieser Poly-A-Nukleotide erfolgt dabei, sobald die mRNA ins Cytoplasma gelangt ist. Des Weiteren findet die Kontrolle der Genexpression bei der Übersetzung der mRNA in die Aminosäuresequenz statt. Hierbei erfolgt die Regulation über die Menge der translatierten mRNA-Moleküle und auf Proteinebene durch Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen nach ihrer Synthese [5].

Eine Ausnahme bei der Genregulation bilden solche Gene, die beispielsweise für Strukturmoleküle oder für Enzyme des Intermediärstoffwechsels kodieren. Da die Produkte dieser Gene ständig in gleich bleibender Menge der Zelle zur Verfügung

stehen müssen, werden die entsprechenden Gene weitgehend unabhängig von anderen Einflüssen auf relativ konstantem Niveau transkribiert.

2.2.3 Genexpression und -regulation der Glucoamylasesynthese

Das Enzym Glucoamylase (EC 3.2.1.3) gehört zur Hauptklasse der Hydrolasen und spaltet Stärke durch Hydrolyse der α -1,4-, α -1,6- und α -1,3-Bindung am nicht reduzierten Ende des Stärkemoleküls. Höhermolekulare Verbindungen werden dabei von diesem Exoenzym eher hydrolysiert als solche mit niedrigerem Molekulargewicht [6]. Dieses Enzym wird von dem Pilz *A. niger* als homologes Protein synthetisiert und wie oben beschrieben zur Hydrolyse von Polysacchariden eingesetzt, um die dabei frei werdende Glucose für seinen Stoffwechsel verfügbar zu machen. *A. niger* bildet zwei Formen der Glucoamylase (GA): GA1 und GA2 [8]. Für GA1 wurde ein Molekulargewicht von 85,3 kDa und für GA2 von 77,6 kDa ermittelt [9]. Beide Enzyme besitzen gleiche Eigenschaften hinsichtlich ihres pH-Wert-Optimums und ihrer Temperaturstabilität [10].

Die GA2 unterscheidet sich von der GA1 durch ihre unvollständige Stärke bindende Domäne. Aufgrund dessen weist GA1 gegenüber nicht-löslicher Rohstärke eine sehr viel höhere Aktivität auf als GA2, welche keine oder nur sehr geringe Aktivität gegenüber diesem Substrat aufweist [10]. Bei der Aktivität gegenüber löslicher Stärke als Substrat gehen die Meinungen in der Literatur auseinander. Hier wird einerseits von einer ähnlichen Aktivität der beiden Enzymformen gegenüber löslicher Stärke und andererseits von einer höheren Aktivität der GA1 gegenüber diesem Substrat berichtet [10]. Zu Di- und Trisacchariden weisen beide Formen fast identische Aktivitäten auf [11].

Das Gen *glaA*, welches für die Glucoamylase kodiert, wurde von Boel et al. [12] aus *A. niger* isoliert und charakterisiert sowie die Herkunft der beiden Formen dieses Enzyms erklärt. Mittels Southern-Blot-Analysen konnte gezeigt werden,

dass die DNA des Pilzes eine Kopie des *glaA*-Gens enthält und der kodierende Sequenzbereich aus 1920 Nukleotiden besteht. Ein Vergleich der DNA und cDNA, synthetisiert aus *glaA*-mRNA, ergab, dass in der kodierenden Sequenz vier kurze (50-75 bp) und eine größere (169 bp) intervenierende Sequenz (Intron) enthalten sind, welche die kodierende Sequenz unterbrechen. Hier wurde gezeigt, dass aus einem *glaA*-Gen zwei Arten von Transkripten (mRNA) entstehen, die sich in Teilen ihrer Sequenz und der Anzahl an Basenpaaren unterscheiden. Eine Art der mRNA Transkripte enthält nach dem Spleißen noch die 169 bp lange Intronsequenz, während diese in den anderen Transkripten fehlt [13]. Daraus schlussfolgerten Boel et al. [12], [13], dass es sich in diesem Fall um zwei unterschiedliche Spleißvorgänge handeln muss und die kleinere *glaA*-mRNA, welche diese Intronsequenz nicht mehr enthält, durch alternatives (differentielles, reguliertes) Spleißen entstanden ist. Im Gegensatz dazu wird vorgeschlagen, dass die GA2 posttranslational durch die Wirkung spezifischer Proteasen aus GA1 hervorgeht [14].

Die Kontrolle der Glucoamylasesynthese erfolgt hauptsächlich auf Transkriptions-ebene durch einen starken und induzierbaren Promotor im *glaA*-Gen [15]. Die Funktionsanalyse des Glucoamylase-Promotors von *A. oryzae* ergab, dass innerhalb der Promotorsequenz zwei Regionen, welche ebenfalls bei *A. niger* analysiert wurden, für einen hohen Expressionslevel des *glaA*-Gens in Anwesenheit von Stärke (Polysaccharid) und Maltose (Disaccharid) verantwortlich sind. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass nicht Stärke, sondern die Abbauprodukte, welche aus der Stärkehydrolyse resultieren, für die Induktion dieses Promotors Ausschlag gebend sind [16]. Das Grundprinzip der Regulation der Synthese und Sekretion von Polymer abbauenden Enzymen wurde von Hodmann und Visser beschrieben [17]. Hier wird angenommen, dass eine geringe Menge dieser Enzyme konstitutiv gebildet und ins Medium sekretiert wird. In Gegenwart des jeweiligen Polymers kommt es zur Abspaltung von so genannten Signalmolekülen, welche innerhalb der Zelle als Induktoren wirken und die vermehrte Expression und Sekretion Polymer abbauender Enzyme bewirken [17]. Dieser Mechanismus konnte speziell bei der Expression des *glaA*-Gens festgestellt werden, da die Genexpression unter Kontrolle des *glaA*-