



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences

Klonierung und rekombinante Expression von eGFP in *Pichia pastoris*

Bachelor Thesis
Bachelorstudiengang
Autor:
Daniel Goetz
Matrikelnummer [REDACTED]

Hamburg
14.03.2019

Erstgutachter: Prof. Dr. Stephan Noll
(HAW Hamburg)
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen
(HAW Hamburg)

Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg
Fakultät Life Sciences
Department Biotechnologie
Ulmenliet 20
21033 Hamburg

Autor:
Daniel Goetz
Matrikelnummer [REDACTED]
[REDACTED]

Erstgutachter: Prof. Dr. Stephan Noll (HAW Hamburg)
Zweitgutachterin: Prof. Dr. Gesine Cornelissen (HAW Hamburg)

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt und durch meine Unterschrift, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig, ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Inhalte und Passagen, die aus fremden Quellen stammen und direkt oder indirekt übernommen worden sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Ferner versichere ich, dass ich keine andere, außer der im Literaturverzeichnis angegebenen Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich sowohl auf Textinhalte, sowie auf alle enthaltenden Abbildungen, Skizzen und Tabellen. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Ort, Datum

Unterschrift (Daniel Goetz)

Abstract

Pichia pastoris ist ein seit Jahrzehnten verwendeter Expressionsorganismus für die Produktion von rekombinanten Proteinen und wird sowohl in der Forschung, als auch in der Industrie verwendet. Das Ziel dieser Arbeit war es, einen *Pichia pastoris* Expressionsstamm zu konstruieren, der das rekombinante Protein eGFP produziert. Gesteuert werden sollte die Genexpression über den induzierbaren AOX1 Promotor. Im Rahmen dieser Arbeit war es erforderlich, einen geeigneten Expressionsvektor zu klonieren. Dazu wurde das Golden Gate Klonierungsverfahren verwendet. Das Transformieren der *Pichia* Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Die Integration der Genkassette an die gewünschte Position im Hefegenom wurde mittels PCR überprüft und durch Sequenzierung bestätigt. Molekularbiologisch überprüfte Klone wurden für eine *small-scale* Kultivierung verwendet. Die funktionale Kontrolle erfolgte dann über eine SDS-PAGE und eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung. Dabei konnte der Nachweis erbracht werden, dass eGFP intrazellulär nach der Induktion vorliegt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1. Rekombinante Proteine in der Biotechnologie	1
1.2. Das Expressionssystem <i>Pichia pastoris</i>	1
1.2.1. Expressionsvektoren und <i>Pichia pastoris</i> Stämme	2
1.2.2. Der Methanol-Metabolismus von <i>Pichia pastoris</i>	3
1.2.3. AOX1 und AOX2	4
1.3. <i>Green fluorescent protein</i>	5
1.4. Ziel der Arbeit	6
2. Material	8
2.1. Geräte	8
2.2. Chemikalien	10
2.3. Bakterien- und Hefestämme	11
2.4. Plasmide	11
2.5. Primer	12
2.6. Enzyme, Ladepuffer und DNA-Ladder	13
2.7. Medien und Lösungen	14
3. Methoden	17
3.1. Absorptionsmessung zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren . .	17
3.2. PCR	17
3.3. Golden Gate Klonierung	20
3.4. Isolierung und Extraktion von DNA	21
3.4.1. Isolierung und Aufreinigung des Zielvektors pBSY2Z	21

3.4.2. Vervielfältigung und Isolierung von <i>high-copy-number</i> Plasmiden aus <i>E. coli</i>	21
3.4.3. Extraktion von DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.4.4. Extraktion genomischer <i>Pichia pastoris</i> DNA	22
3.5. Gelelektrophoresen	22
3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese	22
3.5.2. SDS-PAGE	22
3.6. DNA-Sequenzierung	23
3.7. Anzucht von Mikroorganismen	23
3.7.1. Herstellung von elektrokompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen	23
3.7.2. Herstellung von elektrokompetenten <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	24
3.7.3. Transformation durch Elektroporation	25
3.7.4. Elektroporation von <i>E. coli</i>	25
3.7.5. Plasmid-Linearisierung	25
3.7.6. Elektroporation von <i>Pichia pastoris</i>	26
3.7.7. <i>small-scale</i> Kultivierung	27
3.7.8. Zellaufschluss der <i>Pichia pastoris</i> -Zellen	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Klonierung und Charakterisierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP	28
4.1.1. Überprüfung der Isolierung des Zielvektors pBSY2Z	28
4.1.2. PCR-Amplifikation des <i>eGFP</i> -Gens	29
4.1.3. Ligation des Expressionsvektor pBSY2Z_eGFP	29
4.2. Transformation von <i>Escherichia coli</i>	30
4.2.1. Elektroporation und Selektion	30
4.2.2. Isolierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP	31
4.2.3. Ansequenzierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP	33
4.3. Transformation von <i>Pichia pastoris</i>	34
4.3.1. Überprüfung des linearisierten pBSY2Z_eGFP Vektors	34
4.3.2. Elektroporation und Selektion	35
4.3.3. Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanden	36
4.4. Funktionale Analyse: Expression von intrazellulärem eGFP	37
4.4.1. eGFP Expression in einer <i>small-scale</i> Kultivierung	37
4.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	40
5. Diskussion	42
5.1. Klonierung	42
5.2. <i>Pichia pastoris</i> als Expressionssystem	43

5.3. Fazit und Ausblick	45
Literatur	47
A. Anhang	i
A.1. Plasmide	i
A.1.1. pBSY2Z Plasmidkarte und Sequenz	i
A.1.2. pET30_eGFP Plasmidkarte und Sequenz	ii
A.1.3. pBSY2Z_eGFP Plasmidkarte und Sequenz	iii
A.2. eGFP-Proteinsequenz	iii
A.3. Sequenzierungsergebnisse eGFP-Gensequenz	iv
A.3.1. Sequenzierungsreport der <i>eGFP</i> -Gensequenz (Primer 16) .	iv
A.3.2. Sequenzierungsreport der <i>eGFP</i> -Gensequenz (Primer 17) .	vii
A.4. Sequenzanalyse Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> -Locus	ix
A.4.1. Sequenzierungsreport, linke Flanke (Primer 18)	ix
A.4.2. Sequenzierungsreport, linke Flanke (Primer 67)	xii
A.4.3. Sequenzierungsreport, rechte Flanke (Primer 20)	xv
A.4.4. Sequenzierungsreport, rechte Flanke (Primer 21)	xviii
A.5. <i>Alignment eGFP</i> -Gensequenz	xxi
A.5.1. <i>Alignment eGFP</i> -Gensequenz Primer 16	xxi
A.5.2. <i>Alignment eGFP</i> -Gensequenz Primer 17	xxii
A.6. <i>Alignment</i> Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> - Locus	xxiii
A.6.1. <i>Alignment</i> , linke Flanke (Primer 18)	xxiii
A.6.2. <i>Alignment</i> , linke Flanke (Primer 67)	xxiv
A.6.3. <i>Alignment</i> , rechte Flanke (Primer 20)	xxv
A.6.4. <i>Alignment</i> , linke Flanke (Primer 21)	xxvi

Abbildungsverzeichnis

1.1.	Methanol-Metabolismus von <i>Pichia pastoris</i>	4
1.2.	Schematischer Ablauf zur Konstruktion eines <i>Pichia pastoris</i> Expressionsstamm	7
4.1.	Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes <i>pBSY2Z</i>	28
4.2.	Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes <i>eGFP</i>	29
4.3.	Überprüfung des Golden Gate Ansatz mittels Check-PCR auf den Expressionsvektor <i>pBSY2Z_eGFP</i> via Agarose Gelelektrophorese	30
4.4.	Überprüfung der <i>E. coli</i> Klone auf den Expressionsvektor <i>pBSY2Z_eGFP</i>	31
4.5.	Kontrolle der Isolierung des Vektors <i>pBSY2Z_eGFP</i> mittels Midiprep	33
4.6.	Überprüfung der Linearisierung des Expressionsvektors <i>pBSY2Z_eGFP</i>	35
4.7.	Schematische Darstellung der durch Primerpaare entstehenden Flanken am Übergang genomische DNA und integrierten Vektor	36
4.8.	Kontrolle der Sequenzierungs-PCR der linken Flanke des Übergangs genomische und integrierten Vektor innerhalb der <i>pAOX1</i> -Gensequenz	37
4.9.	Kontrolle der Sequenzierungs-PCR der rechten Flanke des Übergangs genomische und integrierten Vektor innerhalb der <i>pAOX1</i> -Gensequenz	37
4.10.	Veranschaulichung <i>small-scale</i> Kultivierung mittels Zeitleiste	38
4.11.	Aufnahme der Zellpellets unter UV-Licht	38
a.	Zellpellet K1 K5 V1, WT	38
b.	Zellpellet K1 K5 V2, WT	38
4.12.	SDS-Page des intrazellulären exprimierten eGFP-Protein nach Zellaufschluss	40
a.	WT, Klone K1 K5 Variante 1	40
b.	WT, Klone K1 K5 Variante 2, GFP	40
4.13.	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme <i>Pichia pastoris</i> -Zellen nach induzierter Proteinexpression	41
a.	Klon 3 V2, UV-Licht	41
b.	Klon 3 V2, sichtbares Licht	41
c.	WT, UV-Licht	41
d.	WT, sichtbares Licht	41
A.1.	<i>pBSY2Z</i> Plasmidkarte und Sequenz	i

A.2. pET30_eGFP Plasmidkarte und Sequenz	ii
A.3. pBSY2Z_eGFP Plasmidkarte und Sequenz	iii
A.4. <i>Alignment</i> der eGFP Gensequenz (Primer 16)	xxi
A.5. <i>Alignment</i> der eGFP Gensequenz (Primer 17)	xxii
A.6. <i>Alignment</i> Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> - Locus (Primer 18, linke Flanke)	xxiii
A.7. <i>Alignment</i> Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> - Locus (Primer 67, linke Flanke)	xxiv
A.8. <i>Alignment</i> Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> - Locus (Primer 20, rechte Flanke)	xxv
A.9. <i>Alignment</i> Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im <i>pAOX1</i> - Locus (Primer 21, rechte Flanke)	xxvi

Tabellenverzeichnis

2.1. Geräte	8
2.2. Chemikalien	10
2.3. Primer	12
2.4. Enzyme, Ladepuffer und DNA-Ladder	13
2.5. Medium und Lösungen	14
3.1. Temperaturprogramm und Mastermix: Klonierungs-, Sequenzierungs- und Check-PCR	19
a. Klonierungs-PCR Temperaturprogramm	20
b. Klonierungs-PCR Mastermix	20
c. Sequenzierungs-PCR Temperaturprogramm	20
d. Sequenzierungs-PCR Mastermix	20
e. Check-PCR Temperaturprogramm	20
f. Check-PCR Mastermix	20
3.3. Golden Gate Reaktion: Temperaturprogramm (a) Mastermix (b)	20
a. Mastermix	20
b. Temperaturprogramm	20
3.4. Plasmid-Linearisierung	26

Abkürzungsverzeichnis

- AOX** Alkoholoxidase
- AOX1** Alkoholoxidase 1
- AOX2** Alkoholoxidase 2
- BMG1** *buffered minimal glucose*; enthält 1 % Glucose
- BMM1** *buffered minimal methanol*; enthält 1 % Methanol
- BMM5** *buffered minimal methanol*; enthält 5 % Methanol
- CAT** Katalase
- CL** *cleared lysate*
- DAK** Dihydroxyacetonkinase
- DAS** Dihydroxyacetonsynthase
- DHA** Dihydroxyaceton
- dNTP** Desoxyribonukleotidtriphosphat
- DTT** Dithiothreitol
- EDS** 3 % Ethylen Glycol, 5 % DMSO, 1M Sorbitol
- eGFP** *enhanced green fluorescent protein*
- EL** *eluate*
- EtNa** Et für Ethanol, Na für Natriumhydroxid
- F_{1,6}BP** Fruktose 1,6-phosphat
- FBA** Fruktose-1,6-bisphosphataldolase
- FBP** Fruktose-1,6-bisphosphatase
- FDH** Formiatdehydrogenase
- FDH1** *Formate dehydrogenase 1*
- FGH** S-Formylglutathionhydrolase
- FL** *flow through*
- FLD** Formaldehyddehydrogenase
- FMS1-2** *Polyamine oxidase, converts spermine to spermidine*
- GAP** Glycerinaldehyd-3-phosphat
- GFP** *green fluorescent protein*
- GOI** *gene of interest*
- GSH** Glutathion

LB-Medium	<i>lysogeny broth</i> Medium
MFS	Methylformiatsynthase
Mut⁻	<i>methanol utilization negative</i>
Mut⁺	<i>methanol utilization plus</i>
Mut^S	<i>methanol utilization slow</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NK	Negativkontrolle
NK2	Negativkontrolle 2
P_i	Phosphat
pAOX1	Alkoholoxidase-1-Promotor
pAOX2	Alkoholoxidase-2-Promotor
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pHILS1	<i>Pichia pastoris-PHO1</i> -Signalsequenz
PHO1	<i>phosphate permease family</i>
PK	Positivkontrolle
PPB	<i>Potassium Phosphate buffers</i>
PPP	Pentosephosphatweg
pUC ORI	<i>ColE1 origin of replication of pUC19 plasmid</i>
PYR	Pyruvat
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	<i>tricarboxylic acid cycle</i>
TPI	Triosephosphatisomerase
TTAOX1	<i>transcriptional terminator sequence of K. phaffii AOX1 gene</i>
WF1	<i>wash fraction 1</i>
WF2	<i>wash fraction 2</i>
WT	Wildtyp
Xu₅P	Xylulose-5-phosphat
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>

1. Einleitung

1.1. Rekombinante Proteine in der Biotechnologie

Rekombinante Proteine aus biotechnologischer Herstellung finden in vielen Bereichen wie der Lebensmittelindustrie, der Medizin und der Pharmazie Anwendung. Zahlreiche Expressionssysteme mit unter Hefen, wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae*, Insekten, Säugetierzellen, transgene Tiere, Pflanzenkulturen sowie prokaryotische Zellen, wie z. B. *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* stehen hierfür zur Verfügung [1]. Die Auswahl der Wirtszelle und des Expressionsvektors richtet sich nach den Anforderungen des rekombinanten Proteins und der späteren Verwendung. Die unterschiedlichen biotransformationalen Vorgänge im Stoffwechsel der Organismen müssen dabei betrachtet bzw. können dabei gezielt eingesetzt werden. Zum Beispiel bieten prokaryotische Systeme keine Möglichkeit der posttranslatorischen Modifikation. Sind solche Modifikationen, wie etwa eine Glykosylierung, Disulfidbrücken oder Phosphorylierungen erforderlich, muss auf ein eukaryotisches Expressionssystem zurückgegriffen werden [1]. Gegebenenfalls ist der Einsatz von Säugerzell-Linien erforderlich. Eukaryoten, insbesondere Pilze, besitzen eine leistungsfähige Sekretionsmaschinerie, die es ermöglicht, Proteine in das Medium zu sezernieren. In *E. coli* kann das Zielprodukt als *inclusion bodies* vorliegen, wodurch eine spätere Aufarbeitung erschwert wird.

1.2. Das Expressionssystem *Pichia pastoris*

Komagataella phaffii, besser bekannt als *Pichia pastoris*, ist ein häufig verwendeter Expressionsorganismus in der Biotechnologie [2]. *Pichia pastoris* ist relativ einfach und kostengünstig zu kultivieren. Die Verdopplungszeit beträgt 2-4 Stunden im Vollmedium und es sind hohe Zelldichten im Fermenter möglich (600 g feuchte Zellmasse/l) [1]. *Pichia pastoris* bildet keine Endotoxine und ist, verglichen mit tierischen Zellkulturen, weniger anfällig für Kontaminationen [3]. Des Weiteren sind Methoden zur Transformation etabliert und gentechnische Modifikationen gestalten sich relativ einfach [4, 5]. Die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris* besitzen einige Gemeinsamkeiten, jedoch bietet *Pichia pastoris* Vorteile:

- Beide zeichnen sich durch ähnliche Kultivierungsbedingungen aus [6].

- *Pichia pastoris* neigt weniger zur Hyperglykosylierung bei Proteinen [7].
- Auch bei hohen Wachstumsraten unter aeroben Bedingungen tritt bei *Pichia pastoris* keine Ethanolbildung (*overflow metabolism*) auf [1].
- *Pichia pastoris* ist methylotroph und kann mithilfe der Schlüsselenzyme Alkoholoxidase 1 (AOX1) und Alkoholoxidase 2 (AOX2) Methanol zum Aufbau von Biomasse verwenden [8].

1.2.1. Expressionsvektoren und *Pichia pastoris* Stämme

Heutzutage gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen *Pichia pastoris*-Expressionsvektoren und -Wirtsstämmen, die für die Produktion von rekombinanten Proteinen verwendet werden können. *Pichia pastoris*-Expressionsvektoren sind in der Regel *shuttle*-Vektoren, die in *E. coli* amplifiziert werden können [1]. Die verschiedenen Charakteristika der Expressionsvektoren ermöglichen einen breiten Anwendungsbereich. Bei vielen Vektoren wird der stark regulierbare *AOX1* Promotor zur gezielten Induzierung der heterologen Genexpression eingesetzt [1]. Alternativ werden die Promotoren der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Formaldehyd-Dehydrogenase (FLD1) oder Dihydroxyaceton-Synthase 1 (DAS1) verwendet [9, 10]. Weitere Unterschiede liegen in den Selektionsmarkergenen (z. B. Zeocin-, Geneticin- oder Blastidicinresistenzgene), in der intrazellulären Expression oder in der Sekretion des Zielproteins [1]. Beispiele für Sekretionssignale sind die *Pichia pastoris*-PHO1-Signalsequenz (pHIL-S1) oder die α -Faktor-Preprosignalsequenz von *Saccharomyces cerevisiae* [1].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Klonierung der Expressionsvektor pBSY2Z verwendet, der sich durch die folgenden Charakteristika auszeichnet: *shuttle*-Vektor; dem Promotor der Alkoholoxidase 1 (pAOX1); ein *stuffer*-Fragment mit der Möglichkeit der Insert Klonierung über die *SapI* Schnittstellen; einem AOX1 Terminator (AOX1_TT); ein Zeocin Resistenzgen (ZeoR) mit den jeweiligen Promotoren für *E. coli* und *Pichia*; pUC *origin of replication*; zudem kein Genabschnitt für ein Sekretionssignal und damit kein Proteintransport. Die Klonierungsschritte wurden in *E. coli* JM109 durchgeführt.

Die Integration des Expressionsvektors erfolgt mittels homologer Rekombination in das Wirtsgenom, d.h. es kann beim Vorhandensein ähnlicher (homologer) Sequenzen(-bereiche) genetisches Material zwischen einer Donor-DNA (z. B. einem Expressionsvektor) und der Empfänger-DNA, in dem Fall genomische Hefe-DNA, ausgetauscht werden. Das führt zu einem genomischen DNA Abschnitt mit einem integrierten Vektor. Dafür ist es notwendig, den Vektor vor der Transformation zu linearisieren und über die verwendete Schnittstelle kann der Ort der Hefe-eigenen homologen Rekombination bestimmt werden [1]. Eine mehrfache homologe Rekombination ist hierbei auch möglich [11]. Diese mehrfache Integration wird gezielt dazu genutzt, die Produktion an

rekombinanten Proteinen zu steigern. Dazu stehen unterschiedliche Methoden zur Verfügung (z. B. mehrfache Transformation oder Selektion mit hohen Konzentrationen an Antibiotika) [12].

Es gibt eine Vielzahl an kommerziell verfügbaren *Pichia* Stämmen. Ein Differenzierungsmerkmal ist hierbei die Ab- oder Anwesenheit des *AOX1* bzw. *AOX2* Gens. Stämme, bei denen beide *AOX*-Genabschnitte vorhanden sind, bezeichnet man als *methanol utilization plus* (Mut^+) [9]. Daneben gibt es die *methanol utilization slow* (Mut^s) Phänotypen, die sich durch die Inaktivierung des *AOX1*-Gen auszeichnen. Ein Wachstum mit Methanol als C-Quelle ist weiterhin durch die vom *AOX2*-Gen codierte Alkoholoxidase 2 möglich [9]. Der Aufbau der Biomasse ist im Vergleich zum Mut^+ Phänotypen aber langsamer [9, 13]. Bei dem dritten Phänotyp sind beide Gene (*AOX1* und *AOX2*) deaktiviert. In der Literatur wird dieser als Mut^- bezeichnet [13]. Dieser Stamm ist nicht in der Lage, Methanol zu verstoffwechseln. Unabhängig von den *AOX*-Genen kann jedoch insbesondere der stark induzierbare *AOX1*-Promotor für die Expression rekombinanter Gene genutzt werden [9]. Für die Transformation und als eGFP exprimierender Stamm diente der *Pichia* Stamm BSYBG11 mit dem Phänotyp Mut^s und dem Genotyp *AOX2*.

1.2.2. Der Methanol-Metabolismus von *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ist ein methylotropher Organismus, der Methanol als C-Quelle und Energiequelle verwenden kann. Möglich wird dies durch einen zyklischen Stoffwechsel (Abb. 1.1). Ein Teil des Stoffwechsels findet im Peroxisomen statt, wobei die Biogenese der Peroxisomen abhängig von der Kohlenstoffquelle im Kulturmedium ist. In Anwesenheit von Glucose oder Glycerin bilden sich die Peroxisomen zurück. Unter Verwendung von Methanol (MeOH) als C-Quelle kommt es dagegen zur Proliferation [8, 14].

Im ersten Schritt des Methanol-Metabolismus erfolgt die Oxidation von Methanol und Sauerstoff zu Formaldehyd und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch die Alkoholoxidase (AOX). Die für die Zelle giftigen Zwischenprodukte Formaldehyd und H_2O_2 werden in Folgereaktionen abgebaut. H_2O_2 wird in einer Redoxreaktion durch die Katalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff umgesetzt. Das Formaldehyd wird in zwei unterschiedlichen Reaktionswegen umgesetzt. Für die Dissimilation verlässt ein Teil des Formaldehyds die Peroxisomen und geht ins Zytosol über. Dort wird über weitere Teilreaktionen Formaldehyd zu Methansäuremethylester und final zu Kohlendioxid (CO_2) oxidiert. Beteiligt an diesen Reaktionen sind zwei im Zytoplasma vorkommende Dehydrogenasen. Das dabei entstehende NADH wird in die Atmungskette eingeschleust und dient der Energiegewinnung. Ein Teil des in den Peroxisomen gebildeten Formaldehyds wird in einem zyklischen Reaktionsweg für den Aufbau von Biomasse verwendet. Dazu kondensiert Formalaldehyd mit D-Xylulose-5-phosphat zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und 1,3-Dihydroxypropan-2-on (DHA oder Glyceron), die anschließend die Peroxisomen

verlassen. Katalysiert wird diese Reaktion durch das dritte in den Peroxisomen vorkommende Enzym Dihydroxyaceton-Synthase (DHAS). Im Zytosol wird anschließend im zyklischen Kreislauf DHA und in jedem dritten Umlauf GAP regeneriert. Ein Teil des GAP wird für den Aufbau von Zellbestandteilen genutzt [8, 9, 14].

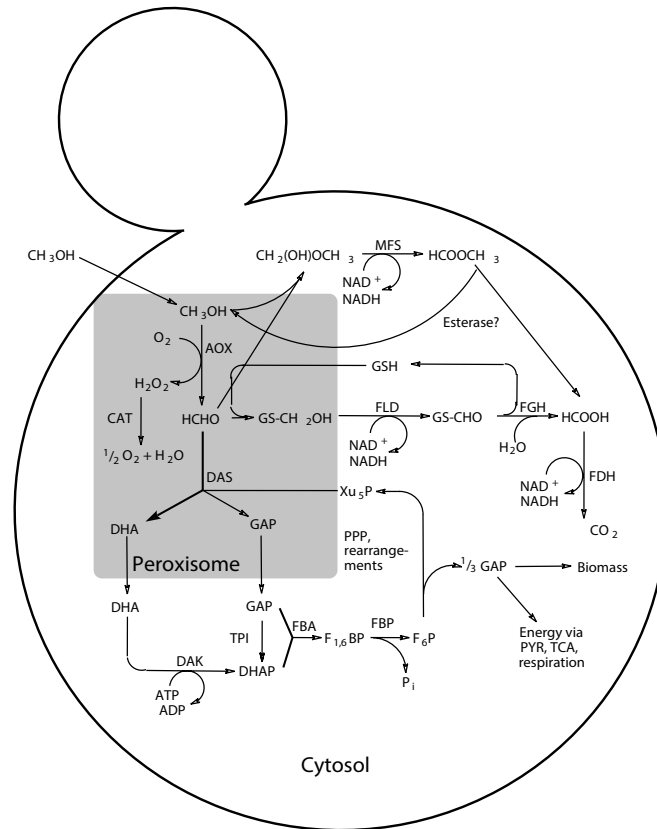


Abbildung 1.1.: Methanol-Metabolismus von *Pichia pastoris*

Darstellung des Methanol-Metabolismus und der beteiligten Enzyme. AOX: Alkoholoxidase, CAT: Katalase (EC 1.11.1.6), FLD: Formaldehyddehydrogenase, FGH: S-Formylglutathionhydrolase, FDH: Formiatdehydrogenase, DAS: Dihydroxyacetonsynthase, TPI: Triosephosphatisomerase, DAK: Dihydroxyacetonkinase, FBA: Fructose-1,6-bisphosphataldolase, FBP: Fructose-1,6-bisphosphatase, MFS: Methylformiat-Synthase, DHA: Dihydroxyaceton, GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, Xu₅P: Xylulose-5-phosphat, GSH: Glutathion, F_{1,6}BP: Fructose 1,6-phosphat, P_i: Phosphat, PYR: Pyruvat, PPP: Pentosephosphatweg, TCA: tricarboxylic acid cycle; [15]

1.2.3. AOX1 und AOX2

Pichia pastoris besitzt zwei Alkoholoxidasen, die von den Genen *AOX1* und *AOX2* codiert werden. Die Regulation der beiden Promotoren *pAOX1* und *pAOX2* ist bei beiden ähnlich und beruht auf einer Repression, Derepression und Induktion [8]. Die Regulation erfolgt dabei auf der Ebene der Transkription [9, 13]. Die Transkription beider Gene wird durch die Repressoren Glucose, Ethanol und Glycerin gehemmt [8]. Allerdings führt die

Abwesenheit dieser Moleküle nicht zur Transkription von *AOX1*. Steht dem Organismus nur Methanol als C-Quelle zur Verfügung, wirkt dieser Alkohol als Induktor und es kommt zu einer starken Transkription der AOX-Gene. Unter diesen Bedingungen kann AOX1 bis zu 30 % der löslichen Gesamtproteinmasse in *Pichia pastoris* ausmachen [9]. Der Anteil an AOX2 ist aufgrund des schwächeren Promotors etwas geringer [13, 14]. Die strenge Regulation und die starke Methanolinduktion, bei Abwesenheit anderer C-Quellen, machen den *AOX1*-Promotor für die Produktion rekombinanter Proteine in *Pichia pastoris* geeignet.

1.3. *Green fluorescent protein*

Das *green fluorescent protein* (GFP) ist ein Protein, das der Qualle *Aequorea victoria* entstammt [16]. Seit seiner Entdeckung 1962 ist GFP aufgrund seiner Eigenschaften bis heute nicht mehr aus der Zellbiologie und Molekularbiologie wegzudenken. GFP fluoresziert bei Anregung (395 nm und 470 nm) mit UV-Licht grün (509 nm)[17]. Diese fluoreszierende Eigenschaft behält GFP häufig auch bei der Fusion mit anderen Proteinen. Damit bietet sich die Möglichkeit, GFP C-terminal oder N-terminal mit anderen Protein zu koppeln [18]. Die Fluoreszenz lässt sich in lebenden Zellen durch Fluoreszenzmikroskopie oder mit einem geeigneten Durchflusszytometer nachweisen. So ist es möglich geworden, unterschiedliche Vorgänge (Proteinexpression, Proteintransport, Lokalisation von Proteinen, Zellteilung, intrazelluläre Transportwege, Tumorstreuung, Sekretion, Proteinabbau) in lebenden Zellen zeitlich und räumlich zu analysieren [17, 19]. Inzwischen stehen unterschiedlichste Varianten des GFP-Wildtyp-Proteins zur Verfügung. Diese Proteine besitzen andere spektrale Eigenschaften (Anregungsmaxima, Emissionsmaximum und Fluoreszenz-Intensität)[19]. Daneben sind physikalische Eigenschaften, wie etwa die Löslichkeit, verändert worden. Neben den grün fluoreszierenden Proteinen gibt es auch gelbe, blaue oder cyan fluoreszierenden Proteine [19, 20].

Das *enhanced green fluorescent protein* (eGFP) ist ein Mutant des GFP Wildtyps. Durch den Austausch von zwei Aminosäureresten (F64L, Leucin statt Phenylalanin und S65T, Threonin statt Serin) sind die spektralen und physikalischen Eigenschaften verändert worden. Der Austausch S65T hat zu einer erhöhten Fluoreszenz des eGFPs gegenüber dem GFP geführt. Die Emissionswellenlänge ($\lambda_{E \max}$) von 509 nm ist bei beiden Proteinen, GFP und eGFP identisch. Jedoch besitzt eGFP nur noch ein Anregungsmaximum ($\lambda_{A \max}$) bei 488 nm und kein, wie beim Wildtyp (WT), zweites Maxima (395 nm). Die Effizienz der Proteinfaltung ist durch den Austausch F64L verändert worden [19 21].

1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, einen *Pichia pastoris* Stamm herzustellen, der intrazelluläres eGFP produziert. Um dieses Ziel zu erreichen, wurde die nachstehende Strategie angewendet (Abb. 1.2): Zunächst erfolgte die Klonierung des *eGFP*-Gens in einen geeigneten Vektor, sodass sich das Zielgen unter transkriptioneller Kontrolle des *AOX1* Promotors befand. Der nach der Klonierung vorliegende Expressionsvektor wurde hinsichtlich der richtigen Integration der eGFP-Genkassette charakterisiert. Für die spätere homologe Rekombination der Expressionskassette in das Hefegenom war eine Linearisierung des Vektors notwendig [1, 22]. Die verwendete Schnittstelle wurde so gewählt, dass die spätere homologe Rekombination vorzugsweise innerhalb der genomischen *pAOX1*-Gensequenz stattfindet. Für die Transformation wurden Zellen eines *Pichia pastoris* Mut^s Stamm verwendet. Zur Klon Validierung wurden die jeweiligen linken und rechten Übergänge (Flanken) zwischen der genomischen DNA und dem integrierten Plasmid durch Sequenzierung bestätigt. Im nächsten Schritt erfolgte eine funktionale Analyse. Dazu wurde in einer 6 Well-small-scale Expression durch die Zugabe von Methanol (Induktor) die intrazelluläre Expression von eGFP eingeleitet. Die intrazelluläre Expression wurde fluoreszenzmikroskopisch und nach einem Zellaufschluss elektrophoretisch (SDS-PAGE) beurteilt.

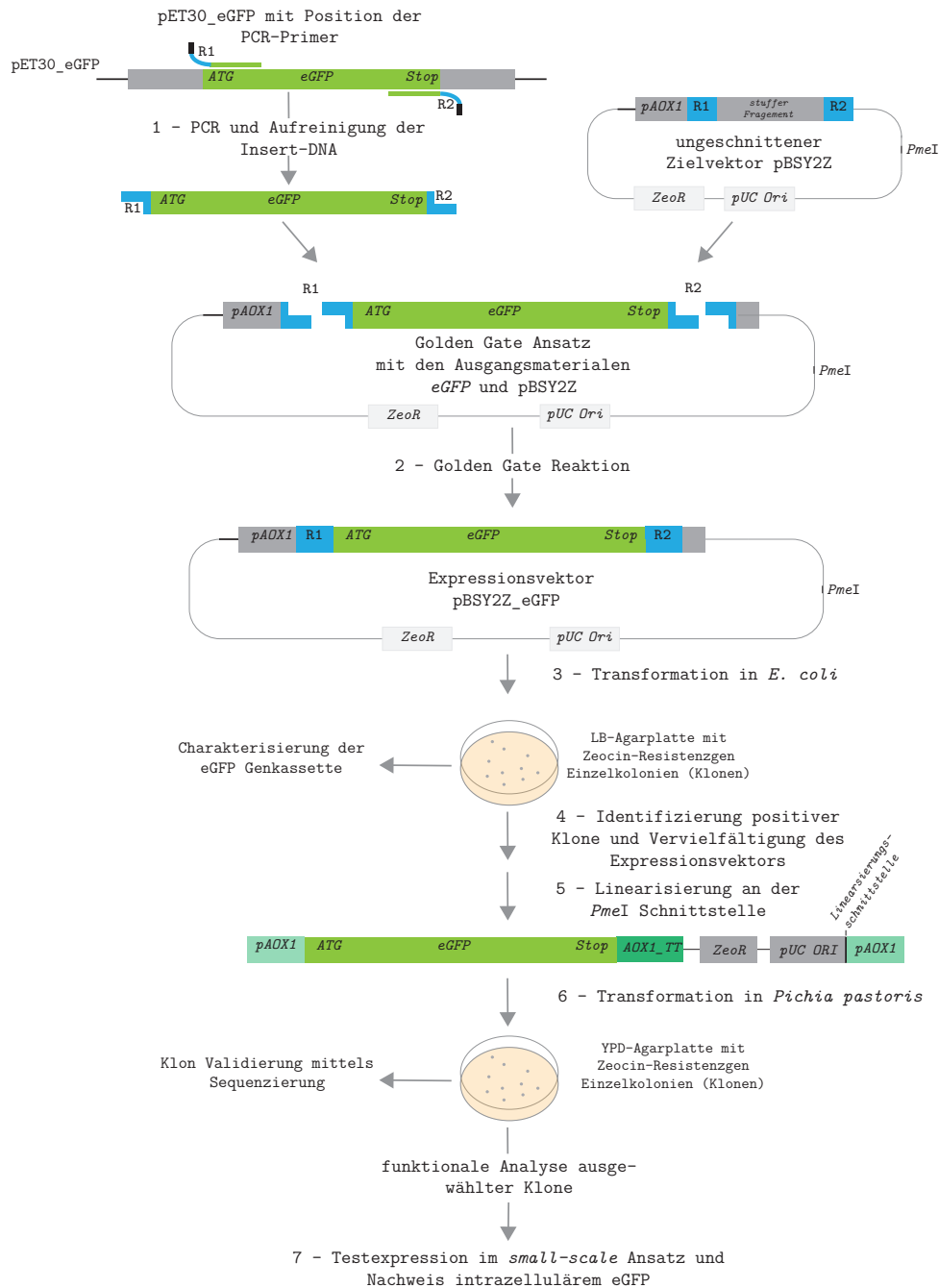


Abbildung 1.2.: Schematischer Ablauf zur Konstruktion eines *Pichia pastoris* Expressionsstamm

Konstruktionsschema (vereinfachte Darstellung): 1. PCR des *gene of interest* aus dem Plasmid pET30_eGFP und Aufreinigung des PCR Produktes 2. Golden Gate Klonierung (Restriktionsverdau und Ligation des *gene of interest* und des Vektor pBSY2Z) 3. Transformation *E. coli* 4. Identifikation der Klone 5. Linearisierung des Expressionsvektors 6. Transformation in *Pichia pastoris* 7. Funktionale Analyse, Nachweis intrazelluläres eGFP; **R1/R2** Restriktionsschnittstellen *SapI* bzw. entsprechende Restriktionsenzyme, **ATG**: Translation-Starkodon, **Stop**: Translations-Stop-Kodon, **ZeoR**: Zeocin-Resistenzgen, **pUC Ori**: ColE1 Replikationsursprung, **eGFP**: eGFP-Gensequenz, **PmeI**: Restriktionsschnittstelle, **pAOX1**: AOX1-Promotor, **AOX1_TT**: AOX1-Terminator

2. Material

2.1. Geräte

In Tabelle 2.1 sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 2.1.: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Autoklav	Systec, Linden	Systec V-150
Dampferzeuger	ZIRBUS, Bad Grund / Harz	Steamboy DG 18
Elektrophorese	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	XCell SureLock™ Mini-Cell
Elektroporator	Eppendorf, Hamburg	Eporator
Geldokumentation	Intas Science Imaging, Göttingen	GelStick IMAGER
Geldokumentation	Mitsubishi Electric, Barcelona, Spain	P-93D
Geltablets	Biometra, Göttingen	Compact S, Compact M
Gießwanne	Biometra, Göttingen	Casting system Compact S, M
Homogenisator	Sartorius, Göttingen	Labsonic P
Inkubationschüttler	Eppendorf, Hamburg	New Brunswick Innova 4200
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß	profi line
Kühlschrank	Liebherr, Biberach an der Riß	med line
Luftpolsterpipette	Eppendorf, Hamburg	Eppendorf Research® plus
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach	MR 3000
Mikrowelle	SEVERIN, Sundern	MW 7803
Netzgeräte (Elektrophorese)	Biometra, Göttingen	PS 305T XL
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen	FlexCycler2
pH-Messgerät	Mettler Toledo, Gießen	FiveEasy pH/mV

...

Tabelle 2.1.: Verwendete Geräte (*Fortsetzung*)

Bezeichnung	Hersteller	Modell
Rotorsystem	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	T29-8 x 50 Festwinkelrotor
Schüttelinkubator	Axon, Kaiserslautern	AXON SI-20
Schüttelinkubator	Eppendorf, Hamburg	ThermoMixer F 2.0
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	HERASafe KS 12
Sonotrode	Sartorius, Göttingen	Sonotrode \varnothing 3 mm, ca. 100 mm lang
Spektralphotometer	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	NanoDrop 2000C
Spektralphotometer	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	Genesys 10S UV-Vis
Vortex	IKA, Staufen	Vortex Genius 3
Vortex	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	LP Vortex Mixer
Waage	KERN & SOHN, Balingen-Frommern	Kern 410
Waage	KERN & SOHN, Balingen-Frommern	Kern 510-63
Wärmeschrank	BINDER, Tuttlingen	BD-115, ED-115
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg	Centrifuge 5418 R
Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg	miniSpin
Zentrifuge	VWR, Darmstadt	Galaxy Mini Centrifuge
Zentrifuge	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	Sorvall Lynx 6000 Centrifuge
Zentrifuge	Thermo Fisher, Massachusetts, USA	Thermo Scientific MySpin 6

2.2. Chemikalien

In Tabelle 2.2 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 2.2.: Eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nr.
Agar-Agar Kobe I	Carl Roth, Karlsruhe	5210.3
Agarose Broad Range	Carl Roth, Karlsruhe	T846.2
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt	101217
D(+)-Glucose, wasserfrei,	Carl Roth, Karlsruhe	X997.3
di-Kaliumhydrogenphosphat (wasserfrei)	Carl Roth, Karlsruhe	P749.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe	A664
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe	6908.3
D-Sorbit	Carl Roth, Karlsruhe	6213.1
EDTA	AppliChem, Darmstadt	A5097
Ethanol 99 %	Carl Roth, Karlsruhe	9065
Glycerin, ROTIPURAN	Carl Roth, Karlsruhe	3783
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe	2363.3
Hefe-Stickstoff-Basismedium (YNB, ohne Aminosäuren)	Carl Roth, Karlsruhe	HP26.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe	3904.1
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe	T832
Methanol 99 %	Carl Roth, Karlsruhe	8388.1
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe	6773
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe	3957.1
Natriumhydroxid (NaOH)	Th. Geyer, Renningen	1340.1000
Peptone, Enzymatic Digest of Protein (BD Bacto)	BD Biosciences, CA, USA	211677
Roti-Blue 5x	Carl Roth, Karlsruhe	A152.1
Roti-Load 2	Carl Roth, Karlsruhe	K930.1
Rotiphorese 10x SDS Page	Carl Roth, Karlsruhe	3060.1
Rotiphorese 50x TAE Puffer	Carl Roth, Karlsruhe	CL86.1
SDS	AppliChem, Darmstadt	A2263
SERVAGel TG Prime 10 %	SERVA Electrophoresis, Heidelberg	43264.01

...

Tabelle 2.2.: Eingesetzte Chemikalien (*Fortsetzung*)

Bezeichnung	Hersteller	Artikel Nr.
SERVAGel TG Prime 12 %	SERVA Electrophoresis, Heidelberg	43266.01
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe	9091.1
Triton-X-100	Merck, Darmstadt	X100
Tryptone	BD Biosciences, CA, USA	211705
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe	9127.1
Wasser (BioScience-Grade, Nuklease-frei, autoklaviert, DEPC-behandeltes)	Carl Roth, Karlsruhe	T143.2
Zeocin	invitrogen	R25001

Weiterhin wurde eine 70 %ige ethanolische Lösung verwendet, die aus 96 % vergälltem Ethanol hergestellt worden ist.

2.3. Bakterien- und Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden nachfolgende Bakterien- und Hefestämme verwendet.

- (i) *E. coli* Stamm: JM109 (HAW Hamburg) mit dem Genotyp: (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(\text{lac-proAB})$, [*F'* *traD36*, *proAB*, *laqI^qZ Δ M15*]. Dieser Organismus ist für die Klonierung und die Vermehrung des *high-copy-number* Plasmids verwendet worden.
- (ii) *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) Stamm: BSYBG11 (*bisy*, Hofstätten / Raab, Österreich) mit dem Genotyp *AOX2* vom Phänotyp *Mut^s*. Der Stamm BSYBG11 ist für die intrazelluläre Expression des Zielproteins, eGFP, verwendet worden.

2.4. Plasmide

Als Expressionsvektor (Zielvektor für das *GOI*) wurde das Plasmid pBSY2Z (3812 bp, Selektionsmarker: Zeocin; *bisy*, Hofstätten / Raab, Österreich) verwendet (Anhang A.1.1, Abb. A.1). Für die PCR-Amplifikation von eGFP wurde das Plasmid pET30a_eGFP (4102 bp, Selektionsmarker: Kanamycin; HAW Hamburg) verwendet (Anhang A.1.1, Abb. A.2). Die Plasmide sind Teil des jeweiligen *E. coli* JM109 Bakterienstammes (Kryokultur). Der für die eGFP Expression hergestellte Expressionsvektor wird als pBSY2Z_eGFP bezeichnet. Die dazugehörige Vektorkarte befindet sich im Anhang A.1.3

2.5. Primer

In der Tabelle 2.3 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer (biomers.net GmbH) mit der jeweiligen Sequenz, Schmelztemperatur (TM) und Länge aufgeführt. Die Primer wurden mit unterschiedlichen Zielsetzungen eingesetzt. Ein Teil der Primer dienen dazu, dass Klonierungstemplate via PCR zu amplifizieren und PCR-Produkte zu generieren, die zur späteren Sequenzierung verwendet worden sind. Zusätzlich wurden Primer verwendet, die zum Nachweis eines PCR-Produktes notwendig waren. Die Nummerierung der Primer erfolgte laborintern und ist fortlaufend. Der Primer 38 bzw. 39 besteht, verglichen mit den restlichen Primern, aus einem Bereich mit direkter Homologie zur *eGFP*-Gensequenz sowie einer *SapI* Nukleotidabfolge, die die gewünschte Restriktionschnittstelle zur Klonierung einführen (Primer-Überhang).

Tabelle 2.3.: Verwendete Primer

Bezeichnung (Bindungsstelle)	Sequenz in 5'-3'	Länge	TM in °C	Verwendung
Primer 16 (pAOX1)	GCATCTCTCAGGCAAATGGC	22	56	Nachweis
Primer 17 (AOX1_TT)	GCATCTCTCAGGCAAATGGC	20	55	Nachweis
Primer 18 (FMS1-2 fwd)	TGAGTCGCAACCAACCTACC	20	52	Sequenzierung
Primer 20 (pUC Ori fwd)	CCTTTTGCTGGCCTTTTGCT	20	56	Sequenzierung
Primer 21 (FDH1 3' rev)	TCAAGGAGAAAACATTGCGAL- ATTCA	25	59	Sequenzierung
Primer 38 (<i>eGFP_sap1</i> fwd)	AAAAAGCTCTTCGATGGTGAG- CAAGGGCGAGGAG	34	74	Klonierung
Primer 39 (<i>eGFP_sap1</i> rev)	AAAAAGCTCTTCTTTACTATT- ACTTGTACAGCTCGTCCATGCC	43	69	Klonierung
Primer 67 (eGFP rev)	TGAACTTGTGGCCGTTTACG	20	54	Sequenzierung

2.6. Enzyme, Ladepuffer und DNA-Ladder

Nachfolgend sind alle verwendeten Enzyme, die dazugehörigen Puffer, dNTP, Polymerasen und DNA-Ladder aufgelistet (Tab.: 2.4).

Tabelle 2.4.: Verwendete Enzyme, Ladepuffer und DNA-Ladder

Bezeichnung	Hersteller (Artikel Nr.)	Konzentration
5x Phusion HF-Buffer	Thermo Fisher, Massachusetts, USA (F518L)	5 X
10x T4-Ligasepuffer with 10 nM ATP	New England Biolabs, Frankfurt am Main (M0202S)	10 X
<i>Bsa</i> I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Frankfurt am Main (R0535S)	10 000 cohesive units/ml
DNA-Ladder 250 bp	Carl Roth, Karlsruhe (T918.1)	0,1 µg/µL
Invitrogen dNTP Mix	Thermo Fisher, Massachusetts, USA (18427013)	10 mM per dNTP
Taq-DNA-Polymerase (<i>Taq</i>)	VWR, Pennsylvania, USA (733-1300)	5 U/µl
GelGreen Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, CA, USA (41004)	10 000 X
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Thermo Fisher, Massachusetts, USA (SM1173)	keine Angabe
Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher, Massachusetts, USA (F549L)	2 U/µL
<i>Pme</i> I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Frankfurt am Main (R0560S)	10 000 U/ml
Quick-Load® Purple 1 kb Plus DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main (N0550S)	keine Angabe
Roti-Load DNA-short-run (mit Glycerin)	Carl Roth, Karlsruhe (0095.1)	keine Angabe
Roti-Mix PCR 3	Carl Roth, Karlsruhe (L785.1)	10 mM per dNTP
<i>Sap</i> I (Restriktionsenzym)	New England Biolabs, Frankfurt am Main (R0569S)	10 000 U/ml
SYBR Safe DNA Stain EDVO Kit	Edvotek Washington, DC, USA (608)	10 000 X

...

Tabelle 2.4.: Enzyme, Ladepuffer und DNA-Ladder (*Fortsetzung*)

Bezeichnung	Hersteller (Artikel Nr.)	Konzentration
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main (M0202S)	400 000 cohesive units/ml

2.7. Medien und Lösungen

Die verwendeten Nährmedien und Lösungen sind in der Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5.: Eingesetzte Medien und Lösungen

Name	Einsatzstoff	Zusammensetzung
Buffered minimal glucose (BMG1); enthält 1 % Glucose	VE-Wasser	680 ml
	10x PPB	200 ml
	10x YNB	100 ml
	Glucose (500 g/l)	20 ml
Buffered minimal methanol (BMM1); enthält 1 % Methanol	VE-Wasser	690 ml
	10x PPB	200 ml
	10x YNB	100 ml
	Methanol	10 ml
Buffered minimal methanol (BMM5); enthält 5 % Methanol	VE-Wasser	650 ml
	10x PPB	200 ml
	10x YNB	100 ml
	Methanol	50 ml
DNA-Puffer	EDTA	0,1 mM
	Tris-HCL, pH 8,0	50 mM
	Triton-X-100	1 %
	Tween 20	0,5 %
Ethanol-Natronlauge-Lösung (EtNa)	NaOH	200 mM
	EDTA	2,25 mM
	Ethanol	60 %

...

Tabelle 2.5.: Eingesetzte Medien und Lösungen (*Fortsetzung*)

Name	Einsatzstoff	Zusammensetzung
Glucose-Lösung	Glucose	500 g/l
	Autoklaviert 121°C, 15 min	-
Hefe-Minimal-Medium (YNB) (ohne Aminosäuren)	Hefe-Stickstoff-Base	10x (67 g/l)
	Sterilfiltriert	-
LB-Lennox	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	VE-Wasser	1000 ml
	pH: 7,0	-
	Autoklaviert 121°C, 15 min	-
LB-Lennox-Agar	Hefeextrakt	5 g/l
	Trypton	10 g/l
	NaCl	5 g/l
	Agar	15 g/l
	VE-Wasser	1000 ml
	pH: 7,0	-
	Autoklaviert 121°C, 15 min	-
YPD-Medium	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	VE-Wasser	1000 ml
	pH: 6,5	-
	Autoklaviert 121°C, 15 min	-
	Zusatz von Glucose (500 g/l)	40 ml/l
YPD-Agar	Hefeextrakt	10 g/l
	Pepton	20 g/l
	VE-Wasser	1000 ml
	Agar	15 g/l
	pH: 6,5	-
	Autoklaviert 121°C, 15 min	-
	Zusatz von Glucose (500 g/l)	40 ml/l

Bei dem LB-Lennox und YPD Nährmedium wurden die Einsatzstoffe zunächst eingewogen und in 800 ml VE-Wasser gelöst. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 1000 ml aufgefüllt, abzüglich dem Volumen, das nach dem Autoklavieren zugeführt wurde. Bei dem YPD- und LB-Agarmedium wurde zusätzlich vor dem Autoklavieren die notwendige Menge Agar hinzugefügt. Die Lösungen BMG1, BMM1 und BMM5 wurden in einer sterilen Flasche angesetzt.

Die zur Selektion verwendeten Antibiotika sind Kanamycin (Konzentration Stocklösung: 30 mg/ml, ddH₂O) und Zeocin (Konzentration Stocklösung: 100 mg/ml, ready to use). Die Kanamycin-Lösung wurde vor der Verwendung mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert. Die finale Konzentration an Zeocin war bei *E. coli* 50 µg/ml und 100 µg/ml bei *Pichia pastoris*.

3. Methoden

3.1. Absorptionsmessung zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäure bestimmt (NanoDrop 2000c). Über das Absorptionsverhältnis 260/280 können Rückschlüsse über Verunreinigungen mit Proteinen, deren Absorptionsmaximum bei 280 nm liegt getroffen werden. Befindet sich der Quotient im Bereich von 1,8 bis 2,0 wird von reiner DNA gesprochen. Zusätzlich kann der Quotient 260/230 ermittelt werden, um Kontaminationen der Nukleinsäuren durch organische Substanzen, wie Kohlenhydrate, EDTA und Phenol zu bestimmen. Der Wert sollte >2 sein, um von reiner DNA sprechen zu können.

3.2. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz PCR), ermöglicht es DNA *in vitro* mittels Primern gezielt zu amplifizieren [23]. Die Amplifikation der DNA ist ein zyklischer Prozess, der sich aus mehreren Reaktionen zusammensetzt. Am Anfang des PCR-Zyklus erfolgt die Denaturierung der Ausgangs-DNA (*Template*) bei einer Temperatur von 90–95 °C. Der DNA-Doppelstrang denaturiert in zwei Einzelstränge. An diese Nucleinsäurematrize hybridisieren die synthetischen Primer komplementär. Dieser Schritt wird als *Annealing* bezeichnet und findet üblicherweise bei einer Temperatur zwischen 50 °C und 65 °C statt. Die *Annealing*-Temperatur orientiert sich dabei spezifisch an der Schmelztemperatur der Primer und hat einen entscheidenden Einfluss hinsichtlich der gewünschten Hybridisierung an der Nucleinsäurematrizen [1]. Folglich ist die Wahl der Primer hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und der Spezifität der amplifizierten DNA ein kritischer Faktor. An diese Primer setzt nun die DNA-Polymerase an und leitet damit die Amplifikation ein (*Extension*). Die gewählte Temperatur ist abhängig von der eingesetzten Polymerase und deren Temperaturoptimum, üblicherweise zwischen 70 °C und 75 °C [1]. Die Elongationszeit richtet sich dabei nach der Länge des Amplifikats und ist bestimmt durch die Geschwindigkeit der Polymerase.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR dazu verwendet das *gene of interest* zu amplifizieren (Klonierungs-PCR), ausgewählte Genabschnitte zu amplifizieren und diese PCR-Produkte hinsichtlich der Größe zu prüfen (Sequenzierungs-PCR). Zusätzlich wurden diese PCR-Produkte für die DNA-Sequenzierung verwendet. Des Weiteren wurde die Check-PCR durchgeführt, mit dem Ziel, einzelne Fragmente hinsichtlich ihrer Größe elektrophoretisch zu überprüfen. Aufgrund der jeweiligen verschiedenen Zielsetzungen wurden unterschiedliche Polymerasen, Puffer und Primer (mit und ohne Überhang, Tab. 2.3) verwendet, wodurch sich unterschiedliche Mastermixe und Temperaturprogramme ergeben haben (3.1). Die bei Check-PCR verwendete *Taq*-DNA Polymerase (VWR) besitzt keine Korrekturmechanismen und eine relativ hohe Fehlerrate. Im Gegensatz dazu verfügt die Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Phusion; Thermo) über eine *proof reading* Funktion, wodurch die Genauigkeit dieser Polymerase verglichen zur *Taq*-DNA Polymerase 52x höher ist [24]. Somit wurde die Phusion Polymerase für die Klonierungs- und Sequenzierungs-PCR verwendet. Bei der Check- und Sequenzierungs-PCR wurden Primer ohne Überhänge verwendet, wohingegen für die Klonierungs-PCR Primer-Überhänge notwendig waren. Somit konnte das *GOI* amplifiziert und gleichzeitig um die notwendigen Restriktionsschnittstellen (*SapI*) verlängert werden. Dies hat zur Folge gehabt, dass das verwendete Temperaturprogramm für die Klonierungs-PCR sich von dem der Check- und Sequenzierungs-PCR unterschied. In den ersten Zyklen der Klonierungs-PCR bindet nur der Primer-Teil mit direkter Homologie an die *Template* DNA, entsprechend wird die *Annealing*-Temperatur nur von diesem Primeranteil bestimmt. In den folgenden Zyklen bindet aber auch der Primer-Überhang, weil die *Template*-DNA um diese verlängert wurde. Dadurch steigt der Anteil des gebundenen Primers und es kommt zu einer Zunahme der *Annealing*-Temperatur, bis diese der Elongationstemperatur entspricht oder auch darüber liegt. Deswegen wurde nach den ersten 5 Zyklen eine *2-step*-PCR durchgeführt, in der die Phase des *Annealing* gestrichen wurde und die Primer während der *Elongation* binden.

Tabelle 3.1.: Temperaturprogramm und Mastermix: Klonierungs-, Sequenzierungs- und Check-PCR**(a)** Klonierungs-PCR Temperaturprogramm

Temperatur in °C	Zeit in min:ss	Zyklen
98	0:30	
98	0:10	5
60	0:15	
72	0:15	
98	0:10	25
72	0:15	
72	5:00	
4	Pause	

(b) Klonierungs-PCR Mastermix

Reagenz	Menge in µl
ddH ₂ O	16,25
HF-Puffer 5x	5,00
dNTPs (je 10 mM)	0,50
Primermix (12,5 µM)	0,50
Phusion (2,0 U/µl)	0,25
Template ¹	2,50 ¹
Gesamtvolumen	25,00

(c) Sequenzierungs-PCR Temperaturprogramm

Temperatur in °C	Zeit in min:ss	Zyklen
98	0:30	
98	0:10	30
60	0:15	
72	0:15	
72	5:00	
4	Pause	

(d) Sequenzierungs-PCR Mastermix

Reagenz	Menge in µl
ddH ₂ O	16,25
HF-Puffer 5x	5,00
dNTPs (je 10 mM)	0,50
Primermix (12,5 µM)	0,50
Phusion (2,0 U/µl)	0,25
Template ¹	2,50 ¹
Gesamtvolumen	25,00

(e) Check-PCR Temperaturprogramm

Temperatur in °C	Zeit in min:ss	Zyklen
98	0:30	
98	0:10	30
60	0:15	
72	0:15	
72	5:00	
4	Pause	

(f) Check-PCR Mastermix

Reagenz	Menge in µl
ddH ₂ O	18,00
PCR-Puffer 10x	2,50
dNTPs (je 10 mM)	0,50
Primermix (12,5 µM)	0,50
<i>Taq</i> (1,25 U/µl)	0,50
Template ¹	3,00 ¹
Gesamtvolumen	25,00

¹ Als Template sollten 2-20 ng DNA eingesetzt werden. Das Volumen kann geändert und mit dem Volumen des ddH₂O verrechnet werden.

3.3. Golden Gate Klonierung

Die Golden Gate Reaktion (*Golden Gate Assembly*) ist ein Klonierungsverfahren, das es ermöglicht Restriktionsenzymverdau und Ligation, des Templates in den Zielvektor, simultan in einem einzigen Reaktionsansatz durchzuführen. Möglich, wird dies durch die Fähigkeit einiger Restriktionsendonukleasen des Typ IIS (z. B. *BsaI* oder *SapI*) DNA außerhalb ihrer definierten Konsensussequenz zu schneiden. Das Enzym schneidet dabei in einem bestimmten Abstand zur Erkennungssequenz. An der Schnittstelle selber bleiben dann Überhänge von üblicherweise 4 Basen, die unabhängig von der Erkennungssequenz sind. Weil die ursprüngliche Erkennungssequenz nicht mehr vorhanden ist, ist nach der Ligation ein erneutes Schneiden durch die Restriktionsendonukleasen Typ IIS ausgeschlossen [25]. Voraussetzung hierfür sind entsprechend designte Vektoren und Templates. Die Erkennungssequenz des verwendeten Restriktionsenzym darf dabei nicht in der Zielsequenz, in dem Insert noch im Backbone des Plasmides, sondern nur an den gewünschten Schnittstellen vorkommen. Die Überhänge des Fragmentes (DNA-Amplifikat) müssen entsprechend komplementär zum jeweiligen Zielvektor sein [25, 26].

Der Reaktionsansatz und das verwendete Temperaturprogramm sind nachfolgend aufgelistet (Tab.: 3.3).

Tabelle 3.3.: Golden Gate Reaktion: Temperaturprogramm (a) Mastermix (b)

(a) Mastermix		(b) Temperaturprogramm	
Reagenz	Menge in μl	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in min:ss
GOI (m_{soll} :150 ng)	2,4	37 (Inkubationszeit)	60:00
Zielvektor (150 ng)	1,5	60 (Inaktivierung)	0:10
10x T4-Ligasepuffer	2,0	4	Pause
Restriktionsenzym <i>SapI</i>	1,0		
T4-Ligase (20 U)	4,0		
ddH ₂ O	8,1		
Gesamtvolumen	20		

3.4. Isolierung und Extraktion von DNA

3.4.1. Isolierung und Aufreinigung des Zielvektors pBSY2Z

Für die Isolierung wurde eine 20 ml *E. coli* JM109 (pBSY2Z) LB-Flüssigkultur mit Selektionszusatz (50 µg/ml Zeocin) in einem 200 ml Schikanekolben angesetzt und über Nacht bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Die Isolierung des Zielvektors erfolgte dann mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN).

3.4.2. Vervielfältigung und Isolierung von *high-copy-number* Plasmiden aus *E. coli*

Zur Vervielfältigung von *high-copy number* Plasmiden wurde 50 ml LB-Medium mit Selektionszusatz (50 µg/ml Zeocin) in einem 500 ml Schikanekolben mit *E. coli* JM109 angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 250 rpm inkubiert. Für die Isolierung und Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das QIAprep Spin Midiprep Kit verwendet. Abweichend zum Herstellerprotokoll wurde im letzten Waschschrift statt 70%igem Ethanol 99%iges Ethanol verwendet. Zur Beurteilung der Isolierung und der Aufreinigung können zu verschiedenen Zeitpunkten entsprechend den Herstellervorgaben Aliquots entnommen werden. Nach einer Probenvorbereitung können diese mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht werden [27].

3.4.3. Extraktion von DNA aus *E. coli*

Zunächst wurde der Bakterienstamm *E. coli* JM109 mit einem der beiden Vektoren pBSY2Z oder pET30_eGFP auf einem LB-Medium mit entsprechenden Selektionszusatz (Zeocin oder Kanamycin, jeweils 50 µg/ml) frisch ausplattiert. Anschließend wurde eine Kolonie gepickt und damit 1 ml LB-Medium angeimpft. Nach der Inkubationszeit von bis zu 3 Stunden bei 37 °C bei 800 rpm, erfolgte eine thermische Zellyse bei 95 °C für 15 min und 500 rpm. Nachdem die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 13 000 xg, 15 min sedimentiert wurden, ist der verbleibende Überstand aufgereinigt worden (MicroSpin Cycle-Pure Kit, VWR) und als *Template* für die Klonierungs-PCR oder Check-PCR verwendet worden.

3.4.4. Extraktion genomischer *Pichia pastoris* DNA

Die Extraktion von DNA aus rekombinanten *Pichia* Kolonien mittels dem EtNa Protokoll (Et für Ethanol, Na für Natriumhydroxid) [28]. Dazu wurde eine frische Kolonie gepickt und in 500 μ l NaCl (9 g/l) gelöst (1,5 ml Mikrokoreaktionsgefäß). Anschließend wurden 100 μ l dieser Zellsuspension in ein neues Mikrokoreaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe und Mischen mit 455 μ l EtNa-Lösung wurde die Lösung für 10 min bei 80 °C erhitzt. Der Ansatz wurde zentrifugiert (13 0000 xg, 10 min) und der Überstand entfernt. Das verbleibende Zellpellet wurde in 100 μ l DNA-Puffer resuspendiert.

3.5. Gelelektrophoresen

3.5.1. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren wurden entsprechend ihrer Größe mittels Agarose-Gelsystem elektrophoretisch aufgetrennt. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern entlang eines elektrischen Feldes. In Abhängigkeit der Basenpaarlänge und der Porengröße des Agarosegels besitzen die DNA-Fragmente eine unterschiedliche elektrophoretische Mobilität. Dies hat zur Folge, dass die Fragmente entsprechend ihrer Basenpaarlänge aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose richtete sich nach der DNA-Fragmentgröße. Die eingesetzten Agarosegele hatten eine Konzentration zwischen 0,8 % und 1,5 %. Gelöst wurde die Agarose in 1x-TAE-Puffer, unter dem Zusatz eines Nukleinsäurefärbungsmittels (0,1 μ g/ml SYBR Safe bzw. GelGreen). Die Proben wurden mit einem 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung und zur Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten wurde ein Größenstandard zusätzlich aufgetragen (siehe Abschnitt 2.4). Die Spannung lag bei 80 V bis 120 V. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit einem UV Transilluminator (GelStick IMAGER, Intas) und dem P-93D-Drucker (Mitsubishi).

3.5.2. SDS-PAGE

Der Nachweis und die Größenbestimmung von intrazellulär exprimierten eGFP erfolgte über eine kontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (kurz SDS-PAGE). Es handelt sich hierbei um ein elektrophoretisches Verfahren zur Trennung von Biomolekülen in einer Gelmatrix (Acrylamid) mittels elektrischen Feld. Die elektrophoretische Bewegung von geladenen Teilchen hängt u. a. von der Gesamt-Nettoladung des Moleküls und der Größe und Konformation des Moleküls ab. Um daher eine Auftrennung anhand der Molekülgröße zu ermöglichen, muss das Protein mittels Hitze und SDS denaturiert werden. Zunächst werden die nicht-kovalenten Bindungen bei 95 °C zerstört und es kommt zur Entfaltung des Proteins. SDS kann sich nun an die Oberfläche des entfalteten Pro-

teins anlagern. Zusätzlich wird Dithiothreitol eingesetzt, um kovalente Sekundärstrukturen (Disulfidbrücken) zu reduzieren. Somit liegt ein lineares Protein mit einer negativen Gesamt-Nettoladung vor, die proportional zum Molekulargewicht ist.

Zur Probenvorbereitung wurden im Verhältnis von 1:1 Zellsuspension und Probenpuffer gemischt. Der Probenpuffer setzte sich aus 5 Teilen Roti-Safe, 0,1 Teilen DTT und 4,9 Teilen ddH₂O zusammen. Die Zellsuspension mit dem Probenpuffer wurde nachfolgend für 5 min bei 95 °C gekocht, bei Raumtemperatur abgekühlt und zentrifugiert (13 000 xg, 0,5 min). Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Kammer, mit einem 12%igem SDS-Polyacrylamid-Gel (Serva, Heidelberg, Germany) bestehend aus insgesamt 12 Taschen und einem Ladevolumen pro Tasche von 20 µl. Dabei sollte die Proteinmenge pro Tasche zwischen 0,1 0,5 µg liegen[29]. Der verwendete Laufpuffer Rotiphorese 10x SDS-Page stammt von der Firma Carl Roth. Die angelegte Spannung betrug 250 V und die Laufzeit betrug 40 min und als Molekulargewichtsmarker wurde der Seebule Plus 2 Pre-Straind Protein Standard (Thermo) verwendet. Das Färben des Gels erfolgte über Nacht mit RotiBlue-Lösung, bestehend aus 6 Teilen ddH₂O, 2 Teilen RotiBlue 5x (Roth) und 2 Teilen 99%igen Ethanol. Das Entfärben erfolgte mit einer Waschlösung (2,5 Teile 99%iger Ethanol, 7,5 Teile ddH₂O) bis zu 24 Stunden bzw. bis die Banden gut sichtbar waren.

3.6. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma eurofins genomics. Die Ergebnisse wurden mit der Software *Snappene* (GSL Biotech LLC) und einem Sequenzalignment (LALIGN) überprüft [30 32].

3.7. Anzucht von Mikroorganismen

Für die Transformation von Bakterien- und Hefezellen mit dem Expressionsvektor ist es notwendig, dass die verwendeten Zellen die Fähigkeit erlangen artfremde freie DNA aufzunehmen (kompetente Zellen).

3.7.1. Herstellung von elektrokompenten *Escherichia coli*-Zellen

Für die Herstellung von elektrokompenten *E. coli* Zellen wurde zunächst eine Vor-kultur (20 ml LB-Medium) unter einer Sicherheitswerkbank mit einer einzelnen *E. coli* JM109 von einer Agarplatte Kolonie angeimpft und diese über Nacht bzw. bis zu einer deutlichen Trübung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 1,4 ml LB-Medium mit

50 µl Vorkultur angeimpft und bis zum Auftreten von Schlieren bei 37 °C für 2 Stunden und 700 rpm inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Kühlzentrifuge bei 4 °C, 1 min und 5000 xg zentrifugiert. Um die Zellen vom Medium abzutrennen, wurde das Zellpellet zweimal mit 4 °C kalter Glycerinlösung (10 % (w/w)) gewaschen. Abschließend wurde 900-950 µl Überstand abgenommen und das Pellet in der restlichen Lösung resuspendiert. Die elektrokompenten Zellen wurden bis zur Transformation auf Eis (Kurzzeitlagerung von 1-2 Stunden) und langfristig, als Glycerinstock (Endkonzentration 15 %), bei –80 °C gelagert.

3.7.2. Herstellung von elektrokompenten

Pichia pastoris-Zellen

Die Herstellung der elektrokompenten Hefezellen erfolgte aus zwei unterschiedlich angesetzten Vorkulturen. Bei der ersten Variante (Variante 1, V1) wurden 50 ml YPD ohne Glucose (500 ml Schikanekolben) mit einer einzelnen frischen WT *Pichia pastoris* Kolonie von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Aus dieser Übernachtkultur wurden elektrokompente Zellen hergestellt. Im Gegensatz zu der ersten Variante wurde bei der zweiten Vorkultur (Variante 2, V2) 10 ml YPD mit Glucose mit einer WT-Kolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C bei 200 rpm über Nacht. Anschließend wurden aus der Übernachtkultur V2 50 ml YPD-Medium mit Glucose (500 ml Schikanekolben) mit einer Ziel-OD₆₀₀ von 0,1-0,2 angeimpft. Es folgte eine Inkubation bei 30 °C unter leichtem Schütteln der neu angeimpften Kultur bis zu einer OD von 0,6 1,0. Aus dieser Kultur wurden elektrokompente Hefezellen hergestellt. Das weitere Vorgehen zur Herstellung elektrokompenter Hefezellen ist für beide Varianten identisch. Zunächst ist die jeweilige hergestellte Kultur für 30 min auf Eis inkubiert worden. Ein Aliquot von 25 ml wurde entnommen und für 5 min bei 5000 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde darauf folgend insgesamt zweimal mit 25 ml EDS-Lösung gewaschen, um die Medienrückstände vollständig zu entfernen. Abschließend ist das Zellpellet in 1 ml EDS Lösung resuspendiert worden. Die Hefezellen sind elektrokompent und können für die Transformation verwendet werden. Die Kurzzeitlagerung (1 2 Stunden) erfolgt bis zur Transformation auf Eis. Für die langfristige Lagerung wurden die Zellen als Glycerinstock (Endkonzentration 15 %) bei –80 °C gelagert. Hierbei wurde auf ein langsames abkühlen auf –80 °C unter Einsatz geeigneter Maßnahmen (Styroporbox) geachtet.

3.7.3. Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation von *E. coli* und *Pichia pastoris* wurde die Elektroporation verwendet. Das Prinzip beruht auf dem Erzeugen eines kurzen elektrischen Impulses mit einer bestimmten Feldstärke. Dies führt zur Ausbildung von Poren [33]. Die Plasmid-DNA kann durch diese entstandenen Poren in die Zelle gelangen. Voraussetzung für den Plasmid-Transfer sind elektrokompetente Zellen, in möglichst Ionen-freier Lösung (Kurzschlussgefahr!). Geeignete Bedingungen wie Zellvolumen, Plasmidmenge und eingesetzte Feldstärke für eine Elektroporation sind von dem jeweiligen verwendeten Bakterien- bzw. Hefestamm abhängig und sind empirisch zu ermitteln [34].

3.7.4. Elektroporation von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden jeweils unterschiedliche Volumina (1 μ l bzw. 2,5 μ l) des Golden Gate Ansatz (zirkuläre Plasmid-DNA) zu 100 μ l elektrokompetenten *E. coli* JM109 Zellen pipettiert. Die Verwendung unterschiedlicher DNA-Konzentrationen hat den Vorteil, dass die Transformations-Häufigkeit damit erhöht werden kann [34, 35]. Für die Elektroporation wurde der Eporator der Firma Eppendorf mit folgenden Einstellungen verwendet: Spannung: 1,7 kV, Kapazität 10 μ F, Widerstand 600 Ω und einer Elektroporationsküvette mit einem 1 mm Spalt (gekühlt auf -20°C). Zur Regeneration der Zellen wurde unmittelbar im Anschluss 1 ml, 4°C kaltes, LB-Medium hinzugegeben. Die resuspendierte Bakterienlösung wurde dann für bis zu 2 Stunden bei 37°C , 800 rpm inkubiert um die Expression der Resistenzgene zu ermöglichen. Anschließend wurden 100 μ l der Suspension auf LB-Medium mit Zeocin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgestrichen. Die Zellen der verbleibenden Bakterienlösung wurden mittels Zentrifugation (5000 $\times g$, 1 min) sedimentiert und in 100 μ l Nährmedium resuspendiert, ausgestrichen und für 24 h bei 37°C inkubiert. Bei dem Verfahren erfolgte parallel eine Negativkontrolle, bei dem der Vektor durch ddH₂O ersetzt wurde. Für weitergehende Untersuchungen wurden nach der Inkubation von einzelnen ausgewählten Kolonien, mittels fraktionierten Verdünnungsausschlag, Reinkulturen (LB mit Zeocin-Zusatz) angelegt. Nach einer Inkubation der Platten für 24 h bei 37°C wurden diese kurzfristig (max. 4 Wochen) bei 4°C gelagert.

3.7.5. Plasmid-Linearisierung

Die Hefe-eigene homologe Rekombination in das Genom kann nur über einen linearen Vektor erfolgen. Über die Wahl der Schnittstelle wird der Ort festgelegt, an dem der Expressionsvektor in das Genom integriert wird. Das verwendete Restriktionsenzym *PmeI* schneidet an der 415. Base innerhalb der *pAOX1*-Gensequenz des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP. *Pichia pastoris* rekombiniert den linearen Vektor vorzugsweise in die genomische *pAOX1*-Gensequenz. Der Verdau-Ansatz ist in der Tabelle 3.4 dargestellt. Der

Restriktions-Ansatz wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Enzym bei 65 °C inaktiviert. Nach dem Verdau wurde das linearisierte Plasmid aufkonzentriert. Dafür wurden 150 µl des Reaktionsansatzes mit 15 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 375 µl Ethanol (99 %, −20 °C) vermengt. Nach dem Schütteln (Vortex), Einfrieren (−80 °C) für 2 Stunden und Zentrifugation (15 min, 13 0000 xg, 4 °C) wurde das Pellet mit 1 ml Ethanol (70 %, −20 °C) gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 13 0000 xg, 4 °C) wurde das Pellet an der Luft getrocknet und abschließend in ddH₂O gelöst. Das linearisierte Plasmid kann direkt für die Transformation in *Pichia* verwendet werden.

Tabelle 3.4.: Plasmid-Linearisierung

Reagenz	Konzentration	Volumen	Finale Konzentration
<i>PmeI</i>	10 U/µl	3 µl	30 U/Reaktion
Puffer	10x	15 µl	1x
Plasmid	125-250 ng/µl	120 µl	15-30 µg/Reaktion
ddH ₂ O	-	12 µl	-

3.7.6. Elektroporation von *Pichia pastoris*

Die Transformation von *Pichia*-Zellen erfolgte mit einem linearisiertem Vektor. Dazu wurden 1 µg des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP zu 100 µl elektrokompente *Pichia* WT-Zellen gegeben. Die Elektroporation (Eporator) erfolgte mit folgenden Einstellungen: Spannung: 2,5 kV, Kapazität 10 µF, Widerstand 600 Ω und einer Elektroporationsküvette (gekühlt auf −20 °C) mit einem 2 mm Spalt. Zur Regeneration wurde 1 ml YPD-Medium (4 °C) unmittelbar im Anschluss zu der Zellsuspension gegeben. Die Selektion der transformierten Zellen erfolgte nach einer Inkubation der Zellsuspension (30 °C, 2,5 h, 500 rpm) auf YPD-Agar mit Zeocin (100 µg/ml). Anschließend wurde von der Zellsuspension und der Negativkontrolle ein Aliquot (100 µl) ausgestrichen und die verbleibende Restmenge zentrifugiert (5000 xg, 1 min). Der Überstand wurde bis auf 100 µl entfernt, das Pellet resuspendiert, ausplattiert und für 48 Stunden bei 30 °C inkubiert. Bei dem Verfahren erfolgte parallel eine Negativkontrolle, bei dem der Vektor durch ddH₂O ersetzt wird. Für nachfolgende Untersuchungen sind von einzelnen ausgewählten Kolonien mittels 3-Ösenausstrich-Verfahren Reinkulturen auf YPD-Nährmedium mit Zeocinzusatz angelegt worden. Die Inkubation erfolgte für 48 h bei 30 °C. Die Lagerung der Platten erfolgte für maximal zwei Wochen bei 4 °C.

3.7.7. *small-scale* Kultivierung

Die eingesetzte Zellkulturplatte verfügt über 6 *wells* mit einem Arbeitsvolumen von 4 ml und wurde für die Testexpression des eGFP-Proteins verwendet. Insgesamt erstreckte sich die Kultivierung über 168 Stunden. Dazu wurden 2,5 ml Kulturmedium BMG1 (1 % Glucose) mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die *plates* wurden mit einer gasdurchlässigen Folie und einem Deckel verschlossen und bei 30 °C, 90 rpm, 72 h inkubiert. Mit der gewählten Schüttelfrequenz sollte ein ausreichender Sauerstoffeintrag sichergestellt sein. Nach 72 Stunden erfolgte die erstmalige Induzierung der Proteinexpression, d. h die Umstellung des Stoffwechsels von Glucose auf Methanol durch Zugabe von 2,5 ml BMM1 (1 % MeOH). Zur Aufrechterhaltung des Methanolstoffwechsels erfolgte zunächst nach weiteren 8 h eine Zugabe von 0,5 ml BMM5 (5 % MeOH) und dann eine tägliche Methanolzugabe (0,5 ml BMM5) bis zum Abbruch der Fermentation nach 168 h. Nach Abschluss wurden die Kulturzellsuspensionen des jeweiligen *well* in ein geeignetes Gefäß überführt und für weitergehende Arbeiten bei 4 °C gelagert.

Eine Zellernte erfolgte nach 120 h. Dafür wurden aus jedem *well* 100 µl Kulturbrühe entnommen, die Zellen mittels Zentrifugation (5000 xg, 10 min) sedimentiert und der Überstand entfernt. Für weitere Untersuchungen wurde das Zellpellet kurzfristig bei 4 °C und langfristig bei -20 °C gelagert. Der jeweilige Überstand wurde bei Bedarf analog gelagert.

3.7.8. Zellaufschluss der *Pichia pastoris*-Zellen

Der Zellaufschluss der Hefezellen erfolgt mittels Ultraschall-Desintegrator, bestehend aus einem Hochfrequenz-Generator, dem Schallwandler (Umwandlung der Hochfrequenz in mechanische Schwingungen) und der Sonotrode. Die Sonotrode überträgt die mechanische Schwingung in die Flüssigkeit. Durch diese Übertragung kommt es zur Ausbildung von Kavitationsblasen mit einer ungefähren Größe von 100 µm. Beim Kollabieren dieser Blasen entstehen hohe Drücke ($>1 \cdot 10^8$ Pa) und Geschwindigkeiten von 500 m·s⁻¹. Diese auftretenden Scherkräfte können die Zellwand zerstören [36]. Die einzelnen Parameter (Amplitude, Tastverhalten (Cycle), Temperatur) müssen empirisch, je nach Mikroorganismus, ermittelt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung und Charakterisierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP

4.1.1. Überprüfung der Isolierung des Zielvektors pBSY2Z

Der für die Klonierung gewählte Zielvektor pBSY2Z wurde aus *E. coli* JM109 isoliert (siehe Abschnitt 3.4.1). Überprüft wurde dies mittels einer Check-PCR (siehe Abschnitt 3.2) und der gelelektrophoretischen Auftrennung (siehe Abschnitt 3.5.1). Das Amplifikat der beiden verwendeten Primer 16 und 17, die am *AOX1*-Promotor bzw. *AOX1*-Terminator binden, hat die Größe von 569 bp. Die auf dem Gel sichtbare Bande (Spur 1) liegt leicht oberhalb der 500 bp Markerbande und konnte deshalb dem erwarteten PCR-Produkt zugeordnet werden (Abb. 4.1). Die Negativkontrolle (NK; ddH₂O) hat wie zu erwarten keine Bande. Die spektralfotometrische Reinheitsbestimmung des Plasmids ergab ein Absorptionsverhältnis von 1,84 bei dem Wellenlängenverhältnis 260/280, sowie 1,69 bei 260/230. Der isolierte und aufgereinigte Zielvektor wurden für die weiteren Klonierungen verwendet.

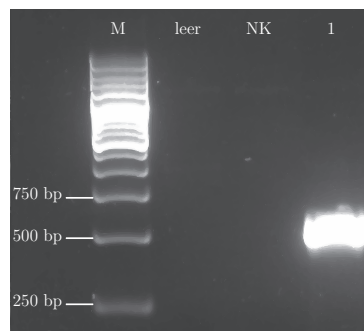


Abbildung 4.1.: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes *pBSY2Z*
Reihenfolge links nach rechts, zuzüglich der erwarteten Größe: Marker M (250 bp-DNA-Leiter, Roth), leer, Negativkontrolle NK (ddH₂O), 1 – pBSY2Z (569 bp); Gel: 1,5 % Agarose, Laufpuffer: TAE, Spannung: 120 V, DNA Gel Stain: SYBR-Safe, Laufzeit 40 min

4.1.2. PCR-Amplifikation des *eGFP*-Gens

Um das auf dem Vektor pET30_*eGFP* befindliche *GOI* zu amplifizieren, war es notwendig zunächst den Vektor aus *E. coli* JM109 zu isolieren (siehe Abschnitt 3.4.3). Es folgte die Amplifikation des gewünschten *eGFP*-Genabschnittes, mit gleichzeitiger Verlängerung um *SapI*-Schnittstellen, via Klonierungs-PCR (siehe Abschnitt 3.2). Die gewählten Primer 38 und 39 binden an die *eGFP*-Gensequenz und führen die Schnittstellen-Verlängerung vor dem endogenen Start- (*forward*-Primer 38) und Stopcodon (*reverse*-Primer 39) ein. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt und um die maximale Ausbeute an PCR-Produkt zu erreichen, wurde die Inkubationszeit des Elutionspuffers von 1 min auf 5 min erhöht. Das aufgereinigte PCR-Produkt, mit der theoretischen Größe von 752 bp, wurde zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.2). Die auf dem Gel sichtbare Bande (Abb. 4.2, Spur 1) des PCR-Produkts ist auf Höhe der 750 bp Markerbande und konnte somit dem gewünschten *eGFP*-Genabschnitt zugeordnet werden. Bei der Negativkontrolle mit ddH₂O als Template ist keine Bande vorhanden. Die Konzentration lag bei 62 ng/μl. Die Reinheit betrug 1,86 (260/280) bzw. 1,73 (260/230). Das amplifizierte *GOI* wurde für die anschließende Golden Gate Reaktion eingesetzt.

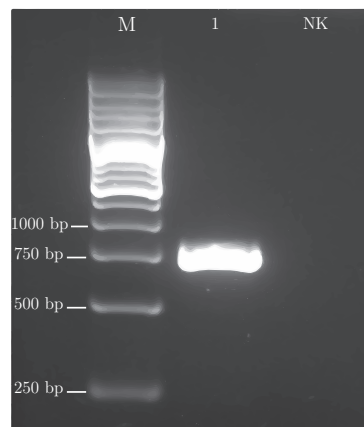


Abbildung 4.2.: Elektrophoretische Auftrennung des PCR-Produktes *eGFP*

Reihenfolge links nach rechts, zuzüglich der erwarteten Größe: Marker M (250 bp-DNA-Leiter, Roth), 1 – *eGFP* (752 bp), NK (ddH₂O); Gel: 1,5 % Agarose, Laufpuffer: TAE, Spannung: 120 V, DNA Gel Stain: SYBR-Safe, Laufzeit 40 min

4.1.3. Ligation des Expressionsvektor pBSY2Z_*eGFP*

Die Ligation der nun zueinander komplementären Zielvektor-DNA (pBSY2Z) und des *GOI* (*eGFP*) erfolgte mittels der Golden Gate Klonierung (siehe Abschnitt 3.3). Dieser Ansatz wurde anhand einer Check-PCR und Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abb. 4.3). Auf dem Gel sind beim PCR-Produkt dieses Golden Gates Ansatzes entgegen der Erwartung zwei Banden unterschiedlicher Größe, aber ähnlicher Intensität vorhanden (Abb.

4.3, Spur 1). Die erste Bande liegt knapp unterhalb der 1000 bp Markerbande und entspricht damit der Positivkontrolle (PK; pBSY2Z_eGFP Amplifikat (P16 und 17) mit 859 bp). Zudem liegt die Bande auf Höhe der zu erwartenden Größe des PCR-Produktes pBSY2Z_eGFP (Primer 16 und 17) von 859 bp. Damit konnte diese Bande dem Golden Gate Produkt pBSY2Z_eGFP zugeordnet werden. Die zweite und nicht erwartete Bande liegt auf Höhe der zweiten Negativkontrolle (NK2; pBSY2Z Amplifikat (P16 und 17) mit 569 bp). Damit deutete die Kontrolle der Ligation darauf hin, dass im Golden Gate Ansatz ein Gemisch aus Zielvektor pBSY2Z und dem Endprodukt pBSY2Z_eGFP vorlag. Trotz dieser Tatsache wurde der Golden Gate Ansatz für die nachfolgende Transformation in *E. coli* verwendet, weil die Klonierung des gewünschten Expressionsvektors nachweislich stattfand. Die Negativkontrolle NK1 (ddH₂O) hat erwartungsgemäß keine Auffälligkeiten.

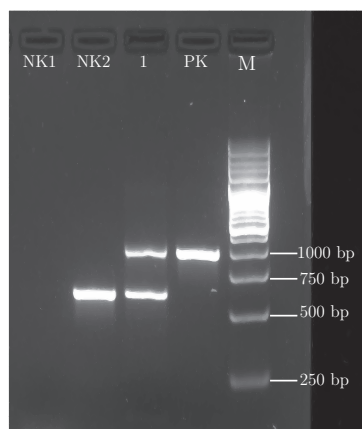


Abbildung 4.3.: Überprüfung des Golden Gate Ansatz mittels Check-PCR auf den Expressionsvektor pBSY2Z_eGFP via Agarose Gelelektrophorese

Reihenfolge der PCR-Produkte links nach rechts, zuzüglich der erwarteten Größe: NK1 (ddH₂O), NK2 (pBSY2Z: 569 bp), 1 – Golden Gate Ansatz pBSY2Z_eGFP (859 bp), PK (859 bp), Marker (250 bp-DNA-Leiter, Roth); Gel: 1,5 % Agarose, Laufpuffer: TAE, Spannung: 100 V, DNA Gel Stain: SYBR-Safe, Laufzeit: 40 min

4.2. Transformation von *Escherichia coli*

4.2.1. Elektroporation und Selektion

Der vorliegende Golden Gate Ansatz wurde für die Transformation mittels Elektroporation von elektrokompententen *E. coli* JM109 Zellen (siehe Abschnitt 3.7.1) verwendet. Die transformierten Zellen wurden auf ihre Zeocin-Resistenz hin selektiert (siehe Abschnitt 3.7.4). Es sind insgesamt fünf Transformationen und eine Negativkontrolle durchgeführt worden. Dabei haben sich die folgenden Spannungswerte und Elektroporationszeiten ergeben: (1) 1 µl bei 1590 V und 3,9 ms; (2) 1 µl bei 1610 V und 4,3 ms; (3) 2,5 µl mit 1530 V und 3,0 ms; (4) 2,5 µl mit 1570 V und 3,4 ms; (5) neg. Kontrolle bei 1610 V und

5,1 ms. Die Zeiten und Spannungswerte können aufgrund von laborinternen Erfahrungswerten als akzeptabel angesehen werden (persönliche Mitteilung F. Schiffl). Insgesamt sind neun Kolonien gewachsen. Bei der Negativkontrolle war keine Kolonie ersichtlich gewesen.

Anschließend erfolgte die Überprüfung aller Einzelkolonien (Klone) auf den gewünschten Vektor pBSY2Z_eGFP. Dafür wurde zunächst die DNA aus den Klonen isoliert (siehe Abschnitt 3.4.3 und anschließend eine Check-PCR (Primer 16 und 17) mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 4.4). Bei den PCR-Produkten von insgesamt acht von neun Klonen (Abb. 4.4, K1-K3, K5-K9) ist ein positives Signal sichtbar. Die vorhandenen Banden entsprechen dem PCR-Produkt des Vektors pBSY2Z_eGFP mit der definierten Länge von 859 bp und decken sich ebenfalls mit der Positivkontrolle (PK; pBSY2Z_eGFP Amplifikat, P16 und 17, 859 bp). Im Gegensatz dazu befindet sich die Bande des PCR-Produktes von Klon 4 (K4) leicht oberhalb der 600 bp Markerbande und entspricht zusätzlich der zweiten Negativkontrolle (NK2; pBSY2Z Amplifikat, P16 und 17, 569 bp). Der Klon 4 hat somit nicht den gewünschten Vektor transformiert. Bei der ersten Negativkontrolle ist keine Bande existent. Die positiv identifizierten Klone wurden für die Vervielfältigung des *high-copy number*-Plasmids verwendet.

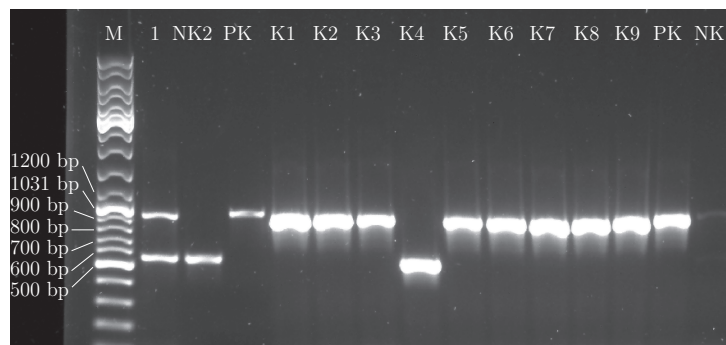


Abbildung 4.4.: Überprüfung der *E. coli* Klone auf den Expressionsvektor pBSY2Z_eGFP nach Elektroporation und Selektion

Elektrophoretische Auftrennung folgender PCR-Produkte (von links nach rechts, zuzüglich der erwarteten Größe): Marker M (O'GeneRuler SM1173), 1 – nicht relevant, NK2 – pBSY2Z (569 bp), PK (859 bp), Klon 1–9 (K1–K9, 859 bp), PK (859 bp), NK (ddH₂O); Gel: 1,5% Agarose, Laufpuffer: TAE, Spannung: 100 V, DNA Gel Stain: SYBR-Safe, Laufzeit 45 min

4.2.2. Isolierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP

Nach der Identifikation positiver Klone erfolgte die Vervielfältigung und Isolierung des *high-copy number*-Plasmids pBSY2Z_eGFP (siehe Abschnitt 3.4.2). Um die Qualität der Aufreinigung zu beurteilen, wurden während dessen zu vier Zeitpunkten Aliquots entnommen und mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht (Abb. 4.5). Insgesamt ergaben sich 10 Proben aus zwei parallel durchgeführten Midiprep-Ansätzen (Probe S1, Probe S2).

- *Cleared lysate* (CL; Probe CL S1/-S2): Überstand nach alkalischem Zellaufschluss und Zentrifugation; Kontrolle des Zellaufschlusses; Erwartungshaltung: im Überstand ist zirkuläre Plasmid-DNA sowie abgebaute RNA vorhanden (DNA-Bande auf dem Gel ersichtlich).
- *Flow through* (FL; Probe FL S1/-S2): Säulendurchfluss des Überstandes (CL); Aussage über Bindungseffizienz von Plasmid-DNA an die feste Phase; Erwartungshaltung: im Überstand ausschließlich abgebaute RNA vorhanden (keine DNA-Bande auf dem Gel ersichtlich).
- *Wash fraction* (WF1, WF2; Probe WF1 S1/-S2, WF2 S1/-S2): Säulenreinigung mittels Waschpuffer im Volumenverhältnis 1:1 WF1 zu WF2; Aussage über Elutionseffizienz der Kontamination und Bindungseffizienz von Plasmid-DNA an die feste Phase; Erwartungshaltung: Entfernung ungebundener Kontaminationen sowie RNA (keine DNA-Bande auf dem Gel ersichtlich).
- *Eluate* (EL; Probe EL S1/-S2): Elution der reinen Plasmid-DNA mittels Elutionspuffer (DNA-Bande auf dem Gel ersichtlich).

Zusätzlich zu den Proben wurde das nach Abschluss der Aufreinigung erhaltene und getrocknete DNA-Pellet (DNA P S1/-S2) auf das Agarosegel aufgetragen. Das Ergebnis der Aufreinigung war wie folgt (Abb. 4.5):

- *Cleared lysate*: Bei der Probe CL S2 ist eine Bande wie erwartet (3500 bp) sichtbar, hingegen bei CL S1 keine Bande vorhanden ist.
- *Flow through*: Bei beiden Proben (FL S1/-S2) ist wie erwartet kein Signal vorhanden.
- *Wash fraction*: Analog zu FL S1/-S2.
- *Eluate*: Wie zu erwarten ist bei EL S2 ein Signal vorhanden, die nicht vorhandene Bande bei EL S1 deckt sich mit dem Ergebnis der CL S1 Fraktion.
- DNA P S1/-S2: Analog zu EL S1/-2, folglich war ein Ansatz (S2) erfolgreich.

Das aufgereinigte und isolierte DNA-Pellet von S2 wurde anschließend mittels Spektrofotometrie auf Reinheit und Konzentration überprüft. Die Konzentration des Produktes lag bei 545 ng/µl. Das Absorptionsverhältnis von 260/280 entsprach 1,85 und 2,20 bei 260/230. Das DNA-Pellet wurde für die nachfolgende Ansequenzierung und Transformation in *Pichia pastoris* verwendet.

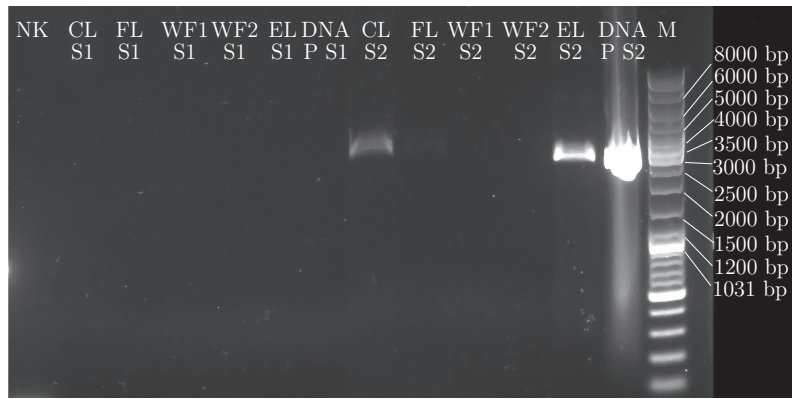


Abbildung 4.5.: Kontrolle der Isolierung des Vektors pBSY2Z_eGFP mittels Midi-prep

Elektrophoretische Auftrennung: Proben S1 und S2, entnommen während der Isolierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP aus *E. coli* JM109 Klon; S1: Entgegen der Erwartung kein Signal in CL-, EL-, und DNA-Pellet (DNA-P) Fraktion, FL und WF1/WF2 erwartungsgemäß; S2: Ergebnis alle Fraktionen (FL und WF1/WF2 keine Bande; CL, EL und DNA-P Bande vorhanden) wie erwartet; *cleared lysate* CL; *flow thought* FL; *wash fraction* WF1 und WF2; *eluate* EL; Gel: 1,5% Agarose, Marker M: O'GeneRuler SM1173, Laufpuffer: TAE, Spannung: 100 V, DNA Gel Stain: SYBR-Safe, Laufzeit 45 min

4.2.3. Ansequenzierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP

Das Golden Gate Produkt pBSY2Z_eGFP wurde mittels DNA-Sequenzierung auf die Richtigkeit der eingebauten eGFP Genkassette überprüft. Die entsprechenden Ergebnisse sind im Anhang A.3 aufgeführt. Die Überprüfung ergab, dass es zwischen der erwarteten *eGFP* Gensequenz und der im Zielvektor (pBSY2Z) eingebauten *eGFP* Genkassette keine Sequenzunterschiede gab (siehe Abschnitt 3.6, Anhang A.5).

4.3. Transformation von *Pichia pastoris*

4.3.1. Überprüfung des linearisierten pBSY2Z_eGFP Vektors

In Vorbereitung auf die Transformation der *Pichia*-Zellen wurde der Expressionsvektor mit dem Restriktionsenzym *PmeI* linearisiert und anschließend aufkonzentriert (siehe Abschnitt 3.7.5). Die quantitative Analyse ergab eine Konzentration von 760 ng/ μ l bei einer Reinheit von 1,80 (260/280) und 1,85 (260/230). Der Erfolg der Linearisierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (Abb. 4.6) überprüft. Zur weiteren Kontrolle wurde neben dem zirkulären und dem mit *PmeI* linearisierten Expressionsvektor das Plasmid mit einem Gemisch aus den beiden Restriktionsenzymen *PmeI* und *BsaI* geschnitten. Bei dem Verdau mit *PmeI* ist eine Bandengröße von 4102 bp zu erwarten. Mehrere Signale sind theoretisch beim zirkulären Plasmid möglich. Plasmid-DNA kann in unterschiedlichen Konformationen wie linear, *nicked circle*- oder *supercoiled*-DNA vorliegen. Der Verdau mit beiden Restriktionsenzymen *PmeI* und *BsaI* ergibt ein charakteristisches Muster von zwei Banden der Größe 1501 bp und 2601 bp. Die elektrophoretische Auftrennung des linearisierten Plasmids entsprach nur teilweise der Erwartungshaltung, denn es ist bei beiden Verdau-Ansätzen ein Banden-*upshift* sichtbar. So liegt die Bande bei dem Verdau mit *PmeI* (Abb. 4.6, Spur 2) ca. 850 bp oberhalb der zu erwartenden Größe. Im zweiten Verdau-Ansatz mit *PmeI* und *BsaI* beträgt der Banden-*upshift* ca. 150 bp, jedoch ergibt sich das charakteristische Verdauemuster von zwei Banden unterschiedlicher Größe (Abb. 4.6, Spur 1). Das Bandenmuster beim ungeschnittenen Plasmid entsprach der Erwartung und deutet auf zwei unterschiedliche Konformationszustände hin: *supercoil*-DNA auf Höhe von 2250 bp und *nicked circle* oberhalb der 8000 bp Markerbande (Abb. 4.6, Spur 3).

Aufgrund der bestätigten Richtigkeit der eingebauten eGFP-Genkassette im Expressionsvektor, des charakteristischen Verdau-Musters (*PmeI* und *BsaI*) und der fehlenden unverdauten Plasmid-DNA wurde der linearisierte Expressionsvektor trotz vorhandenen *upshift* für die nachfolgenden Experimente verwendet. Zudem gab es während der Arbeiten im Labor eine Umstellung des für die Agarose-Gelelektrophorese notwendigen Nukleinsäurefärbungsmittel von SYBR-Safe zu GelGreen. Mit der Umstellung auf GelGreen wurde ein *upshift* bei der elektrophoretischen Auftrennung von restriktionsverdauter Plasmid-DNA im Labor beobachtet. Weitere Erläuterungen dazu sind im Abschnitt 5.2 *Pichia pastoris* als Expressionssystem zu finden.

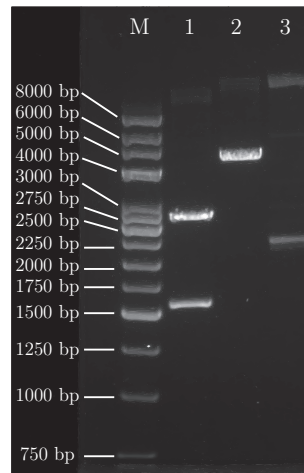


Abbildung 4.6.: Überprüfung der Linearisierung des Expressionsvektors pBSY2Z_eGFP

Reihenfolge von links nach rechts, zuzüglich der verwendeten Restriktionsenzyme und erwarteter Größe: Marker M (Quick Load 1 kp Plus Purple NEB), 1 – pBSY2Z_eGFP (*PmeI* und *BsaI*, 1501 und 2601 bp), 2 – pBSY2Z_eGFP(*PmeI*, 4102 bp), 3 – pBSY2Z_eGFP unverdaut (mehrere Banden); Gel: 1,2% Agarose Laufpuffer: TAE, Spannung: 80 V, DNA Gel Stain: GelGreen, Laufzeit: 95 min

4.3.2. Elektroporation und Selektion

Der linearisierte Expressionsvektor wurde für die Transformation (siehe Abschnitt 3.7.6) von *Pichia pastoris* eingesetzt. Dazu wurden elektrokompente WT-Hefezellen der Variante 1 (Vorkultur YPD ohne Glucose) und Variante 2 (Vorkultur YPD mit Glucose) mittels Elektroporation transformiert (siehe Abschnitt 3.7.2).

Folgende Spannungswerte und Elektroporationszeiten haben sich ergeben: (1) Variante 1: 2420 V für 5,6 ms; (2) Variante 2: 2440 V für 5,9 ms; (3) Negativkontrolle: 2240 V für 5,4 ms. Die Elektroporationszeiten und Spannungswerte können aufgrund von laborinternen Erfahrungswerten als akzeptabel angesehen werden (persönliche Mitteilung F. Schiffel). Die transformierten Zellen wurden auf ihre Zeocin-Resistenz hin selektiert. Folgende Ergebnisse ergaben sich nach Auszählung der Einzelkolonien:

- Variante 1: 191 Kolonien (100 μ l), 360 Kolonien (Pellet, resuspendiert; hochgerechnet)
- Variante 2: 236 Kolonien (100 μ l; hochgerechnet), 812 Kolonien (Pellet, resuspendiert; hochgerechnet)
- Negativkontrolle: keine Kolonien vorhanden (100 μ l und Pellet, resuspendiert)

Für die weiteren Arbeiten wurden von den Einzelkolonien (fünf von jeder Variante) Verdünnungsausstriche und für die langfristige Lagerung ein Glycerinstock angelegt (15%).

4.3.3. Molekularbiologische Charakterisierung der Transformanden

Nach der Transformation mussten die isolierten Klone auf die homologe Integration des linearen Vektors innerhalb der gewünschten genomischen *pAOX1*-Gensequenz überprüft werden. Dafür wurde zunächst die genomische DNA der einzelnen Klone mittels EtNa-Methode extrahiert (siehe Abschnitt 3.4.4) und anschließend eine Sequenzierungs-PCR mit zwei unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt (3.2. Das jeweilige Primerpaar wurde dabei so gewählt, dass der linke und rechte Übergang (Flanke) zwischen der genomischen DNA und dem integrierten linearisierten Plasmid amplifiziert wird (Abb. 4.7). Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle der Größe elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.8, Abb. 4.9). Das Amplifikat des Primerpaars 18/67 besitzt die Größe von 1226 bp (linker Übergang), das des Primerpaars 20/21 eine Größe von 1045 bp (rechter Übergang). Bei vier von fünf Klonen der ersten Variante (K1 K2, K4 K5) und bei allen untersuchten fünf Klonen der zweiten Variante (K1 K5) ist ein positives Signal zu sehen. Bei den genannten Klonen liegen die Banden in der jeweiligen erwarteten Größenordnung von 1226 bp bzw. 1045 bp. Die Negativkontrolle (ddH₂O) und der WT zeigen erwartungsgemäß kein Signal. Bei dem Klon 3 Variante 1 hingegen ist keine Bande vorhanden. Damit konnten neun Klone mit dem gewünschten Expressionsvektor identifiziert werden. Die insgesamt 10 Klone wurden für die funktionale Analyse verwendet. Für die kurzfristige Lagerung wurden von jedem Klon fraktionierte Einzelausstriche (YPD mit Zeocin 100 µg/ml) angelegt, eine langfristige Lagerung der Klone erfolgte als Glycerinstock (Endkonzentration 15 %) bei –80 °C.

Für einen ausgewählten Klon sollte die Richtigkeit der Sequenzübergänge bestätigt werden. Hierfür wurde das PCR-Produkt von Klon 3 V2 aufgereinigt (MicroSpin Cycle-Pure Kit) und mittels DNA-Sequenzierung überprüft. Die Größe und Sequenz des PCR-Produkts wurden überprüft und als richtig bestätigt. (siehe Abschnitt 3.6, Anhang A.4 und A.6).

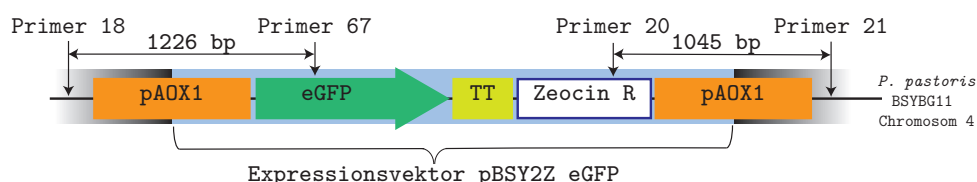


Abbildung 4.7.: Schematische Darstellung der durch Primerpaare entstehenden Flanken am Übergang genomische DNA und integrierten Vektor

linke Flanke: Primerpaar 18/67 – Größe 1226 bp; rechte Flanke: Primerpaar 20/21 – Größe 1045 bp

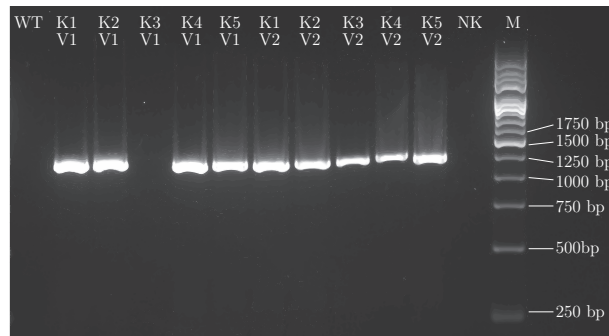


Abbildung 4.8.: Kontrolle der Sequenzierungs-PCR der linken Flanke des Übergangs genomische und integrierten Plasmid innerhalb der *pAOX1*-Gensequenz

Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (Sequenzierungs-PCR, Primerpaar 18/67) mit einer erwarteten Größe von 1226 bp; Reihenfolge von links nach rechts: WT, K1 V1 – K5 V1, K1 V2 – K5 V2, Negativkontrolle NK (ddH₂O), Marker M (Quick Load 1 kp Plus Purple NEB). Gel: 1,2 %, Laufpuffer: TAE, Spannung: 80 V, DNA Gel Stain: GelGreen, Laufzeit 75 min

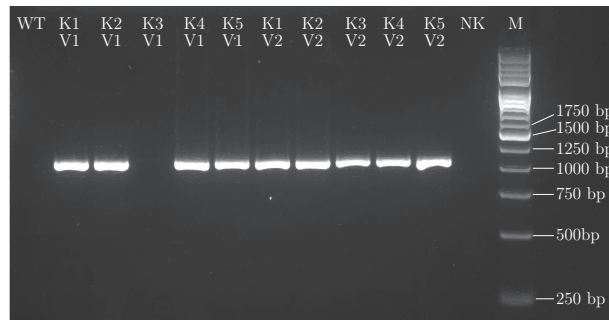


Abbildung 4.9.: Kontrolle der Sequenzierungs-PCR der rechten Flanke des Übergangs genomische und integrierten Plasmid innerhalb der *pAOX1*-Gensequenz

Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte (Sequenzierungs-PCR, Primerpaar 20/21) mit einer erwarteten Größe von 1045 bp; Reihenfolge von links nach rechts: WT, K1 V1 – K5 V1, K1 V2 – K5 V2, Negativkontrolle NK (ddH₂O); Marker M (Quick Load 1 kp Plus Purple NEB). Gel: 1,5 %, Laufpuffer: TAE, Spannung: 80 V, DNA Gel Stain: GelGreen, Laufzeit 75 min

4.4. Funktionale Analyse: Expression von intrazellulärem eGFP

4.4.1. eGFP Expression in einer *small-scale* Kultivierung

In der Testexpression sollte überprüft werden, ob die Klone durch Induzierung mit Methanol das gewünschte Zielprotein eGFP intrazellulär exprimieren. Um mehrere Klone parallel zu untersuchen, wurde sich für eine *small-scale* Kultivierung in einem *6-well-plate* entschieden (siehe Abschnitt 3.7.7). Untersucht wurden dabei jeweils die fünf Klone der Varianten 1 bzw. 2 aus den bisherigen Experimenten. Als Negativkontrolle diente

ein *Pichia pastoris* WT. Da bisher keine validierten Kultivierungsbedingungen für den *small-scale*-Ansatz erhoben sind, orientiert sich die nachstehende Kultivierung an einem laborinternen Protokoll, welches sich bereits in einem vorherigen Laborprojekt (Brandt und Pankewytsch, 2018) bewährt hatte. Die Kultivierung erstreckte sich insgesamt über 168 Stunden (Abb. 4.10). Als Kultivierungsmedium wurde BMG1 (Glucose 1%) verwendet. Die Induktion erfolgte nach 72 h mit BMM1 (1% MeOH) und zur Aufrechterhaltung des Methanolstoffwechsels wurde nach weiteren 8 h und dann einmal täglich BMM5 (5% MeOH) hinzugefügt.

Für eine erste Einschätzung hinsichtlich einer induzierten intrazellulären Expression des eGFP-Proteins wurden die nach 120 h entnommenen Zellpellets (siehe Abschnitt 3.7.7) unter UV-Licht (488 nm) betrachtet (4.11b, 4.11a). Dabei ist eine deutliche Fluoreszenz bei insgesamt 9 von 10 Klonen (K1 K2, K4 K5 V1, K1 K5 V2) erkennbar. Bei den WT und dem Klon 3 V1 ist keine Fluoreszenz sichtbar. Dieses Ergebnis entspricht somit den Erwartungen basierend auf den bisherigen Befunden (vgl. Abschnitt 4.3.3)

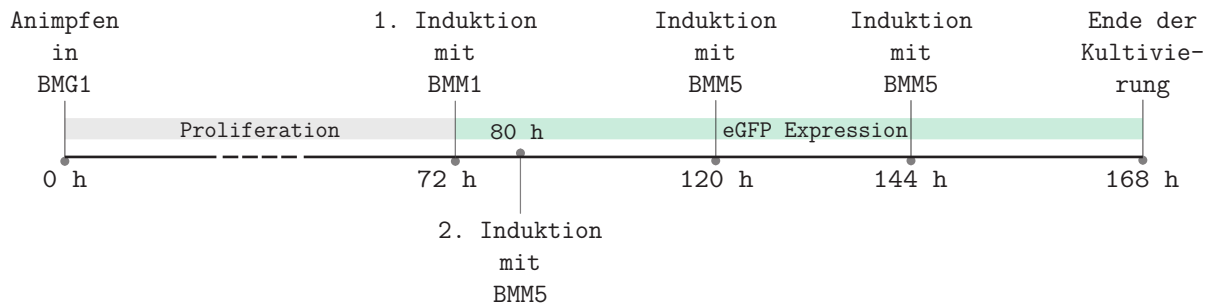
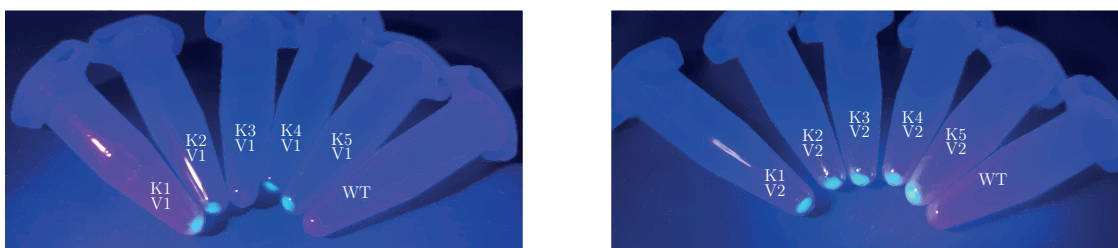


Abbildung 4.10.: Veranschaulichung *small-scale* Kultivierung mittels Zeitleiste
zeitlicher Verlauf der *small scale* Kultivierung: Aufbau Biomasse (Tag 1–Tag 3), Induzierung der eGFP-Expression durch Methanolzugabe (Tag 4–Tag 7)



(a) Zellpellet K1–K5 V1, WT

(b) Zellpellet K1–K5 V2, WT

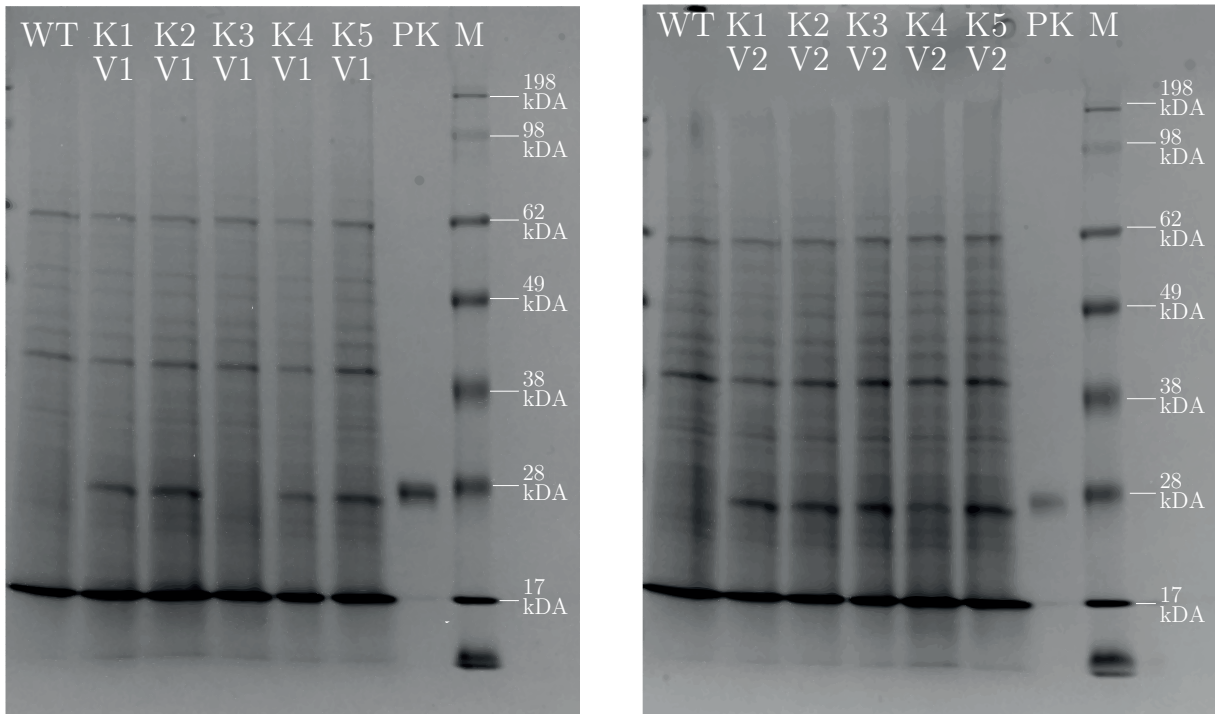
Abbildung 4.11.: Aufnahme der Zellpellets unter UV-Licht

Aufnahme der während der Kultivierung entnommenen Zellpellets (120 h) unter UV-Licht (488 nm); (a) – Pellets der Klone K1, K2, K4, K5 der Variante 1 zeigen eine eGFP-typische Fluoreszenz (509 nm), der WT und Klon K3 keine; (b) – WT keine Fluoreszenz sichtbar, alle Klone V2 (K1–K5) zeigen eGFP-typische Fluoreszenz

Um einen weiteren Nachweis auf das intrazellulär lokalisierte eGFP-Protein zu erhalten, erfolgte eine gelelektrophoretische Analyse (SDS-PAGE, siehe Abschnitt 3.5.2). Hierfür

wurden die Zellen mittels Ultraschall (siehe Abschnitt 3.7.8) aufgeschlossen. Das Ultraschallverfahren hatte sich in laborinternen Vorversuchen für den Zellaufschluss von *Pichia* Zellen, als ausreichend bewährt (persönliche Mitteilung Herr J. Gebler). Um die für die SDS-PAGE notwendige Proteinmenge pro Tasche und somit sichtbare Banden auf dem Gel zu erhalten, wurden in Vorversuchen die Einwirkzeit (Ultraschallaufschluss) und das aufzutragende Volumen (SDS-PAGE) ermittelt (Daten nicht gezeigt). Die verwendeten Ultraschallparameter (Cylce: 0,4; Amplitude 50% und Einwirkzeit 1 min) und das Volumen von 20 μ l pro Tasche (SDS-PAGE) hatten sich als ausreichend gut zum Nachweis herausgestellt. Um die notwendige Gesamtproteinmenge nach dem Zellaufschluss im Überstand zu erhalten, war es zudem erforderlich eine Mindestzelldichte im Aufschlussmedium einzustellen. Weil bisher diesbezüglich keine Erkenntnisse für *Pichia* im Labor vorlagen, wurde auf die SDS-PAGE-Probenvorbereitung von *E. coli* Zellen zurückgegriffen und für *Pichia pastoris* erarbeitet.

Die *E. coli* Kultur wurde auf eine virtuelle OD₆₀₀ von 10 eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von ca. $8 \cdot 10^9$ Zellen/mL. Das Volumen von Hefezellen ist ca. 20-mal größer als das einer *E. coli* Zelle (Persönliche Mitteilung S. Noll). Aus diesem Grund sollen 20-mal weniger Zellen im gleichen Volumen vorliegen (ca. $4 \cdot 10^8$ Zellen/mL), um eine ähnliche Gesamtproteinmenge auf das Gel zu laden. Um diesen Wert zu erreichen, wurde die *Pichia pastoris* Kultur auf eine virtuelle OD₆₀₀ von 13 eingestellt. Dazu wurde zunächst die OD₆₀₀ der Kultur gemessen. Anschließend wurden 2 ml der Kultur pelletiert (5000 xg, 5 min). Über die ursprüngliche OD₆₀₀ ließ sich das Volumen an NaCl-Lösung (9 g/l) berechnen, in der das Pellet gelöst werden musste, um eine virtuelle OD₆₀₀ von 13 zu erhalten und im Anschluss die Zellen mittels Ultraschall aufzuschließen. Nach der anschließenden SDS-PAGE-Probenvorbereitung (siehe Abschnitt 3.5.2) wurde die Proteinmischung der Klone und des WT, zuzüglich einer Positivkontrolle (GFP Standard AK Sanders, HAW Hamburg) via SDS-PAGE untersucht. Das zu erwartende Molekulargewicht des Proteins eGFP (Proteinsequenz siehe Anhang A.2) beträgt theoretisch 26,8 kDA. In den Abbildungen 4.12a und 4.12b ist zu erkennen, dass alle Klone beider Varianten eine Bande leicht unterhalb der PK und der 28 kDA Markerbande aufweisen. Ausnahme hierzu bildet der Klon 3 V1. Der WT zeigt erwartungsgemäß keine Bande auf Höhe von 26,8 kDA. Das Ergebnis unterstützt die bisherigen Analysen (vgl. Abschnitt 4.3.3) und es konnte für 9 Klone ein intrazellulär vorliegendes eGFP-Protein nachgewiesen werden



(a) WT, Klone K1–K5 Variante 1, GFP

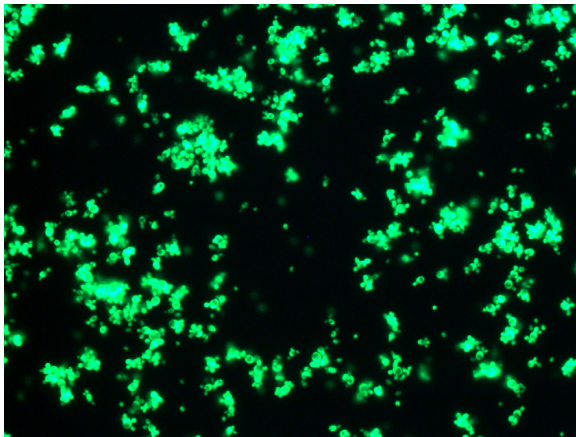
(b) WT, Klone K1–K5 Variante 1, GFP

Abbildung 4.12.: SDS-Page des intrazellulären exprimierten eGFP nach Zellaufschluss

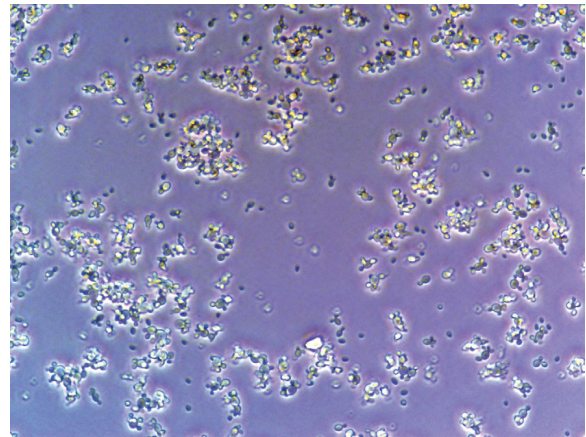
SDS-PAGE der mittels Ultraschall (Cylce: 0,4; Amplitude 50 % und Einwirkdauer 1 min) aufgeschlossen Klone. Erwartung: Bande kurz unterhalb der 28 kDA Marker- und GFP-Standard-Bande; **(a)** – WT, Klon 3 V1 keine Bande sichtbar, K1–K2 und K4–K5 Bande entsprechend Erwartung vorhanden; **(b)** – WT keine Bande sichtbar, K1–K5 V2 sichtbare Bande leicht unterhalb 26,8 kDA; SDS-Gel: 12%ig Acrylamid ohne SDS; Laufpuffer: Rotiphorese SDS Page; Laufbedingungen: 200 V, 60 min; Marker: SeeBlue Plus2 Pre-Strained Protein Standard; Färbelösung Coomassie Blue

4.4.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

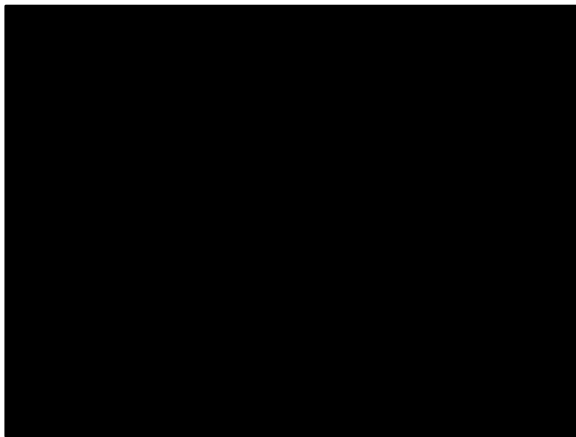
Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung soll eine Aussage liefern, ob das eGFP-Protein intrazellulär vorliegt. Dazu wurde nach der Fermentation die Kulturzellsuspensionen eines ausgewählten Klon (Klon 3 V2) unter einem Fluoreszenzmikroskop ($\lambda_{A \max} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{E \max} = 509 \text{ nm}$) betrachtet (siehe Abschnitt 4.13). Unter den Aufnahmen erscheinen die transformierten Zellen grün, aufgrund des intrazellulär lokalisiert vorliegenden eGFP-Protein (Abb.4.13a). Der WT, als Negativkontrolle, zeigt unter dem UV-Licht keine Fluoreszenz (Abb. 4.13c).



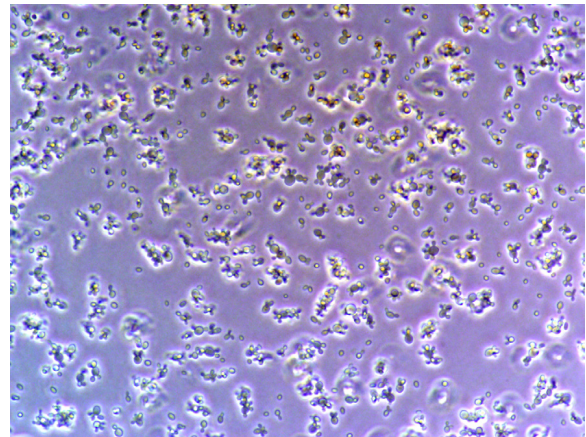
(a) Klon 3 V2, UV-Licht



(b) Klon 3 V2, sichtbares Licht



(c) WT, UV-Licht



(d) WT, sichtbares Licht

Abbildung 4.13.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme *Pichia pastoris*-Zellen nach induzierter Proteinexpression.

(a) UV-Licht: Klon 3 V2 mit grüner Fluoreszenz; (b) sichtbares Licht: gleicher Bildausschnitt wie (a) keine Fluoreszenz; (c) UV-Licht: WT-Zellen keine Fluoreszenz, (d) sichtbares Licht: WT-Zellen, gleicher Bildausschnitt wie (c) keine Fluoreszenz; Fluoreszenzmikroskop: 400x vergrößert, Anregung bei 488 nm, Emission 509 nm

Die Ergebnisse der funktionalen Analyse deckten sich mit den der molekularbiologischen Charakterisierung. Klone, bei denen ein Übergang zwischen genomischer DNA und integriertem Plasmid innerhalb der genomischen *pAOX1* Gensequenz nachgewiesen wurde, zeigten eine entsprechende Bande auf dem SDS-Gel. Zusätzlich wurde bei einem ausgewählten Klon (K3 V2) die Richtigkeit der Sequenz und eine eGFP-Protein typische grüne Fluoreszenz mikroskopisch nachgewiesen.

5. Diskussion

5.1. Klonierung

Ziel dieser Arbeit war es, einen rekombinanten *Pichia pastoris* Stamm zu generieren, der intrazellulär eGFP exprimiert.

Der gewünschte Expressionsvektor pBSY2Z_eGFP konnte nach der vorgesehenen Strategie erfolgreich kloniert werden. Die dazu notwendige Isolierung des Zielvektors (pBSY2Z) und Amplifikation des *gene of interest* (*eGFP*) verlief problemlos. Die Klonierung des Vektor pBSY2Z_eGFP mittels *Golden Gate Assembly* hat grundlegend wie in der Literatur beschrieben funktioniert [25]. Die anschließende Transformation und Selektion von *E. coli* Zellen brachte zwar eine geringe Anzahl an Klonen (9 Einzelkolonien) hervor, von denen aber ca. 90% den gewünschten Expressionsvektor enthielten. Ein Klon enthielt stattdessen den Zielvektor pBSY2Z.

Eine mögliche Ursache für die geringe Anzahl bzw. den falsch positiven Klon kann in der Ineffizienz der Golden Gate Reaktion liegen. Im verwendeten Golden Gate Ansatz wurde ein Gemisch aus Produkt (pBSY2Z_eGFP) und dem Zielvektor nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass nur ein Teil des vorliegenden Vektor pBSY2Z durch das Restriktionsenzym geschnitten worden ist. Somit konnte nur ein bestimmter Anteil der Edukte (pBSY2Z, *eGFP*) während der Ligation erfolgreich umgesetzt werden. Ursache hierfür kann eine zu kurze Reaktionszeit sein. In Folge dessen wurde das Gleichgewicht der Reaktion nicht auf die Produktseite verlagert. Eine mit anderen Ausgangsmaterialien erhobene Kinetik der Golden Gate Klonierung unterstützt diese Vermutung (persönliche Mitteilung M. Röpcke). Um die Effizienz (Anzahl an Klonen) und die Genauigkeit (Einbau der korrekten Genkassette) zu steigern, bietet es sich an ein zyklisches Temperaturprogramm zu verwenden. Zusätzlich wirken sich auch die Zyklenanzahl und die Inaktivierungszeit der Ligase auf die Qualität der durchgeführten Golden Gate Reaktion aus [25, 26, 37, 38]. Daher sollten die angesprochenen Punkte im Rahmen weiterer Experimente (Kinetik der Reaktion) überprüft werden und ggf. entsprechend umgesetzt werden. Der Golden Gate Ansatz ist trotz dem nachgewiesenen Gemisch aus pBSY2Z und pBSY2Z_eGFP für die weiteren Arbeiten verwendet worden, weil eine Ligation nachweislich stattfand.

Darüber hinaus gibt es bei dem verwendeten Elektroporationsverfahren eine Reihe von Faktoren, die Einfluss auf die Transformationseffizienz und -häufigkeit nehmen [34, 35].

Dazu zählen u. a. die verwendete Feldstärke, das Zellalter und -dichte sowie die eingesetzte Plasmidmenge. Dies hat zur Folge, dass die genannten Parameter für den jeweiligen eingesetzten Bakterienstamm empirisch ermittelt werden müssen, um eine Elektroporation unter optimalen Bedingungen sicherzustellen. Daher sollte für zukünftige Transformationen die Konzentration der eingesetzten DNA bzw. Zellen bestimmt werden, da dies die Häufigkeit bzw. Effizienz erheblich beeinflussen kann [34]. Zudem gilt es zu bedenken, dass auch immer ein Teil der Zellen während des Vorgangs beschädigt werden und absterben können [34]. Des Weiteren nimmt nur ein geringer Prozentsatz der Zellen den gewünschten Vektor auf [39]. Beides mindert somit die Effizienz des Verfahrens. Insofern bietet es sich an, das bisher verwendete Transformationsprotokoll durch weitere Versuche bestmöglich anzupassen.

Mit den erwähnten Maßnahmen hinsichtlich der Optimierung der Golden Gate Klonierung und der Elektroporation, könnte die Anzahl an positiven Klonen erhöht und gleichzeitig der Anteil an falsch-positiv transformierten Zellen gering gehalten werden.

Das nach Vervielfältigung und Isolierung (Midiprep) aus *E. coli* vorliegende *high-copy number*-Plasmids wurde darauf folgend teilweise sequenziert. Die Richtigkeit der eingebauten *eGFP*-Genkassette ist bestätigt. Ein unvollständiger alkalischer Zellaufschluss durch ein nicht optimales Zellzahl Puffer Verhältnis kann eine mögliche Ursache sein, warum nur einer der beiden Midiprep-Ansätze den gewünschten Expressionsvektor in ausreichender Menge lieferte.

5.2. *Pichia pastoris* als Expressionssystem

Für die Transformation der *Pichia*-Zellen war eine Linearisierung des Expressionsvektors erforderlich. Diese wurde als vollständig angesehen, obwohl die zu erwartende Bandengröße aufgrund eines *upshifts* nicht bestätigt worden ist. Zum einen liefert der Verdau mit *PmeI* keine Hinweise auf unverdaute *supercoiled*- oder *nicked circle*-DNA. Zum anderen zeigt ein zusätzlicher Verdau-Ansatz mit zwei Restriktionsenzymen (*PmeI* & *BsaI*) ein charakteristisches Bandenmuster. Die Bestätigung der eingebauten Genkassette (*eGFP*) und der bestehenden Funktionalität der auf dem *Backbone* vorliegenden Gensequenzen (ORI, Zeocin-Resistenz) sprechen zusätzlich dafür, dass es sich um den gewünschten Expressionsvektor pBSY2Z_eGFP handelt. Als eine mögliche Ursache für den vorhandenen *upshift* beider Verdau-Ansätze, kann die Umstellung des DNA-Färbemittels von SYBR-Safe zu GelGreen (Biotium) sein, da bei elektrophoretischen Auftrennungen von restriktionsverdauter DNA im Labor ein *upshift* zu beobachten war. Herstellerinformationen bestätigen diese Problematik. Laut Biotium ist es möglich, dass es bei restriktionsverdauter DNA in Kombination mit GelGreen vorgefärbten Agarosegelen zu einem veränderten Migrationsverhalten kommen kann. Empfohlen wird daher, nach dem *post-staining*-Protokoll

vorzugehen. Zusätzlich kann die DNA-Migration durch ein nicht optimales Farbstoff-DNA Verhältnis beeinflusst werden. Entsprechend wäre hier die Möglichkeit die DNA- bzw. Farbstoff-Menge anzupassen (*precast*). Die genannten Optionen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr umgesetzt werden. Zudem waren nach der Transformation und Selektion der *Pichia* Zellen eine Vielzahl an Einzelkolonien (>200) vorhanden. Das spricht dafür, dass der Expressionsvektor linear vorgelegen hat, da solche von *Pichia* bevorzugt ins Genom homolog rekombiniert werden [1]. Bei insgesamt neun ausgewählten Klonen konnte im Anschluss diese Rekombination innerhalb des *pAOX1*-Genlocus bestätigt werden. Die Richtigkeit der Übergänge zwischen genomischer und Vektor-DNA wurden zusätzlich bei einem ausgewählten Klon (K3 V2) nach DNA-Sequenzierung bestätigt. Die in der Literatur beschriebene Möglichkeit, den Ort der Rekombination im Genom mittels entsprechend gewählter Linearisierung-Schnittstelle (*PmeI*) zu bestimmen, bestätigt sich damit ebenfalls[1].

Im Zusammenhang mit der Transformation ist zudem ersichtlich geworden, dass die verwendeten Zellen beider Varianten (Vorkultur mit und ohne Glucose) für eine Elektroporation geeignet waren, auch wenn es in der Koloniezahl leichte Unterschiede gab. Jedoch haben sich beide Herstellungsvarianten für elektrokompente *Pichia*-Zellen bewährt. Wie auch bei prokaryotischen Zellen spielen die eingesetzten Parameter ebenso bei der Elektroporation von Hefezellen für den Transformations-Erfolg eine Rolle (Häufigkeit und Effizienz). Somit bieten sich auch hier weitere Experimente zur Ermittlung von validen Daten an. In der Literatur sind zudem alternative Transformations-Protokolle beschrieben, um eine möglichst hohe Zahl an kompetenten Zellen zu erhalten und so die Transformationseffizienz zu steigern [1, 40-43].

Nach der molekularbiologischen Charakterisierung erfolgte die funktionale Analyse der eGFP Expression. Dabei hat sich die durchgeführte *small-scale* Kultivierung für ein erstes funktionales Screening gut geeignet. So wurde bereits 48 Stunden nach der ersten Induzierung mit Methanol eine eGFP-typische grüne Fluoreszenz bei neun ausgewählten Klonen nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebenen strengen regulatorischen Mechanismen des *pAOX1* Promotors haben sich bestätigt. Die Transkription des *eGFP*-Gens erfolgt erst durch die vollständige Abwesenheit des Repressors (Glucose) und dem gleichzeitigen vorhanden sein von Methanol als C-Quelle. In dem Fall wirkt Methanol als Induktor und es kommt zu einer Transkription des Zielgens, das unter der Kontrolle des AOX1-Promotors steht [8, 9, 13]. Für die Produktion einer möglichst großen Menge an Zielprotein ist jedoch die Etablierung von geeigneten Fermentationsbedingungen in einem (*fed-batch*)-Fermenter erforderlich.

Das rekombinante eGFP-Protein ist mittels SDS-Page bei neun untersuchten Klonen intrazellulär nachgewiesen. Das verwendete Zellaufschlussverfahren mit den dazugehörigen Ultraschallparametern hat sich damit als ausreichend bewährt. Jedoch bietet sich die

Aufnahme einer Aufschlusskinetik, der verwendeten oder alternative Aufschlussmethoden (Kombination aus Aufschlusspuffer und Glasperlen) an [1]. In dem Zusammenhang konnte die *E. coli* SDS-PAGE Probenvorbereitung erfolgreich auf *Pichia* Zellen übertragen werden, sofern ein Ultraschallzellaufschluss erfolgt. In wieweit sich dies auf alternative Zellaufschlussverfahren übertragen lässt, muss in weiterführenden Experimenten (u. a. quantitative Proteinbestimmung) überprüft werden.

Ob trotz fehlender Signalsequenz im Expressionsvektor, eGFP während der *small-scale*-Kultivierung ins Medium abgegeben wurde, ist nicht näher untersucht worden. Dies sollte im Rahmen zukünftiger Kultivierungen durch entsprechende Verfahren (z. B. BCA-Assay) näher beleuchtet werden. Zusätzlich wurde bei einem ausgewähltem Klon das intrazellulär vorliegende eGFP Fluoreszenz-mikroskopisch nachgewiesen.

Die Ergebnisse des WT (keine Fluoreszenz, keine Bande bei den elektrophoretischen Kontrollen) entsprachen der Erwartung. Der falsch positive *Pichia* Klon wurde hinsichtlich seiner Zeocin-Resistenz trotz fehlenden Nachweis auf homologe Rekombination im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Ursache hierfür kann möglicherweise in einer Spontan-Resistenz liegen.

5.3. Fazit und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit, einen eGFP-produzierenden *Pichia pastoris* Stamm zu konstruieren, wurde folglich erreicht. Im ersten Schritt wurde der notwendige Expressionsvektor kloniert und die Hefe-spezifische homologe Rekombination erfolgte, wie geplant innerhalb der genomischen *pAOX1* Gensequenz. In einer *small-scale* Kultivierung konnte die intrazelluläre Expression des Zielproteins, nach Methanol-Induktion erfolgreich nachgewiesen werden. Der vorliegende Expressionsstamm kann nun dazu genutzt werden, die eGFP-Expression in einem größeren Maßstab (Schüttelkolben, Fermenter) zu etablieren.

Bei der Produktion eines rekombinanten Proteins stellt sich die Frage einer intrazellulären Expression oder einer extrazellulären Sekretion. Diese Wahl wird in der Regel von dem zu exprimierenden Protein abhängen. Gleichwohl bieten beide Möglichkeiten (intrazellulär oder Sekretion) an und für sich Vor- und Nachteile. Die extrazelluläre Expression hat den Vorteil einer weniger aufwendigen Aufreinigung des Zielproteins, u. a. durch die geringe Anzahl an sezernierten eigenen Proteinen [44]. Jedoch sind ggf. höhere Ausbeuten mit einem intrazellulär lokalisierten Protein möglich. Ein Vergleich zwischen den nun vorliegenden *Pichia pastoris* Expressionssystem und dem zweiten sekretorischen *Pichia*-Stamm (Brandt und Pankewytsch, 2019) bietet sich daher an.

In den letzten Jahrzehnten wurde durch unterschiedliche Ansätze versucht die Expressionsrate (Ausbeute) von rekombinanten Proteinen zu erhöhen [12]. Eine Möglichkeit stellt die mehrfache Insertion des Expressionsvektors im *Pichia*-Genom dar (Erhöhung der Gen-

kopiezahl)[12, 22, 45, 46]. Der Gedanke dabei ist, dass durch eine mehrfach im Genom eingebaute Genkassette auch entsprechend mehr Ziel-Protein von dem Hefestamm produziert wird. So können Klone, die mehrere Plasmide in ihrem Genom tragen, durch zunehmende Zeocin-Konzentrationen angereichert und selektiert werden. Neben der Verwendung von Zeocin als Selektionsdruck, wird auch eine Verwendung von Geneticin-418 empfohlen [1]. Eine Charakterisierung dieser Klone kann beispielsweise mittels quantitativer *real-time* PCR erfolgen [47, 48].

Literatur

- [1] Christoph Reinhart und Christoph Krettler. „Das Pichia pastoris-Expressionssystem“. In: *Gentechnische Methoden*. Spektrum Akademischer Verlag, 2012, S. 431–453. DOI: 10.1007/978-3-8274-2430-3_15.
- [2] Cletus Paul Kurtzman. „Biotechnological strains of Komagataella (Pichia) pastoris are Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis“. In: *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 36.11 (2009), S. 1435–1438. DOI: 10.1007/s10295-009-0638-4.
- [3] A M Gonçalves, A Q Pedro, C Maia, F Sousa, J A Queiroz und L A Passarinha. „Pichia pastoris: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins.“ In: *Journal of microbiology and biotechnology* 23 (5 Mai 2013), S. 587–601. ISSN: 1738-8872.
- [4] James M. Cregg und Kimberly A. Russell. „Transformation“. In: *Pichia Protocols*. Humana Press, 1998, S. 27–40. DOI: 10.1385/0-89603-421-6:27.
- [5] Gellissen. *Production of Recombinant Proteins*. Hrsg. von Gerd Gellissen. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Nov. 2004. DOI: 10.1002/3527603670.
- [6] Richard A. J. Darby, Stephanie P. Cartwright, Marvin V. Dilworth und Roslyn M. Bill. „Which Yeast Species Shall I Choose? Saccharomyces cerevisiae Versus Pichia pastoris (Review)“. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2012, S. 11–23. DOI: 10.1007/978-1-61779-770-5_2.
- [7] Roger K. Bretthauer und Francis J. Castellino. „Glycosylation of Pichia pastoris-derived proteins“. In: *Biotechnology and Applied Biochemistry* 30.3 (1999), S. 193–200. DOI: doi:10.1111/j.1470-8744.1999.tb00770.x. URL: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1470-8744.1999.tb00770.x>.
- [8] Franz S. Hartner und Anton Glieder. „Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts“. In: *Microbial Cell Factories* 5.1 (Dez. 2006), S. 39. ISSN: 1475-2859. DOI: 10.1186/1475-2859-5-39. URL: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-39>.

- [9] Joan Lin Cereghino und James M. Cregg. „Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*“. In: *FEMS Microbiology Reviews* 24.1 (2000), S. 45–66. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x. eprint: /oup/backfile/content_public/journal/femsre/24/1/10.1111_j.1574-6976.2000.tb00532.x/1/24-1-45.pdf. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00532.x>.
- [10] Brigitte Gasser, Matthias G. Steiger und Diethard Mattanovich. „Methanol regulated yeast promoters: production vehicles and toolbox for synthetic biology“. In: *Microbial Cell Factories* 14.1 (Dez. 2015), S. 196. ISSN: 1475-2859. DOI: 10.1186/s12934-015-0387-1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0387-1>.
- [11] J M Cregg, K J Barringer, A Y Hessler und K R Madden. „*Pichia pastoris* as a host system for transformations.“ In: *Molecular and Cellular Biology* 5.12 (1985), S. 3376–3385. ISSN: 0270-7306. DOI: 10.1128/MCB.5.12.3376. eprint: <https://mcb.asm.org/content/5/12/3376.full.pdf>. URL: <https://mcb.asm.org/content/5/12/3376>.
- [12] Ding Li, Bo Zhang, Shuting Li, Jie Zhou, Hui Cao, Yan Huang und Zhongli Cui. „A Novel Vector for Construction of Markerless Multicopy Overexpression Transformants in *Pichia pastoris*“. In: *Frontiers in Microbiology* 8 (2017), S. 1698. ISSN: 1664-302X. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01698. URL: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.01698>.
- [13] J M Cregg, K R Madden, K J Barringer, G P Thill und C A Stillman. „Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*.“ In: *Molecular and Cellular Biology* 9.3 (März 1989), S. 1316–1323. DOI: 10.1128/mcb.9.3.1316.
- [14] Ida J. van der Klei, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai und Marten Veenhuis. „The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763.12 (2006). Peroxisomes: Morphology, Function, Biogenesis and Disorders, S. 1453–1462. ISSN: 0167-4889. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.016>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488906001923>.
- [15] Franz S. Hartner und Anton Glieder. *Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts*. URL: https://www.researchgate.net/figure/Methanol-utilisation-pathway-in-methylotrophic-yeasts-The-main-pathways-and-the_fig1_6631159. Dez. 2006. URL: https://www.researchgate.net/figure/Methanol-utilisation-pathway-in-methylotrophic-yeasts-The-main-pathways-and-the_fig1_6631159.

- [16] Osamu Shimomura, Frank H. Johnson und Yo Saiga. „Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, *Aequorea*“. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59.3 (1962), S. 223–239. DOI: 10.1002/jcp.1030590302.
- [17] M Chalfie, Y Tu, G Euskirchen, W. Ward und D. Prasher. „Green fluorescent protein as a marker for gene expression“. In: *Science* 263.5148 (1994), S. 802–805. DOI: 10.1126/science.8303295.
- [18] Martin Chalfie. „GREEN FLUORESCENT PROTEIN“. In: *Photochemistry and Photobiology* 62.4 (1995), S. 651–656. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x.
- [19] Roger Y. Tsien. „THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN“. In: *Annual Review of Biochemistry* 67.1 (1998), S. 509–544. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- [20] G.H. Patterson, S.M. Knobel, W.D. Sharif, S.R. Kain und D.W. Piston. „Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy“. In: *Biophysical Journal* 73.5 (1997), S. 2782–2790. DOI: 10.1016/s0006-3495(97)78307-3.
- [21] Brendan P. Cormack, Raphael H. Valdivia und Stanley Falkow. „FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP)“. In: *Gene* 173.1 (1996), S. 33–38. DOI: 10.1016/0378-1119(95)00685-0.
- [22] James M. Cregg, Ilya Tolstorukov, Anasua Kusari, Jay Sunga, Knut Madden und Thomas Chappell. „Chapter 13 Expression in the Yeast *Pichia pastoris*“. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, 2009, S. 169–189. DOI: 10.1016/s0076-6879(09)63013-5.
- [23] RK Saiki, DH Gelfand, S Stoffel, SJ Scharf, R Higuchi, GT Horn, KB Mullis und HA Erlich. „Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase“. In: *Science* 239.4839 (1988), S. 487–491. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.239.4839.487. eprint: <http://science.sciencemag.org/content/239/4839/487.full.pdf>. URL: <http://science.sciencemag.org/content/239/4839/487>.
- [24] Thermo Fisher Scientific Inc. *Thermo Scientific molecular biology workflow solutions - High-quality essentials for everyday applications*. Englisch. Thermo Fisher Scientific Inc. 2016. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/brochures/thermo-scientific-molecular-biology-workflow-solutions-brochure.pdf>.
- [25] Carola Engler, Romy Kandzia und Sylvestre Marillonnet. „A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability“. In: *PLoS ONE* 3.11 (Nov. 2008). Hrsg. von Hany A. El-Shemy, e3647. DOI: 10.1371/journal.pone.0003647.

- [26] Carola Engler und Sylvestre Marillonnet. „Golden Gate Cloning“. In: *DNA Cloning and Assembly Methods*. Humana Press, Dez. 2013, S. 119–131. DOI: 10.1007/978-1-62703-764-8_9.
- [27] QIAGEN. *QIAGEN Plasmid Purification Handbook*. Englisch. QIAGEN. Apr. 2012. URL: <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=46205595-0440-459e-9d93-50eb02e5707e&lang=en>.
- [28] Laurie Vingataramin und Eric H. Frost. „A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast“. In: *BioTechniques* 58.3 (2015). DOI: 10.2144/000114263.
- [29] Serva Electrophoresis. *GEBRAUCHSANLEITUNG SERVAGel™ TG PRiME™ Pre-cast Vertical Gels for Electrophoresis (Kat.-Nr. 43260, 43261, 43263, 43264, 43266, 43267, 43269, 43270, 43284, 43285, 43286, 43287)*. deutsch. Version 10/15. SERVA Electrophoresis. URL: https://www.serva.de/www_root/documents/SERVA%20TG%20PRiME%20Ver%201015_d_1.pdf.
- [30] Xiaoqi Huang und Webb Miller. „A time-efficient, linear-space local similarity algorithm“. In: *Advances in Applied Mathematics* 12.3 (Sep. 1991), S. 337–357. DOI: 10.1016/0196-8858(91)90017-d.
- [31] Weizhong Li, Andrew Cowley, Mahmut Uludag, Tamer Gur, Hamish McWilliam, Silvano Squizzato, Young Mi Park, Nicola Buso und Rodrigo Lopez. „The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework“. In: *Nucleic Acids Research* 43.W1 (Apr. 2015), W580–W584. DOI: 10.1093/nar/gkv279.
- [32] Hamish McWilliam, Weizhong Li, Mahmut Uludag, Silvano Squizzato, Young Mi Park, Nicola Buso, Andrew Peter Cowley und Rodrigo Lopez. „Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI“. In: *Nucleic Acids Research* 41.W1 (Mai 2013), W597–W600. DOI: 10.1093/nar/gkt376.
- [33] Sergei I. Sukharev, Alexander V. Titomirov und Vadim A. Klenchin. „Electrically-Induced DNA Transfer into Cells. Electrotransfection in Vivo“. In: *Gene Therapeutics: Methods and Applications of Direct Gene Transfer*. Hrsg. von Jon A. Wolff. Boston, MA: Birkhäuser Boston, 1994, S. 210–232. ISBN: 978-1-4684-6822-9. DOI: 10.1007/978-1-4684-6822-9_12. URL: https://doi.org/10.1007/978-1-4684-6822-9_12.
- [34] Eppendorf AG. *Eppendorf Eporator Operating manual*. Englisch. Eppendorf AG. 2016. URL: https://online-shop.eppendorf.com/OC-en/eshopdownload/downloadbykey/141563_Operating-Manual_186.
- [35] W. J. Dower, J. F. Miller und C. W. Ragsdale. „High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation“. In: *Nucleic Acids Research* 16.13 (Juli 1988), S. 6127–6145. DOI: 10.1093/nar/16.13.6127.

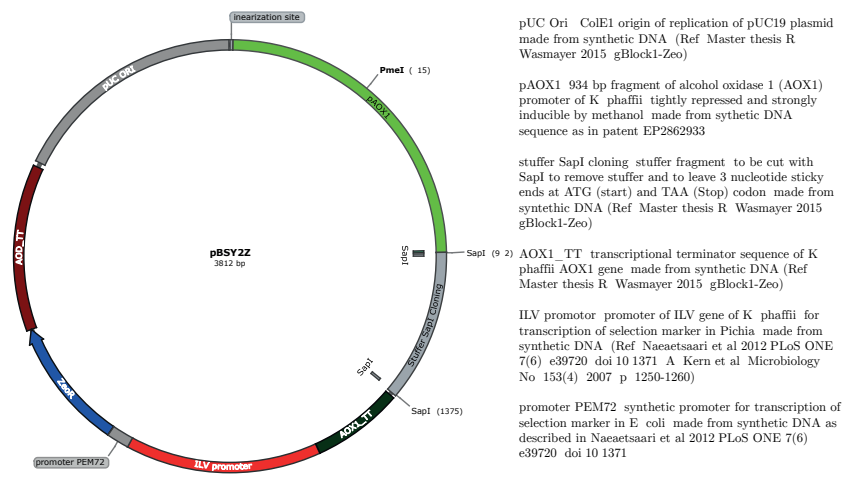
- [36] Cornelissen G. *Aufarbeitungs- und Reinigungsverfahren*. Unveröffentlichtes Skript, Fakultät Life Sciences Department Biotechnologie, HAW Hamburg. Feb. 2013.
- [37] Rebecca Kucera und Eric Cantor. *Breaking through the Limitations of Golden Gate Assembly The Co-Evolution of Test Systems, Engineered Enzymes and Understanding Ligase Fidelity and Understanding Ligase Fidelity*The Co-Evolution of Test Systems, Engineered Enzymes. Englisch. Hrsg. von Inc New England Biolabs. New England Biolabs, Inc, 2018. URL: https://international.neb.com/-/media/nebus/campaign/golden-gate/breakingthroughlimitsgoldengate_tn.pdf?la=en&rev=c06646e807474e269d8deabff9331c1d&hash=30E390DC9BCEE0465425D757274BEFF402EB6C5C.
- [38] Carola Engler, Ramona Gruetzner, Romy Kandzia und Sylvestre Marillonnet. „Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type IIs Restriction Enzymes“. In: *PLoS ONE* 4.5 (2009). Hrsg. von Jean Peccoud, e5553. DOI: 10.1371/journal.pone.0005553.
- [39] Tania A. Baker, Stephen P. Bell, Alexander Gann, Michael Levine und Richard Losick. *Watson Molekularbiologie*. Pearson Studium, 1. Nov. 2010. ISBN: 3868940294. URL: https://www.ebook.de/de/product/9714756/tania_a_baker_stephen_p_bell_alexander_gann_michael_levine_richard_losick_watson_molekularbiologie.html.
- [40] James M. Cregg. „DNA-Mediated Transformation“. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2007, S. 27–42. DOI: 10.1007/978-1-59745-456-8_3.
- [41] Joan Lin-Cereghino, William W. Wong, See Xiong, William Giang, Linda T. Luong, Jane Vu, Sabrina D. Johnson und Geoff P. Lin-Cereghino. „Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*“. In: *BioTechniques* 38.1 (Jan. 2005), S. 44–48. DOI: 10.2144/05381bm04.
- [42] Shixuan Wu und Geoffrey J. Letchworth. „High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol“. In: *BioTechniques* 36.1 (Jan. 2004), S. 152–154. DOI: 10.2144/04361dd02.
- [43] Shigeyuki Kawai, Wataru Hashimoto und Kousaku Murata. „Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi“. In: *Bioengineered Bugs* 1.6 (Nov. 2010), S. 395–403. DOI: 10.4161/bbug.1.6.13257.
- [44] James M. Cregg. „Introduction“. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, 2007, S. 1–10. DOI: 10.1007/978-1-59745-456-8_1.
- [45] Russell A. Brierley. „Secretion of Recombinant Human Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I)“. In: *Pichia Protocols*. Humana Press, S. 149–178. DOI: 10.1385/0-89603-421-6:149.

- [46] Carol A. Scorer, Jeffrey J. Clare, Willam R. McCombie, Michael A. Romanos und Koti Sreekrishna. „Rapid Selection Using G418 of High Copy Number Transformants of *Pichia pastoris* for High level Foreign Gene Expression“. In: *Nature Biotechnology* 12.2 (Feb. 1994), S. 181–184. DOI: [10.1038/nbt0294-181](https://doi.org/10.1038/nbt0294-181).
- [47] Ping Yu, Yuan Yan, Qing Gu und Xiangyang Wang. „Codon optimisation improves the expression of *Trichoderma viride* sp. endochitinase in *Pichia pastoris*“. In: *Scientific Reports* 3.1 (Okt. 2013). DOI: [10.1038/srep03043](https://doi.org/10.1038/srep03043).
- [48] Shi-Hwei Liu, Wei-I Chou, Chia-Chin Sheu und Margaret Dah-Tsyr Chang. „Improved secretory production of glucoamylase in *Pichia pastoris* by combination of genetic manipulations“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326.4 (Jan. 2005), S. 817–824. DOI: [10.1016/j.bbrc.2004.11.112](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.112).

A. Anhang

A.1. Plasmide

A.1.1. pBSY2Z Plasmidkarte und Sequenz



Sequenz pBSY2Z

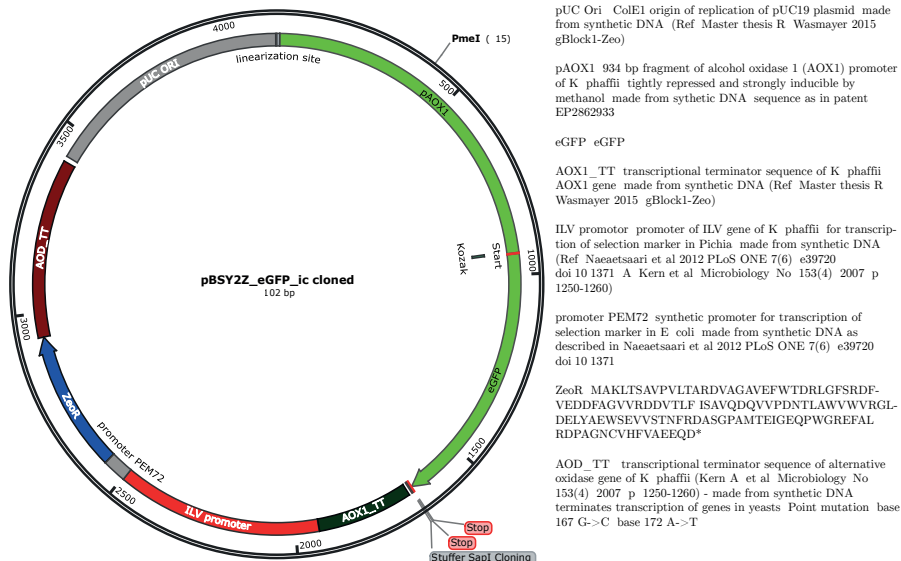
```

5'-atttaaatcaactccaaaagcagaaggttgaatgaaaccttttgccatccgacatcccaaggtccattctcacacataagtgccaaacgca
acaggagggatacactagcagcagaccgttgcaaacgcaggacctccactcctctcctccacaccccaactttggccatcgaaaaaccagccc
agttattgggcttgatggagctcgctcattccaaattcctctattaggtactaacaccatgactttatagcctgtctatcctggccccctcg
cgaggttctatgtttgtttatttccgaatgcaacaagctccgcattacaccggaacatcaactccagatgagggcttctcagtggtgggtcaaa
agtttcatgttcccccaatggccccaaactgacagtttaaacgctgtcttggaaacctaatgacaaaagcgtgactcaccagaatgaaactaa
gtttggttcgttgaatgctaaacggccagttggtcaaaaaagaactccaaaagtcggcacaactcctgtctgttgggttggatgtagcaatg
ctcaaaaataactcattaatgcttagcgcagctctctctatcgctctgaaacccggcgaacctgtgcccgaacgcaaatggggaacaccgccct
tttggatgattatgcatgtctccacattgtatgcttccaagattctggtgggaactactgctgtagctcaactctcatgataaaatttcaat
gttcaaccctacttgacagcaatataaaacagaaggaagctgcccctgtcttaaacctttttttatcatattatagcttaacttctaa
ttgogactggttccaattgacaagcttttgaatttaacgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaaaacactaattatcgaaaacgatgag
aagagcgaattcggcgcgcggtgaagatccaaatcgatgaattgaccaagcactacggtatgaaagccagaagactacactgctgtagatgggt
atgaatgctgcacaagtacatcactcgaagataagattgtagctggtattggatcgaaatgtagcaacaagtcgaattggaagatgactttggccaa
ccaagcagcagcagctctctgatgctaaaaatgttgaagaatgcaagaattggcttctgggttctgttctgtacccttcttaacatctgca
acgatgaatttttgaagaaaaccctgaaaagctcagaaggtcttgaagaccatcaagaagcacaaccgactacgttctagccgaccctgtgaag
gcttggaaaagaatcacatcgacttcaagcctcaattgaaacagctctctcaaaagcggcctcaagagagatgcaagaatgccatttgcctgagagat
gcaggctctcatttttgatacttttttatttgaacctatagatagggatttttttgcatttttggttctctcgtacagacttgcctcctgat
cagcctatctcgcagcagatgaattcttgggtagggtttgggaaaatcattcgagtttggattttcttggatttcccaactcctctcga
agtagacaagaatgaatgagacactcgtttgtgagcctctcagtaaatgctgttcttcttggtagctggtgagccatttggactcctgtgaa
agtttctttagaaatggttctccagagggccaaacatccaccgtagtaagtcgaagcgttaggaagaccaagactggcattaaatcaggtataa
gtgctgacacactggcaggtgactctctgaaaagttctactagcagataaagatccagtagctcagatgtagcaacaatgaccgtggtggatctaa
gaacgctcctactaacctcgcattcgttggccagtttggttatcgatcaacgtgacaaggttgcgattccggcgttaagatgcaatcaacca
aggaacgctgttgcattccaagtgagccagttccaacaacttttgaattatagagcaactctgttggctgtgaaagtgaagtgaagtgaagtga
aattaaagagataatctgaaacccgacttcaaacgcaactatgatgtgcccacacaataagcgttcaatccgctgggtgactttctcgtctt
aaaaaattatccgaaaaaatttctagaggttggtaactttacttccggctcgtataatcagcaaggtgaaggagactaaaccatggctta
aactcaactctgctgtccagctcctgactgctcgtgattgtggtgctgttggatctggactgatagactcggttctccogtactcgtgta
gaggacgacttgcggtgttgaactgagcagcgttaccctgttcatctccgagttcaggaccaggtgtgcccagacaacactctggcctgggt
atgggttcgtggtctggacgaactgactcgtgaggtgctgaggtgtgcttccaactccgtgatgcatcgggtccagctatgaccagagatcg
gtgaacagccctgggtcgtgagttgcaactcgtgtagcagctggttaactcgtgcatctcgtcgcagaggaacaggactaaaaatgcaacct
acgattatttagagagatttatttagtttatttattgtagtatacggatgtttattatctatttggcccttataattcgttaactccaagaatc
ctacttatacaggcagcaactctatgctcggcaacgtcaactaaaaataagcttttactcctctctctcttttttccctctcgtgataattata
ccttgcatccacaagattctcctgcaaaatttgcataactccttacaacatggctatattgggagcaacttagccctccaaaacccaatttgctt
cgcattgataaggtgttttcccaaatatttctctgtgctccttttataagagaagctctatcggagaagcttctgtggcccttata
ctggcccttatcgtgggaacacattgacctgaattggtttgcccggaaagattgggaaacttggactgattaccttagctgcagactgagcgtc
agaccctgtagaaaagatcaaaagattctctgagatccttttctcgcgcttaactcgtgcttgcacaaaacccacgctaccagcgtg
gtttgttggccggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactggctcagcagagcagataccaaatcgttctcttagtgtag
cgttagtgaggcccaactccaagaactcgtgacacgcctacatcctcgtctgctaatcctgttaccagtggtgctgcaagtggtgagctaa
gtcgtgcttaccgggttggactcaagacgatagttaccggataagggcagcggctcggcctgaaacgggggttctgacacacagccagctgg
agcgaacacatcaccaagtagatcctacagcgtgagctatgagaagcgcacgctcccgaagggagaagggcagcaggtatccgta
agcggcaaggtcggaaacagagagcgcagcagggagctccaggggaaacgctgctatcttataagctcgtgctgggtttcgcacctctgact
tgagcgtcagtttttggatgctcgtcagggggcggagcctatggaaaaacgcagcaacggccttttaccggtcctggccttttgcgtgc
cttttgcctacatgt-3'

```

Abbildung A.1.: pBSY2Z Plasmidkarte und Sequenz

A.1.3. pBSY2Z_eGFP Plasmidkarte und Sequenz



Sequenz pBSY2Z_eGFP

```

5' atttaataaacaacccaagacgaagggtgaaatgaacaccttttggccatccgacatcccaaggtccatctccacacataaagtcgcaaacgcaacagagggga
tacactagcagcagaccgttgcaaacgcaggacctccactcctctctccacaccccactttggccatcgaaaacagcccagcttatgggcttgattggag
ctcgctcatccaattcctctctataggtactaacaacatgactttatagcctgctctactggccccctggcgaggttcatgtttgttttttccgaatgc
aacaagctccgatatacccccgaacatcactccagatgagggcttctgagtggtgggtcacaatagtttcatgttcccccaatggcccccaaacatgacagttaa
cgctgcttggaactaatatgacaaaacgctgatctcacaagatgaactaagtttgggtcgtgaaatgctaacggccagttggtcaaaaagaactcccaa
aagtcggcataacggtttgttctgtttggtattgattgacgaatgctcaaaaataatcctcatatagcttagcgaagctctctctcgtctgaaccccggtgca
cctgcccgaacgcaaatggggaaaccccggcttttggatgattatgcttctccacatgtatgcttccaagattctcgtgggaatactgctgatagcct
aacgttcgatcaaaaattaaactgttcaaccctactgacagcaatataaaacagaaggaagctgcccctgtctaaacctttttttatcatcattatta
gcttacttcaataatggcactggttccaattgacaagcttttggatttaaacgacttttaacgacaacttgagaagatcaaaaacaactaatattcgaaacgA
TGCTGAGCAAGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCCCTGGTGGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCAAGTTCAGCGTGTCCGGGAGGGCGAGG
CGCTGCCACTACCGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCCAGGGCAAGTGCCTGGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGT
GCTTCAGCCCTACCGGACCCATGAAGCAGCAGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGAGGCGACCACTTCTCAAGGACGACGGCA
ACTCAAGACCCCGCCGAGGTTGAAGTTCGAGGGCGACCCCTGGTGAACCCGATCGAGTGAAGGCGTCAAGTTCAGGAGGACGGCAACATCTCGGGGCA
AGCTGGAGTACAACTACAAACAGCCAAACGCTTATATCATGGCCGACAGCAGAAAGACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGTCCGCCCAACATCGAGGACGGCA
GGTGGCACTCCCGACACTACCAAGCAACACCCCATCCCGGACGGCCCGTCTGCTGCCCAACACCACTACCTGAGCACCACCACTCCCGCTGAGCAAG
ACCCCAAGAGAGCGGATCATAGTGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGATCACTCCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAATAGTaaagcgcgcgtc
aagagatgtcagaatggccattggcctgagagatgagccttcaatttggatcattttttatgtaacctatagatagagattttttgtcattttgtttc
ttctcgtacagagcttgcctcctgacgcctactcgcagcagatgaaatcttgggtgaggggttgggaaatcctcagagtttgatgtttttctgtgtattc
cactcctctcagagtaagaagatgagtagagcctcgtttgtgaggtctcctcagtaagttctgtttttttgttgcagtggtgagccttttgaactcgt
tgaagtttctttagaattggttctccagagcccaaacatccaccctgtagtaagtgcaagcgttaggaagaccagactggcctaaatcaggtataaagtgcg
gcaactggcaggtgatcctctgaaagtctcactagcagataaagatccagtagtcatgcatatggcaacaatgtaccgttggatcctaaagaacgcgtcctactaa
ccttcgcatcgtttgttccagtttgtttatcagatcaacgtgacaaggttgcgattcccggtgaagcagatgcaatacccaagagcctgttgcattccaagtga
gccaatgcaacaactctttagaataatagagcacttcatgttggccttgaagtaaaaatggcaacaatgaaagataaactcgaaacccgcactccaacg
ccaatagatgtggcgccacaataaagcgttcaatccgctgggtgactttctcgtcttaaaaaatataccgaaaaaatttctagagttgtttactttact
tcggctcgtataatacgaacaaggtgtaagagggactaaaccatggctaaacctcaactcgtgttccagtcctgactgctcgtgagttgtgtgtgtgtgag
ttctggactgatagactcgggttttcccgtagctcgttagagagcagcttggccggtgtgactgtagcagcagcttaccctgttcaatcccgactcgaagaccag
gttggccagacaacactctggcattgggtatgggtctgtgctggcagcaactgacgctgagtggtctgaggtcgtgtctaccaactccgctgatcactcgggt
ccagcttagcagagatcgggtgaaacgcccctgggtcgtgagttgcaactcgtgacagcgtgtaactcgtgcaattcgtcagagaaacaggaataaaat
tgacaaccttaagatatttagagatattatagttttatgtattgtagtatacggatgtttttatctatttatgcccctataattcgttaactccaagaatcc
tatcttacaagcagaactctatgctccgcaagctcaactaaaaaagctttttatcctctctctcttttttccctcgtgataaattataacttgcatacca
cagatctcctcgcacaatttgcataaactcttaacaactggctataatgggaagcaacttagcgcctccaaaacccatattgctacgcagatgataagttgtttt
ccacaataattctcgtgctccttttataaagagaagctctatcggagaagctctgtggccgttataatggccttatcgtgggcaacaattgcctgata
attgggttggcccggaagattgggaaacttggatcctgattaccttagctgcaagcagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaagattctctgagatcctt
ttttctcggcgttaactcgtgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgtggtttgtttgcccggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactg
gctcagcagcgcagataccaaaatactgtctcttagttagccgtagttaggccaccactcaagaactctgtagcaccgctacataactcctcgtcgtceta
ctcgttaccagtggtcgtcgcagtgccgataaagctcgtcttaccgggttggactcaagacagatagttaccggataaagcgcagcgtcgggtgaaacgggg
gtctcgtgcaacagcccagcttggagcgaacgacatcacccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaagcaccagcttcccgaaggggaaagcgg
acaggtatccggtaaagcagcaggtcgaacagggagcgcacagggagcttccaggggaaacgcccgtgattcttataagctcgtcgggttccgcccactc
gactgagcgtcgaattttgtgatgctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacggcggctttttacggttcctggcctttgtgctgctctttg
ctcacatgt-3'
    
```

Abbildung A.3.: pBSY2Z_eGFP Plasmidkarte und Sequenz

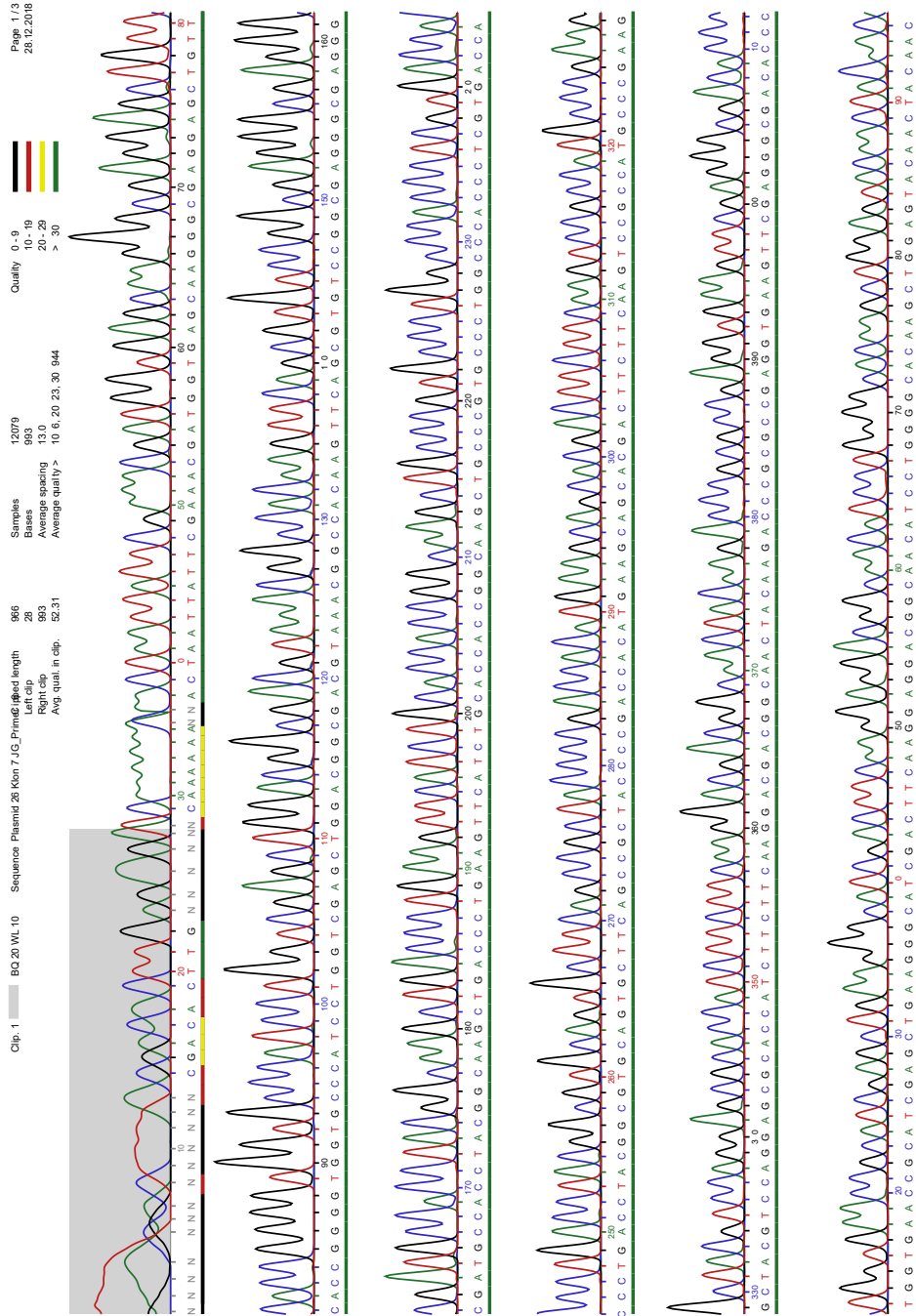
A.2. eGFP-Proteinsequenz

```

VSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGLKTLKFICTTGKLPVWPVTLVTTLTYGVQCF SRY
PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNNSH
NVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLE
FVTAAGITLGMDELYK
    
```

A.3. Sequenzierungsergebnisse eGFP-Gensequenz

A.3.1. Sequenzierungsreport der *eGFP*-Gensequenz (Primer 16)





Quality 0 - 9
10 - 19
20 - 29
> 30

Samples 12070
Bases 993
Average spacing 13.0
Average quality > 10 6, 20 23, 30 944

966
28
963
52.31

Sequence Pyramid 28 Mont 7 JG_Prim@bed length
Left clip
Right clip
Avg. qual. in clip.

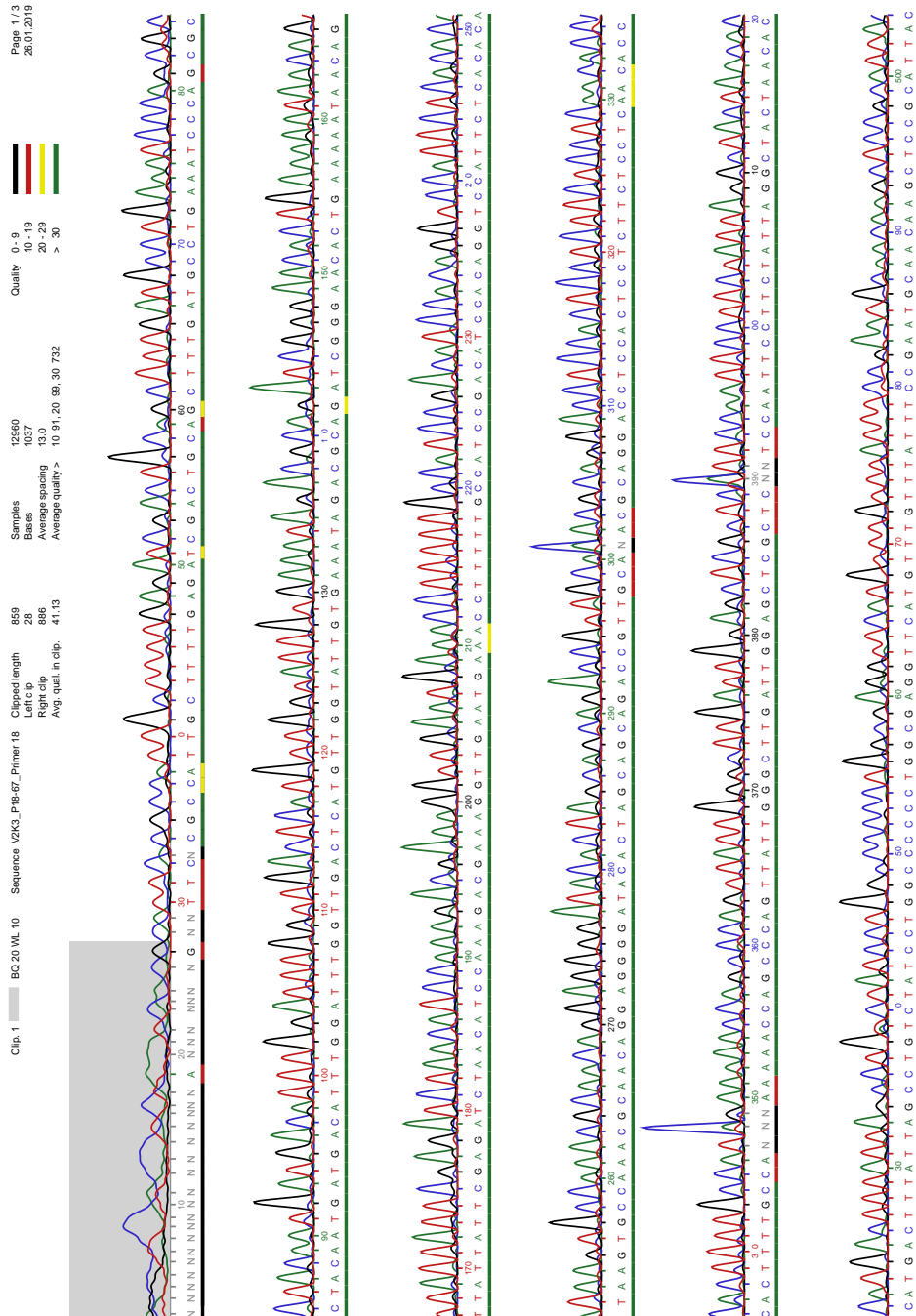
Clip 1

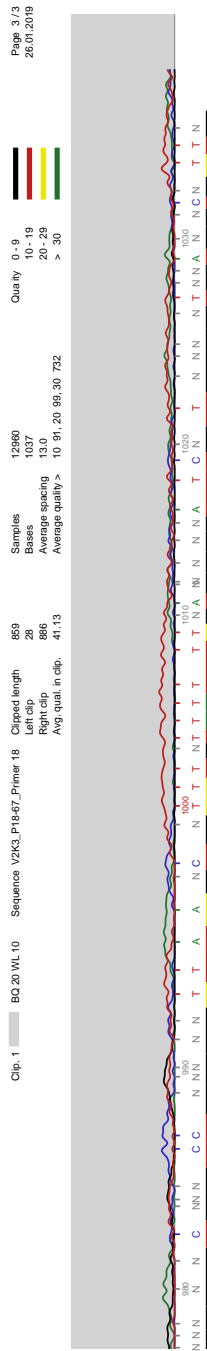
BQ 20 WL 10

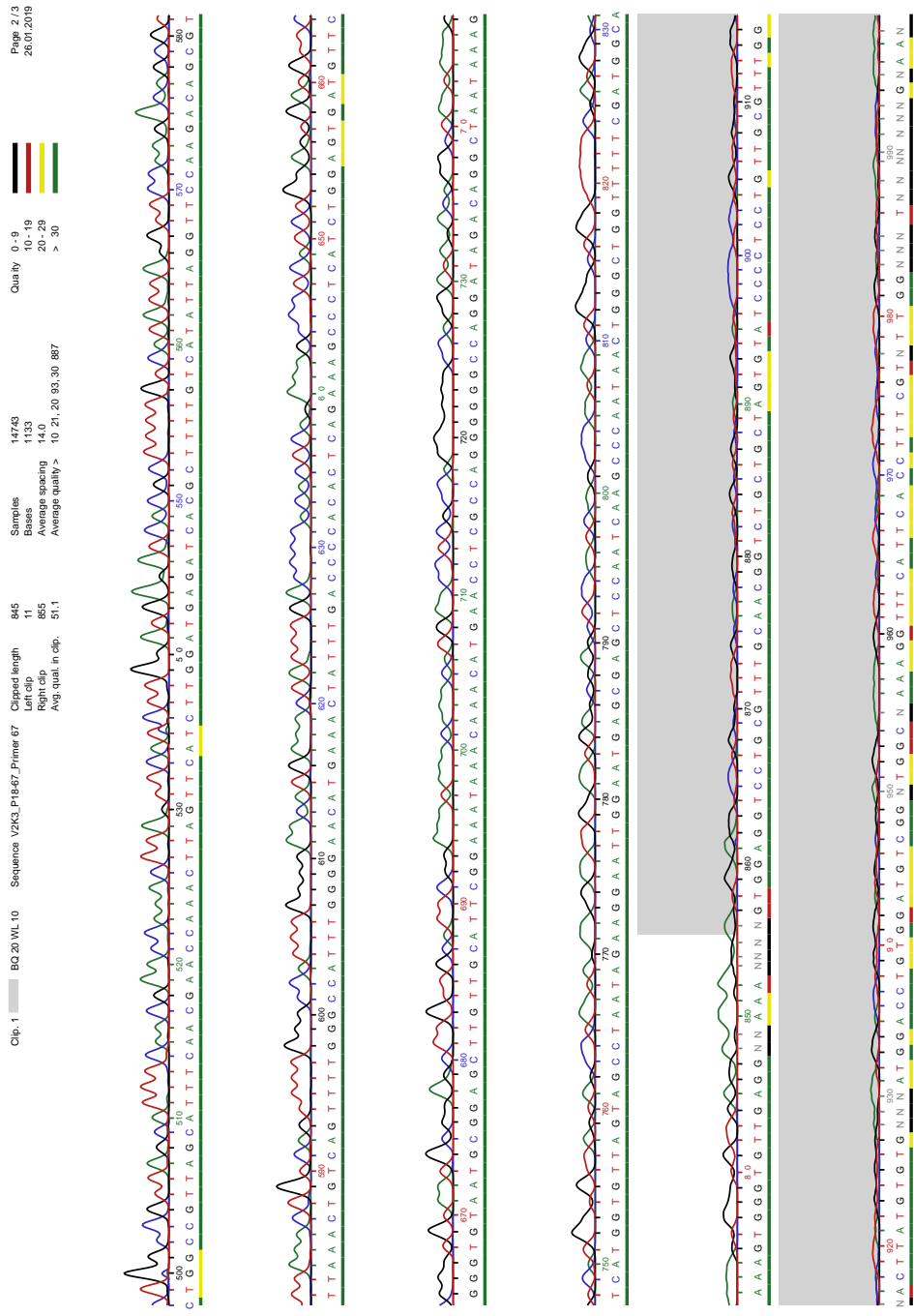


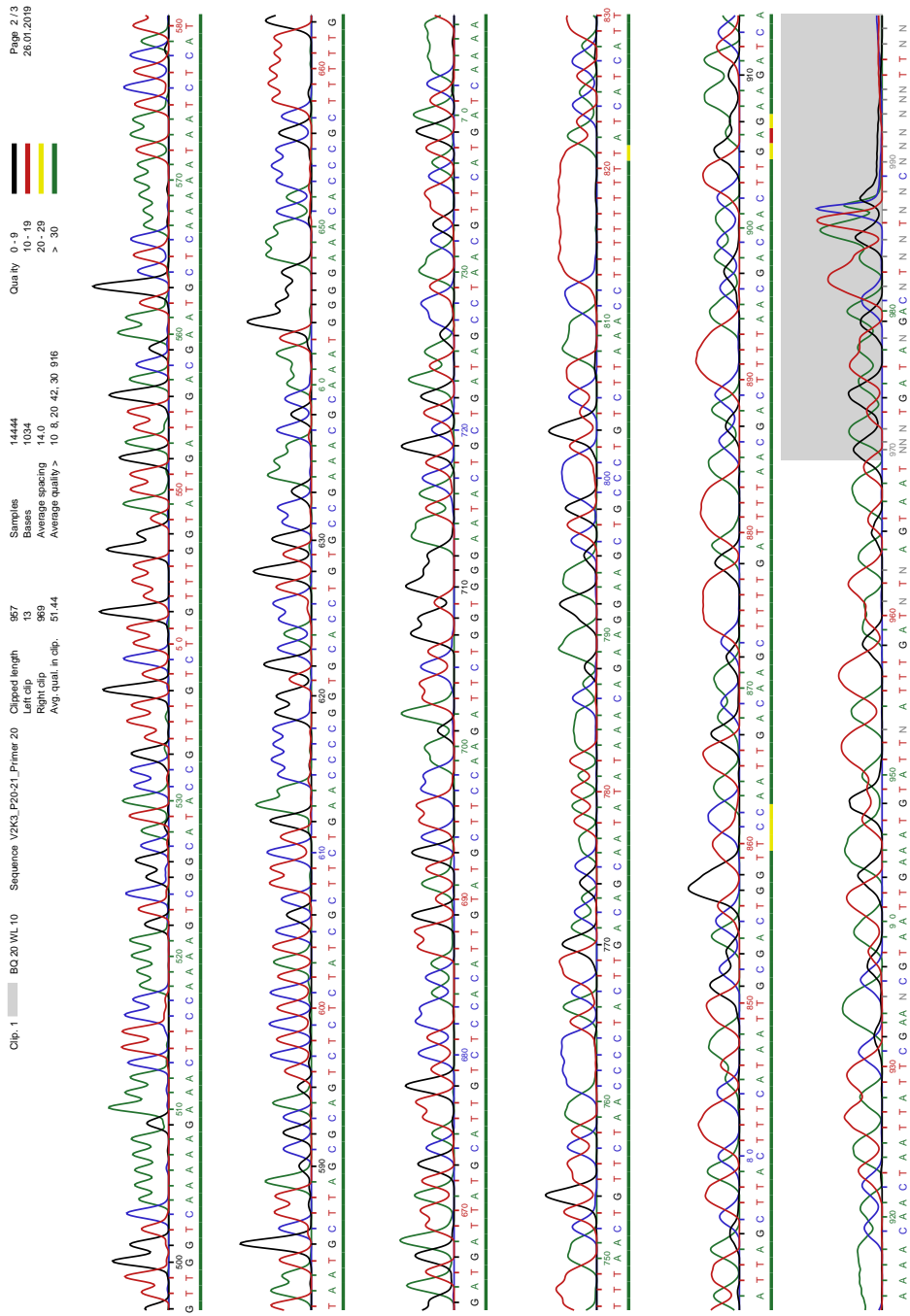
A.4. Sequenzanalyse Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im *pAOX1*-Locus

A.4.1. Sequenzierungsreport, linke Flanke (Primer 18)

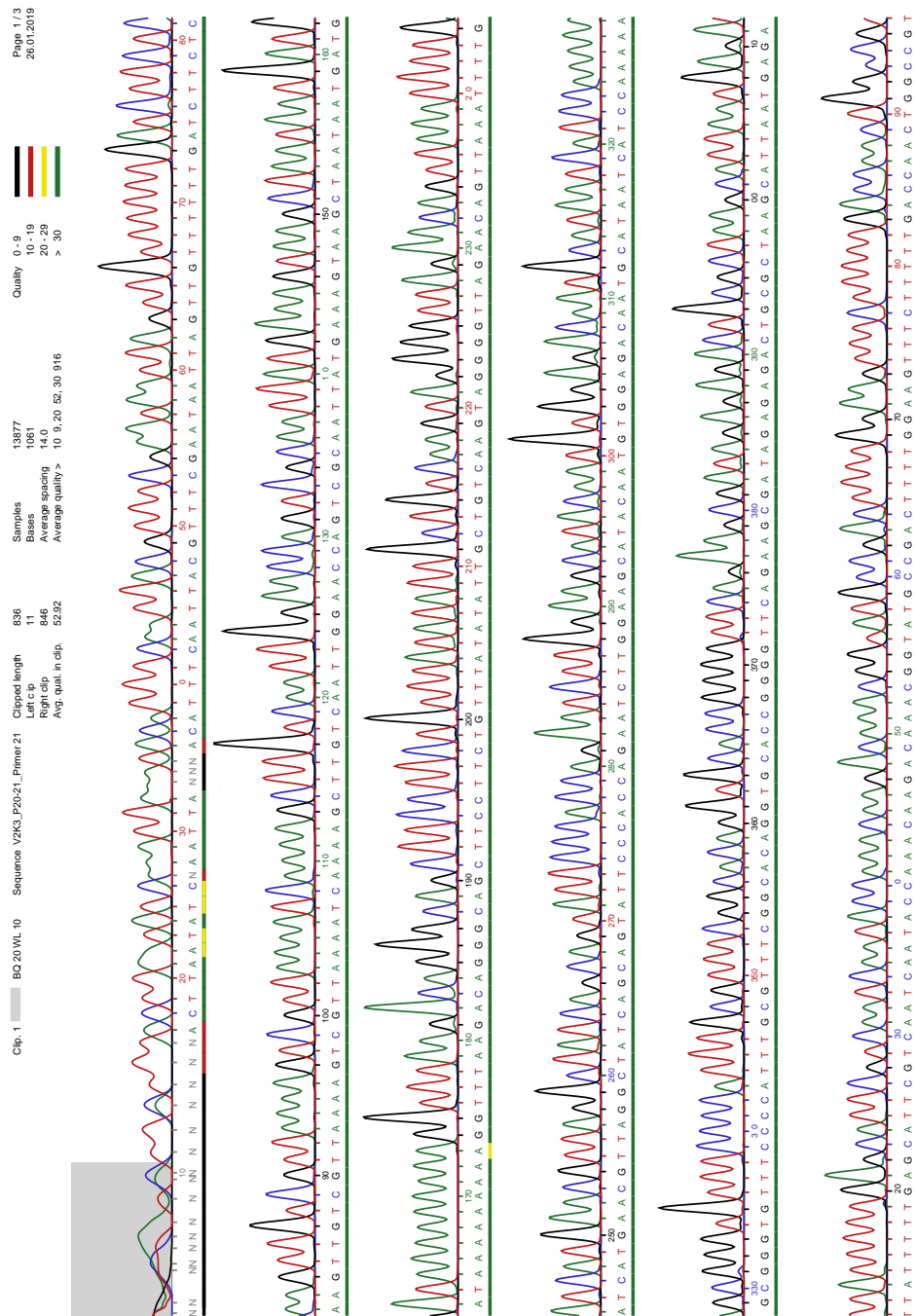


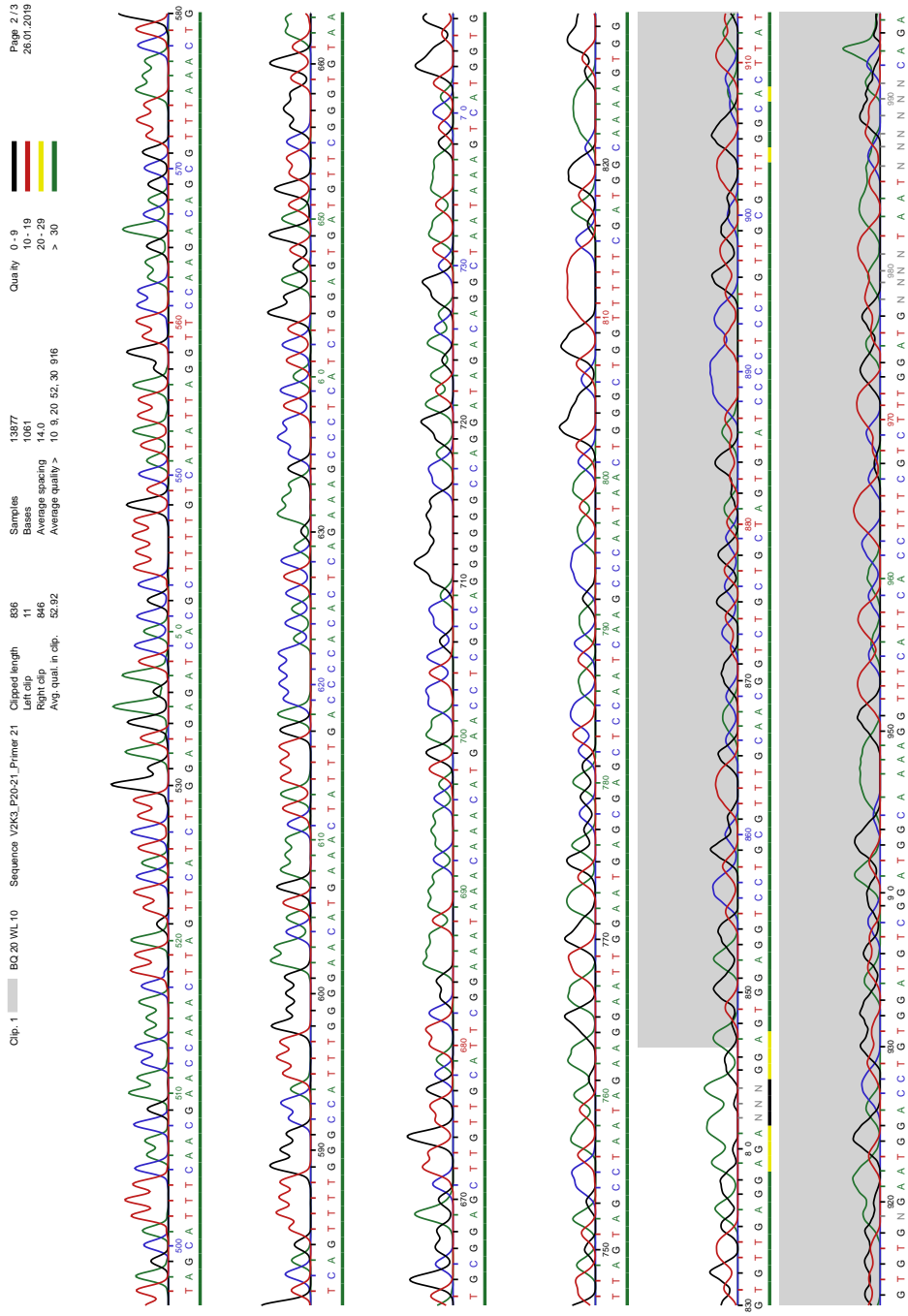






A.4.4. Sequenzierungsreport, rechte Flanke (Primer 21)





A.5. Alignment eGFP-Gensequenz

A.5.1. Alignment eGFP-Gensequenz Primer 16

```

Ori   CAAAAACAACATAATTATTCGAAACGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG
      .....
P16   CAAAAANNACTAATTATTCGAAACGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGG

Ori   TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCCG
      .....
P16   TGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGCCG

Ori   GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG
      .....
P16   GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG

Ori   GCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGT
      .....
P16   GCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAAGTGT

Ori   TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAG
      .....
P16   TCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAG

Ori   GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCG
      .....
P16   GCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCG

Ori   AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA
      .....
P16   AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA

Ori   AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCT
      .....
P16   AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGTCT

Ori   ATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGTCCGCCACAACA
      .....
P16   ATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGTCCGCCACAACA

Ori   TCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAGC
      .....
P16   TCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAGC

Ori   GCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
      .....
P16   GCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC

Ori   CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTC
      .....
P16   CCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTC

Ori   TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGTAAGCGGCCGCTCAAGAGGATGTCAGAAATGC
      .....
P16   TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGTAAGCGGCCGCTCAAGAGGATGTCAGAAATGC

Ori   CATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGT
      .....
P16   CATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTATATAGT

Ori   ATAGGATTTTTTTGTCAATTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATC
      .....
P16   ATAGGATTTTTTTGTCAATTTGTTTCTTCTCGTACGAGCTTGCTCCTGATCAGCCTATC

Ori   TCGCAGCAGATGAATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTT
      .....
P16   TCGCAGCAGATGAATATCTTGTGGTAGGGTTTGGGAAAATCATTTCGAGTTTGATGTTTT

Ori   TCTTG
      :
      :
P16   TNNTG

```

Abbildung A.4.: Alignment der eGFP Gensequenz (Primer 16)

Alignment der eGFP Gensequenz (LALIGN, Nucleotide Alignment, [30–32]). Ein ":" symbolisiert, dass zwei Basen identisch sind, nicht identische Basen werden als Lücke " " dargestellt

A.6. *Alignment* Übergang genomische DNA und integrierten Plasmid im *pAOX1*-Locus

A.6.1. *Alignment*, linke Flanke (Primer 18)

```

Ori   TTCACGCCATTGCTTTTGAGATCGACTGCAGCTTTGATGCCTGAAATCCCAGCGCTACA
P18   TTCACGCCATTGCTTTTGAGATCGACTGCAGCTTTGATGCCTGAAATCCCAGCGCTACA
Ori   ATGATGACATTTGGATTGGTTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGA
P18   ATGATGACATTTGGATTGGTTGACTCATGTTGGTATTGTGAAATAGACGCAGATCGGGA
Ori   ACAC TGAAAAATAACAGTTATTATTGAGATCTAACATCCAAGACGAAAGTTGAAATGA
P18   ACAC TGAAAAATAACAGTTATTATTGAGATCTAACATCCAAGACGAAAGTTGAAATGA
Ori   AACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACA
P18   AACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCATTCTCACACATAAGTGCCAAACGCAACA
Ori   GGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTC
P18   GGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTCCACTCCTCTTCTCCTC
Ori   AACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTC
P18   AACACCCACTTTTGCCANNNAACAGCCAGTTATTGGGCTTGATTGGAGCTCGCTC
Ori   ATTCCAATTCCTTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGC
P18   NNTCCAATTCCTTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTAGCCTGTCTATCCTGGC
Ori   CCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCG
P18   CCCCCTGGCGAGGTTTCATGTTTGTATTTCCGAATGCAACAAGCTCCGCATTACACCCG
Ori   AACATCACTCCAGATGAGGGCTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAA
P18   AACATCACTCCAGATGAGGGCTTCTGAGTGTGGGGTCAAATAGTTTCATGTTCCCAAA
Ori   TGGCCAAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGAAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCT
P18   TGGCCAAAACTGACAGTTTAAACGCTGTCTTGAAACCTAATATGACAAAAGCGTGATCT
Ori   CATCCAAGATGAACTAAGTTGGTTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAA
P18   CATCCAAGATGAACTAAGTTGGTTTCGTTGAAATGCTAACGGCCAGTTGGTCAAAAAGAA
Ori   ACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAA
P18   ACTTCCAAAAGTCGGCATACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATTGACGAATGCTCAAAAA
Ori   TAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGTGACCTGTGC
P18   TAATCTCATTAAATGCTTAGCGCAGTCTCTATCGCTTCTGAACCCCGTGACCTGTGC
Ori   CGAAACGCAAAATGGGG-AAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCATTGTCTCCACATTGT
P18   CGAAACGCAAAATGGGGAAACACCCGCTTTTGGATGANTATGCATTGTCTCCACATTGT
Ori   ATGCTT-CCAAGATT
P18   ATGCTTCCAAGATT

```

Abbildung A.6.: *Alignment* der Gensequenz Übergang *pAOX1* genomische DNA und integriertes Plasmid (Primer 18, linke Flanke)

Alignment der eGFP Gensequenz (LALIGN, *Nucleotide Alignment*, [30–32]). Ein ":" symbolisiert, dass zwei Basen identisch sind, nicht identische Basen werden als Lücke " " dargestellt

A.6.2. *Alignment*, linke Flanke (Primer 67)

```

Ori   GGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCATCGTTTCGAATAATTAGTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   GGGNNCCNCCCGGTGA-CAGCTCCTCGCCCTTGCNACCATCGTTTCGAATAATTAGTT

Ori   GTTTTTTGATCTTCTCAAGTTGTCGTTAAAAGTCGTTAAAATCAAAGCTTGCAATTGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   GTTTTTTGATCTTCTCAAGTTGTCGTTAAAAGTCGTTAAAATCAAAGCTTGCAATTGG

Ori   AACCAGTCGCAATTATGAAAGTAAGCTAATAATGATGATAAAAAAAAAAGGTTAAGACAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   AACCAGTCGCAATTATGAAAGTAAGCTAATAATGATGATAAAAAAAAAAGGTTAAGACAG

Ori   GGCAGCTTCCTTCTGTTTATATATTGCTGTCAAGTAGGGTTAGAACAGTTAAATTTTGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   GGCAGCTTCCTTCTGTTTATATATTGCTGTCAAGTAGGGTTAGAACAGTTAAATTTTGA

Ori   TCATGAACGTTAGGCTATCAGCAGTATCCACCAGAATCTTGAAGCATACAATGTGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   TCATGAACGTTAGGCTATCAGCAGTATCCACCAGAATCNNGAAGCATACAATGTGGA

Ori   CCGGGGTTCAGAAGCGATAGAGAGACTGCGCTAAGCATTAAATGAGATTATTTTGGCAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   CCGGGGTTCNNGAGCGATAGAGAGACTGCGCTAAGCATTAAATGAGATTATTTTGGCAT

Ori   TCGTCAATCAATACCAACAAGACAACGGTATGCCGACTTTTGAAGTTTCTTTTGGAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   TCGTCAATCAATACCAACAAGACAACGGTATGCCGACTTTTGAAGTTTCTTTTGGAC

Ori   CAACTGGCCGTTAGCATTTCACGAACCAAAGTTCATCTTGGATGAGATCAGCCTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   CAACTGGCCGTTAGCATTTCACGAACCAAAGTTCATCTTGGATGAGATCAGCCTT

Ori   TTGTCATATTAGGTTCCAAGACAGCGTTTAAACTGTCAGTTTTGGCCATTTGGGAACA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   TTGTCATATTAGGTTCCAAGACAGCGTTTAAACTGTCAGTTTTGGCCATTTGGGAACA

Ori   TGAAACTATTTGACCCCACTCAGAAAGCCCTCATCTGGAGTGATGTTCCGGTGAATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   TGAAACTATTTGACCCCACTCAGAAAGCCCTCATCTGGAGTGATGTTCCGGTGAATG

Ori   CGGAGCTTGTTGCATTCGAAATAAACAACATGAACCTCGCCAGGGGGCCAGGATAGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   CGGAGCTTGTTGCATTCGAAATAAACAACATGAACCTCGCCAGGGGGCCAGGATAGA

Ori   CAGGCTAATAAAGTCATGGTGTAGTAGCCTAATAGAAGGAATTGGAATGAGCGAGCTCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   CAGGCTAATAAAGTCATGGTGTAGTAGCCTAATAGAAGGAATTGGAATGAGCGAGCTCC

Ori   AATCAAGCCCAATAACTGGGCTGGTTTTTCGATGGCAAAAGTGGGTGTTGAGGAGAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P67   AATCAAGCCCAATAACTGGGCTGGTTTTTCGATGGCAAAAGTGGGTGTTGAGGNNA

```

Abbildung A.7.: *Alignment* der Gensequenz Übergang pAOX1 genomische DNA und integriertes Plasmid (Primer 67, linke Flanke)

Alignment der eGFP Gensequenz (LALIGN, *Nucleotide Alignment*, [30–32]). Ein ":" symbolisiert, dass zwei Basen identisch sind, nicht identische Basen werden als Lücke " " dargestellt

A.6.3. *Alignment*, rechte Flanke (Primer 20)

```

Ori   ACGAAAGGTTGAATGAAACCTTTTTGCCATCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   ACGAN-GGNTGAATGAAACCTTTTTGCCNTCCGACATCCACAGGTCCATTCTCACACATA

Ori   AGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   AGTGCCAAACGCAACAGGAGGGGATACACTAGCAGCAGACCGTTGCAAACGCAGGACCTC

Ori   CACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   CACTCCTCTTCTCCTCAACACCCACTTTTGCCATCGAAAAACCAGCCCAGTTATTGGGCT

Ori   TGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   TGATTGGAGCTCGCTCATTCCAATTCCTTCTATTAGGCTACTAACACCATGACTTTATTA

Ori   GCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGTTTCATGTTTGTATTTCGGAATGCAACAAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   GCCTGTCTATCCTGGCCCCCTGGCGAGTTTCATGTTTGTATTTCGGAATGCAACAAG

Ori   CTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAAATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   CTCCGCATTACACCCGAACATCACTCCAGATGAGGGCTTTCTGAGTGTGGGGTCAAAATG

Ori   TTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACTAATAT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   TTTTCATGTTCCCAAATGGCCCAAACGACAGTTTAAACGCTGTCTTGGAACTAATAT

Ori   GACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   GACAAAAGCGTGATCTCATCCAAGATGAACTAAGTTTGGTTCGTTGAAATGCTAACGGCC

Ori   AGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   AGTTGGTCAAAAAGAACTTCCAAAAGTCGGCATAACCGTTTGTCTTGTGGTATTGATT

Ori   CCCGGTGACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   CCCGGTGACCTGTGCCGAAACGCAAATGGGGAAACACCCGCTTTTGGATGATTATGCA

Ori   TTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   TTGTCTCCACATTGTATGCTTCCAAGATTCTGGTGGGAATACTGCTGATAGCCTAACGTT

Ori   CATGATCAAAATTAAGTCTTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   CATGATCAAAATTAAGTCTTAACCCCTACTTGACAGCAATATATAAACAGAAGGAAG

Ori   CTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTT-ATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   CTGCCCTGTCTTAAACCTTTTTTTTATCATCATTATTAGCTTACTTTCATAATTGCGAC

Ori   TGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAATTGAGAAGATCAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   TGGTTCCAATTGACAAGCTTTTGATTTTAAACGACTTTTAAACGACAATTGAGAAGATCAA

Ori   AAAACAATAATTATTCGAAACGTAATTGAAATGATTTAATTTGATTAAGTAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
P20   AAA-CAACTAATTATTCGAAACGTAATTGAAATGATTTA-TTTGATNTNA-GTAA

```

Abbildung A.8.: *Alignment* der Gensequenz Übergang pAOX1 genomische DNA und integriertes Plasmid (Primer 20, linke Flanke)

Alignment der eGFP Gensequenz (LALIGN, *Nucleotide Alignment*, [30–32]). Ein ":" symbolisiert, dass zwei Basen identisch sind, nicht identische Basen werden als Lücke " " dargestellt

A.6.4. *Alignment*, linke Flanke (Primer 21)

```

Ori   ACTTAATATCAAATTAATAACATTTCAATTACGTTTCGAATAATTAGTTGTTTTTGGATC
P21   ACTTAATATCNAATTANNACATTTCAATTACGTTTCGAATAATTAGTTGTTTTTGGATC
Ori   TTCTCAAGTTGTCGTTAAAAGTCGTTAAAATCAAAAGCTTGTCAATTGGAACCGAGTCGCA
P21   TTCTCAAGTTGTCGTTAAAAGTCGTTAAAATCAAAAGCTTGTCAATTGGAACCGAGTCGCA
Ori   ATTATGAAAGTAAGCTAATAATGATGATAAAAAAAA-GGTTTAAGACAGGGCAGCTTCCT
P21   ATTATGAAAGTAAGCTAATAATGATGATAAAAAAAAAGGTTTAAGACAGGGCAGCTTCCT
Ori   TCTGTTTATATATTGCTGTCAAGTAGGGGTTAGAACAGTTAAATTTTGATCATGAACGTT
P21   TCTGTTTATATATTGCTGTCAAGTAGGGGTTAGAACAGTTAAATTTTGATCATGAACGTT
Ori   AGGCTATCAGCAGTATCCCACCAGAATCTTGAAGCATACAATGTGGAGACAATGCATA
P21   AGGCTATCAGCAGTATCCCACCAGAATCTTGAAGCATACAATGTGGAGACAATGCATA
Ori   ATCATCCAAAAGCGGGTGTTCGCCATTTGCGTTTCGGCACAGGTGCACCGGGGTTTCAG
P21   ATCATCCAAAAGCGGGTGTTCGCCATTTGCGTTTCGGCACAGGTGCACCGGGGTTTCAG
Ori   AAGCGATAGAGAGACTGCGCTAAGCATTAAATGAGATTATTTTTGAGCATTGCTCAATCAA
P21   AAGCGATAGAGAGACTGCGCTAAGCATTAAATGAGATTATTTTTGAGCATTGCTCAATCAA
Ori   TACCAACAAGACAACGGTATGCCGACTTTTGGAAAGTTCTTTTTGACCAACTGGCCGT
P21   TACCAACAAGACAACGGTATGCCGACTTTTGGAAAGTTCTTTTTGACCAACTGGCCGT
Ori   TAGCATTCAACGAACCAAACTTAGTTCATCTTGGATGAGATCAGCTTTTGTCAATATA
P21   TAGCATTCAACGAACCAAACTTAGTTCATCTTGGATGAGATCAGCTTTTGTCAATATA
Ori   GGTTCCAAGACAGCGTTTAAACTGTCAGTTTGGGCCATTTGGGGAACATGAAACTATTT
P21   GGTTCCAAGACAGCGTTTAAACTGTCAGTTTGGGCCATTTGGGGAACATGAAACTATTT
Ori   GACCCACACTCAGAAAGCCCTCATCTGGAGTGATGTTCCGGGTGTAATGCCGAGCTTGT
P21   GACCCACACTCAGAAAGCCCTCATCTGGAGTGATGTTCCGGGTGTAATGCCGAGCTTGT
Ori   GCATTCGGAAATAAACAACATGAACCTCGCCAGGGGGCCAGGATAGACAGGCTAATAA
P21   GCATTCGGAAATAAACAACATGAACCTCGCCAGGGGGCCAGGATAGACAGGCTAATAA
Ori   AGTCATGGTGTTAGTAGCCTAATAGAAGGAATTGGAATGAGCGAGCTCCAATCAAGCCCA
P21   AGTCATGGTGTTAGTAGCCTAATAGAAGGAATTGGAATGAGCGAGCTCCAATCAAGCCCA
Ori   ATAAGTGGGCTGTTTTTCGATGGCAAAAGTGGGTGTTGAGGAGAAGAGG
P21   ATAAGTGGGCTGTTTTTCGATGGCAAAAGTGGGTGTTGAGGAGANNNGG

```

Abbildung A.9.: *Alignment* der Gensequenz Übergang pAOX1 genomische DNA und integriertes Plasmid (Primer 21, rechte Flanke)

Alignment der eGFP Gensequenz (LALIGN, *Nucleotide Alignment*, [30–32]). Ein ":" symbolisiert, dass zwei Basen identisch sind, nicht identische Basen werden als Lücke " " dargestellt